



NİKOTİN VE MELATONİNİN  
SWISS ALBINO TİPİ LABORATUVAR FARELERİNDE  
KARACİĞER ANTİOKSİDANT ENZİM AKTİVİTELERİ  
ÜZERİNE ETKİLERİ

İKBAL AGAH İNCE

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İ.C. YÜKSEK OKULU  
DOĞUMANTAYIN MERKEZİ

ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

136010

NİKOTİN VE MELATONİNİN SWISS ALBINO TİPİ LABORATUVAR  
FARELERİNDE KARACİĞER ANTİOKSİDANT ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE  
ETKİLERİ

İKBAL AGAH İNCE

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Prof.Dr.ZAFER EREN

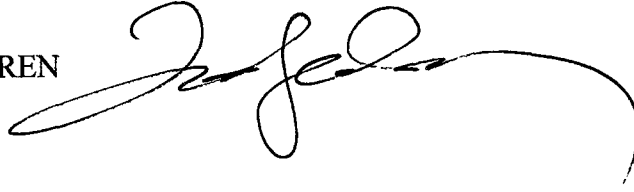
SAMSUN - 2003

136010

ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından 08/01/2004 tarihinde yapılan sınav ile Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof.Dr.Zafer EREN



Üye : Prof.Dr.Hasan Tahsin KEÇELİGİL



Üye : Yrd.Doç.Dr.Emine DİRAMAN



ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

/ /2004



Prof. Dr. A. Nur ONAR

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

# NİKOTİN VE MELATONİNİN SWISS ALBINO TİPİ LABORATUVAR FARELERİNDE KARACİĞER ANTIOKSİDANT ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

## ÖZET

Bu çalışmada Nikotinin ve bilinen en etkili antioksidant olan melatoninin , antioksidant enzimlerden süperoksit dismutaz ve katalaz üzerine etkileri zamana bağlı olarak karaciğerde incelenmiştir.

Bu amaçla 24 saat aç bırakılan Swiss albino tipi laboratuvar farelerine (*Mus musculus*) Nikotin ve Melatonin intraperitoneal yolla enjekte edildikten sonra, fareler 2. , 4. , 8. , 12. ve 24. saatlerde servikal dislokasyonla öldürülerek karaciğerleri izole edilmiştir. Karaciğerlere sırasıyla homojenizasyon, sonikasyon ve santrifugasyon işlemleri uygulanarak enzim fraksiyonu elde edilmiştir.Enzim fraksiyonlarında protein miktarı belirlendikten sonra süperoksit dismutaz ve katalaz aktiviteleri ölçülmüştür.

Çalışmamızın sonucunda SOD enzimi aktivitesinin deney grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık gösterdiği ( $p<0,01$ ), fakat enjeksiyon sonrası saatler arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık olmadığı belirlenmiştir. Melatonin süperoksit radikallerini uzaklaştırmada beklenen etkiyi göstermemiştir.

Katalaz enzim aktivitesi için yapılan çalışma sonucunda deney grupları ve enjeksiyon sonrası geçen süreler arasında istatistiksel olarak önemli ( $p<0,01$ ) farklılıklar gözlenmiştir. Katalaz aktivitesinde gözlenen maksimum inhibisyon 8. saatte gözlenmiştir. Bu inhibisyonun nedeninin melatoninin antioksidant etkisi sonucunda gözlendiği düşünülmektedir. Deney gruplarında 8. saatten sonra melatoninin antioksidant etkisini yitirmiştir.

Anahtar kelimeler: Nikotin, Melatonin, Antioksidant enzimler, Karaciğer

## EFFECT OF NICOTINE AND MELATONIN ON LIVER ANTIOXIDANT ENZYME STATUS IN SWISS ALBINO LABORATORY MICE

### SUMMARY

In this study, the effects of nicotine and melatonin, shown to be an effective antioxidant in a number of experimental models both *in vitro* and *in vivo*, on liver antioxidant enzyme statuses depending on time were investigated.

Swiss albino laboratory mice (*Mus musculus*) were kept hungry for 24 hours, then nicotine and melatonin were injected via intraperitoneally. Then, they were killed by cervical dislocation at 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup>, 12<sup>th</sup>, 24<sup>th</sup> hours and their livers isolated. Isolated livers were homogenized, sonificated and santrifuged to obtain enzyme fractions. The protein concentrations were measured and Superoxide Dismutase and Catalase activity was determined.

The activity of Superoxide Dismutase enzyme showed statistically significant difference between groups but not hours after injection ( $p < 0,01$ ). Melatonin failed to show expected effect on superoxide radicals.

The activity of Catalase showed statistically significant difference both between the groups and hours ( $p < 0,01$ ). The antioxidant effect of melatonin was observed at 8<sup>th</sup> hour at which time inhibition of catalase activity reached maximum value. It is thought that antioxidant effect of melatonin caused this inhibition. After 8<sup>th</sup> hour melatonin lost its antioxidant activity.

Keywords: Nicotine, Melatonin, Antioxidant enzymes, Liver

**TEŞEKKÜR**

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini hep yanımda hissettiğim danışmanım Sayın Prof. Dr. Zafer EREN'e, deneysel çalışmalarında bana sabırla yardımcı olan Yrd.Doç. Dr.Emine DIRAMAN'a, Yrd.Doç.Dr. Banu EREN'e, bana emeği geçen tüm hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.



## İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Biyolojide ve Tıpta Serbest Oksijen Radikalleri .....	3
2.2. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri .....	5
2.2.1. Süperoksit Radikali .....	6
2.2.2. Singlet Oksijen .....	7
2.2.3. Hidrojen Peroksit .....	8
2.2.4. Hidroksil Radikali .....	9
2.3. Serbest Radikallerin Kaynakları .....	10
2.4. Serbest Radikallerin Etkileri .....	13
2.4.1. Membran Lipidlerine Etkisi .....	13
2.4.2. Proteinlere Etkileri .....	15
2.4.3. Nükleik Asitlere Etkileri .....	16
2.4.4. Karbonhidratlara Etkileri .....	17
2.5. Serbest Radikallerin Etkilerine Karşı Savunma Mekanizmaları .....	17
2.6. Antioksidant Enzimler .....	18
2.6.1. Süperoksit Dismutaz (E.C.1.15.1.1) .....	18
2.6.2. Katalaz (E.C.1.11.1.6) .....	20
2.7. Antioksidant Maddeler .....	21
2.7.1. E vitamini ( $\alpha$ - tokoferol) .....	21
2.7.2. Melatonin .....	23
2.7.2.1. Reaktif Oksijen Türleri ile Melatonin Arasındaki Etkileşimler .....	24
2.8. Nikotin .....	33
2.8.1. Yaşa Bağlı Nikotin Metabolizmasındaki Değişiklikler .....	34
2.8.2. Gıda Hammaddelerindeki Nikotin .....	36
2.8.3. Nikotin Metabolizmasındaki Tür Varyasyonlarının <i>in vitro</i> Çalışmaları .....	38
2.8.4. Nikotin Metabolizmasındaki Tür Varyasyonları Üzerine <i>in vivo</i> Çalışmalar ...	39
3. MATERYAL VE METOT .....	41
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	41
3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması .....	41

3.3. Deneý Hayvanları .....	41
3.4. Deneklere Uygulanan Maddeler .....	41
3.5. Çalışmada Kullanılan Aletler .....	42
3.6. Deneysel Çalışmalar .....	42
3.7. Enzim Aktivitelerinin Tayini .....	43
3.7.1. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Tayini .....	43
3.7.2. Katalaz Aktivitesinin Tayini .....	44
4. BULGULAR .....	46
4.1. Nikotin ve Melatonin etkisiyle Süperoksit dismutaz enzimi aktivitesinde gözlenen değişimler .....	46
4.1.1. Nikotinin Süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine etkileri .....	46
4.1.2. Melatoninin Süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine etkileri .....	46
4.1.3. Nikotin ve Melatoninin Süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine etkileri .....	47
4.2. Nikotin ve Melatonin etkisiyle Katalaz enzimi aktivitesinde gözlenen değişimler ....	51
4.2.1. Nikotinin Katalaz aktivitesi üzerine etkileri .....	51
4.2.2. Melatoninin Katalaz aktivitesi üzerine etkileri .....	51
4.2.3. Nikotin ve Melatoninin Katalaz aktivitesi üzerine etkileri .....	51
5. TARTIşMA ve SONUÇ .....	55
6. KAYNAKLAR .....	62
7. ÖZGEÇMİş .....	77

## Kısaltmalar ve Simgeler

H·	Hidrojen
O <sub>2</sub> ·	Süperoksit
OH·	Hidroksil
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Singlet oksijen
HO <sub>2</sub> ·	Perhidroksi radikali
ROO·	Peroksil radikali
CCl <sub>3</sub>	Triklorometil
RO·	Alkoksil
NO	Nitrojen oksit
NO <sub>2</sub>	Nitrojen dioksit
SOD	Süperoksit Dismutaz
XOD	Ksantin Oksidaz
AFMK	<i>N</i> <sup>1</sup> -acetyl- <i>N</i> <sup>2</sup> -formyl-5-methoxykynuramine
DNA	Deoksiribonükleik asit
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid hidrojen
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfohidrojen
NNX	Nicotine- 1'- <i>N</i> - oksit
NIM	Nikotin iminyum iyonu
CNX	Kotinin - <i>N</i> - oksit
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
ESR	Elektron Spin Rezonans
MS	Kütle Spektrometresi
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
PUFA	Poli Doymamış Yağ Asitleri
RA	Romatoid Artrit
ACS	Abdominal Compartment Syndrome
SLE	Sistemik Lupus Eritematozis

**ŞEKİL LİSTESİ**

Şekil 1. Oksijenin suya indirgenmesi ve diğer oksijen radikallerinin oluşumu .....	6
Şekil 2. E vitamininin ( $\alpha$ -tokoferol) moleküler yapısı .....	21
Şekil 3. Melatoninin kimyasal yapısı .....	23
Şekil 4. Hidroksil radikalının organik moleküllere etkisi .....	25
Şekil 5. Moleküler oksijenden meydana gelen serbest radikaller ve toksik bileşikler .....	26
Şekil 6. Saf sistemlerde etkili bir antioksidan olan AFMK'nın oluşum mekanizması .....	27
Şekil 7. Melatonin ve hidroksil radikali etkileşim mekanizması .....	29
Şekil 8. Melatonin ve $H_2O_2$ etkileşim mekanizması .....	31
Şekil 9. Melatoninin ilaç metabolizmasındaki çeşitli koruyucu etkileri .....	32
Şekil 10. Nikotin kimyasal yapısı .....	34
Şekil 11. Nikotin verilmiş Swiss albino tip laboratuvar farelerinde SOD aktivitelerinin zamana bağlı olarak değişimi .....	48
Şekil 12. Melatonin verilmiş Swiss albino tip laboratuvar farelerinde SOD aktivitelerinin zamana bağlı olarak değişimi .....	48
Şekil 13. Nikotin ve Melatonin birlikte verilmiş Swiss albino tip laboratuvar farelerinde SOD aktivitelerinin zamana bağlı olarak değişimi .....	49
Şekil 14. Nikotin ve Melatonin verilmiş Swiss albino tip laboratuvar farelerinde SOD aktivitelerinin zamana bağlı olarak değişiminin değerlendirilmesi .....	50
Şekil 15. Nikotin verilmiş Swiss albino tip laboratuvar farelerinde KAT aktivitelerinin zamana bağlı olarak değişimi .....	52
Şekil 16. Melatonin verilmiş Swiss albino tip laboratuvar farelerinde KAT aktivitelerinin zamana bağlı olarak değişimi .....	53
Şekil 17. Nikotin ve Melatonin birlikte verilmiş Swiss albino tip laboratuvar farelerinde KAT aktivitelerinin zamana bağlı olarak değişimi .....	53
Şekil 18. Nikotin ve Melatonin verilmiş Swiss albino tip laboratuvar farelerinde KAT aktivitelerinin zamana bağlı olarak değişiminin değerlendirilmesi .....	54

**TABLO LİSTESİ**

Tablo 1. Oksijen molekülü ve oksijen radikallerinin elektron dağılımı .....	5
Tablo 2. Bazı radikallerin sembolleri ve özellikleri .....	12
Tablo 3. Antioksidant maddeler .....	19
Tablo 4. Nikotin ve Melatonin verilmiş Swiss albino tip laboratuvar farelerinde SOD aktivitesinin zamana bağlı olarak değişimi .....	47
Tablo 5. SOD aktivitesinin iki yönlü ANOVA testi ile analizi .....	50
Tablo 6. Nikotin ve Melatonin verilmiş Swiss albino tip laboratuvar farelerinde katalaz aktivitesinin zamana bağlı olarak değişimi .....	52
Tablo 7. Katalaz aktivitesinin iki yönlü ANOVA testi ile değerlendirilmesi .....	54



## 1. GİRİŞ

Oksijen tüm canlılar için vazgeçilmez bir elementtir. Hidrojen, karbon, azot ile birlikte organik moleküllerin yapısına girerler. Anaerob canlılar hariç tüm bitki ve hayvanların enerji metabolizmalarında oksijenin hayati önemi vardır. Canlı metabolizmasında oksijenin kullanımı esnasında düşük konsantrasyonlarda reaktif oksijen türleri oluşmakta fakat enzimatik süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve enzimatik olmayan  $\alpha$ -tokoferol, melatonin, askorbik asit gibi antioksidant sistemler tarafından etkisiz hale getirilerek uzaklaştırılır (Halliwell & Arumoa, 1991). Bazı anormal durumlarda reaktif oksijen türlerinin üretimi artar ve antioksidant sistemlerdeki bazı bozukluklar nedeniyle etkisizleştirilemezler. Bunun sonucunda oluşan reaktif oksijen türleri hasara neden olur (Navarro-Alarcon & Lopez-Martinez, 2000).

Dünyada sigara kullanan bir milyardan fazla insanın vücudu kronik olarak nikotine maruz kaldığı gibi sigara kullanmayanlarda her gün çevresel sigara dumanından etkilenmektedir. Bu nedenle henüz netlik kazanmayan nikotin metabolizması üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Birçok metabolik yolun bulunması çalışmanın karmaşıklığını arttırmıştır. Bilindiği üzere yapılan her çalışma spesifik sorulara yanıt aramak için gerçekleştirilmektedir. Melatonin, tıpta ve eczacılıkta geniş kullanımı olan bilinen en etkili radikal süpürücü etki gösteren bir maddedir. Melatonin pineal bezden salgılanan bir hormondur. Retinal işlevler, sirkadiyan ritim ve üreme olaylarını içeren bir çok olayda membrana bağlı reseptörlerle yönlendirilen bir çok fonksiyona sahiptir (Brzezinski, A., 1997). Melatoninin son yıllarda serbest radikal süpürücü etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Diğer indol türevleri ve triptofan metabolitlerinde olduğu gibi melatonin, yapısında bulundurduğu indolaminin kolayca elektron vermesine olanak sağlayan elektronca zengin aromatik halkasal sistemin varlığıyla redoks özelliği kazanır (Jovanovich & Steenken, 1992; Al-Kazwini ve ark., 1990).

Melatoninin serbest radikallerle etkileşimi Tan ve arkadaşlarının 1993 yılında melatonin ile hidroksil radikalleri arasındaki etkileşimi tanımlamalarıyla ilk olarak ortaya konulmuştur (Tan ve ark., 1993a). Bu çalışmalar, bir çok oksijen merkezli radikaller ve diğer reaktif türlerin çeşitli deneysel sistemlerde melatoninini okside edebilme yeteneği olduğunu göstermiştir (Reiter ve ark., 2000). Bununla birlikte serbest radikallerin melatoninle olan etkileşimleri henüz tam olarak anlaşılmamıştır.

Bir çok farklı metabolik etkenler sonucunda meydana gelen süperoksit radikallerinin ortaya çıkardığı hasarlar canlılarda oksidatif hasarlara yol açarak canlı yaşamı üzerinde olumsuz etkiler bırakabilmektedir. Bu metabolik bozuklukların canlı yaşamının ilerleyen aşamalarına oluşturacağı olumsuz sonuçları engelleyebilmek için serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve etki mekanizmalarının araştırılması ve aydınlığa kavuşturulamayan mekanizmaların açıklanması günümüzde araştırma gruplarının başlıca hedefini oluşturmaktadır.

Bu bilgiler ışığında nikotinin etki mekanizması ve bu etkiyi ortadan kaldırabilmek amacıyla bu alanda yapılan çalışmalara katkıda bulunabilmek amacıyla çalışmamızda nikotin ve melatonin etkisiyle Swiss albino tipi laboratuvar farelerinde radikal süpürücü enzim aktivitesindeki değişimler zamana bağlı olarak gözlenmiştir.



## 2. GENEL BİLGİLER

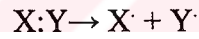
### 2.1. Biyolojide ve Tıpta Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden ve bu sebeple oldukça reaktif atom veya moleküllerdir. Bu geniş tanımlama H atomu (bir eşleşmemiş elektron), çoğu geçiş metalini ve oksijen molekülünü içermektedir (Akkuş, 1995; Halliwell & Gutteridge, 1984).

Serbest radikal basit bir atom olabileceği gibi kompleks yapılı bir molekül de olabilir. Yaşadığımız çevrede fiziksel ve kimyasal kaynaklı olaylar sonucu sürekli olarak radikal oluşumu vardır. Hücresel ortamda oldukça çeşitli ve fazla miktarda radikal türler meydana gelmektedir (Kılınç ve Kılınç, 2002 ). Üç şekilde oluşabilirler;

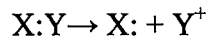
#### 1. Kovalent bağların homolitik bölünmesi ;

Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcak sıcaklık (500-600 °C) kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa bu tip kırılmaya “homolitik kırılma” adı verilir. Bu tip bağ kırılması sonucunda her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalır. Organik moleküllerdeki bağların kırılması durumunda zıt yüklü elektron çiftleri meydana gelir ve bu türler de reaktiftir (Pryor, 1994).



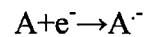
#### 2. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi sonucu oluşur;

Radikal özelliği olmayan bir molekülden elektron kaybı esnasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu meydana gelir. Örneğin askorbik asit, tokoferoller gibi hücresel antioksidantlar radikal türlere elektron verip radikalleri indirgerken, kendileri de radikal formlarına dönüşebilir (Pryor, 1994).



#### 3. Normal bir moleküle elektron transferiyle meydana gelir;

Radikal özelliği olmayan bir moleküle tek elektron transferiyle dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşursa, bu tür indirgenme radikal oluşumuna yol açar. Örneğin moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi sonucu oksijenin radikal formu olan süperoksit ( $O_2^-$ ) meydana gelir.



Bu mekanizmayla radikal oluşumu biyolojik sistemlerde yaygın olarak gerçekleştirildiğinden canlılar için önemlidir. Canlılarda çok sayıda enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle süperoksit üretilir (Halliwell & Gutteridge, 1999; Grisham, 1992).

Oksijenin, klinik tıpta çok sık kullanılması toksik etkisini bize unutturmamalıdır. Oksijenin atmosferik konsantrasyonundan yüksek oluşu bitkilere, hayvanlara ve E.coli gibi aerobik bakterilere zararlı etkisinin oluşu uzun zamandır bilinmektedir (Morris, 1976; Balentin, 1982). Hayatta kalma süresinin oksijen basıncına karşı logaritmik eğrileri bunun aksini göstermektedir. Protzoon, fare, balık, sıçan, tavşan ve böcekler için ilişki yaklaşık olarak doğrusaldır. Aslında, %21'lik oksijen oranının bile oldukça yavaş olarak zarar verici etki gösterdiğine dair oldukça tutarlı deliller vardır. Gözlenen sonuçlar kullanılan organizmanın türüne, yaşına, besinlerinde farklı miktarlarda A, E ve C vitaminleri, geçiş metalleri, antioksidantlar ve doymamış lipidlerinin bulunuşu ve fizyolojik durumları oldukça farklılık göstermiştir (Halliwell & Gutteridge, 1984).

1954'de, Gershman ve Gilbert oksijenin zarar verici etkilerinin çoğunun oksijen radikallerinin oluşumuna sebep olabileceğini önermişlerdir (Gillbert, 1981). Bu hipotezi Fridovich (1975, 1978, 1983), oksijen toksisitesinin süperoksit teorisi olarak geliştirmiştir. Teoriye göre, *in vivo* süperoksit radikalının oluşumunun oksijenin toksik etkilerini oluşturmada başlıca görevi üstlenmektedir.

O<sub>2</sub> iki eşleşmemiş elektron içermektedir ve her biri farklı  $\pi^*$  zıt bağlanma orbitalerinde bulunmaktadır (Halliwell, 1981b). Bu iki elektron aynı spin kuantum sayısına sahiptir ve bu yüzden O<sub>2</sub> diğer bir molekülü ondan bir çift elektron olarak oksidasyona uğrattırır her iki yeni elektron  $\pi^*$  orbitalerindeki boşluklara uygun olması için paralel spine sahip olmaları gerekmektedir (Pauli prensibi). Atomik veya moleküler orbitalde bir çift elektron antiparalel spine (+ 1/2, - 1/2) sahiptir. O<sub>2</sub> oksidasyonu üzerine olan bu kısıtlamalar O<sub>2</sub> kendi elektronlarını bir defada almasını teşvik etmektedir ve radikal olmayan (non-radical) türler ile kendi reaksiyonunu yavaşlatmaktadır (Tablo 1.). Oksidaz ve oksijenazların çoğunun aktif bölgesinde geçiş metalleri bulunmaktadır. Çünkü geçiş metallerinin tek elektron alıp verebilme yeteneği bu tip spin kısıtlamasının önüne geçebilir (Hill, 1981).

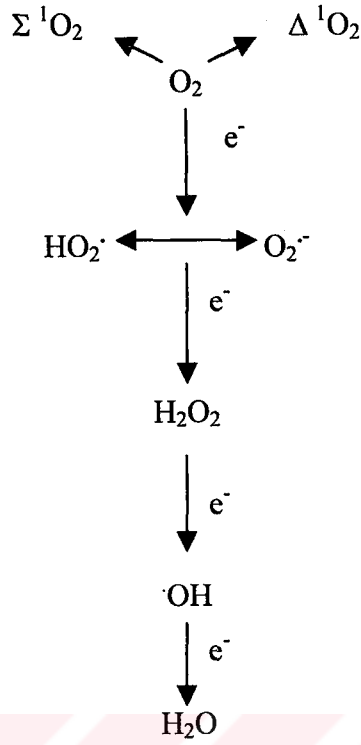
Tablo 1. Oksijen molekülü ve oksijen radikallerinin elektron dağılımı (Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1984)

Spin Hali	Triplet Oksijen $^3\text{O}_2$	Singlet Oksijen $^1\text{O}_2$	Süperoksit $\text{O}_2^-$	Peroksit iyonu $\text{O}_2^{2-}$	Singlet Oksijen $^1\text{O}_2$
$\sigma^* 2p$	○	○	○	○	○
$\pi^* 2p$	↑○	↑○	↑↓	↑○	↑○
$\pi 2p$	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
$\sigma 2p$	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
$\sigma^* 2s$	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
$\sigma 2s$	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
$\sigma^* 1p$	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
$\sigma 1p$	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓

## 2.2. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri

Biyolojik sistemlerdeki en önemli radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikalleri arasında oksijen, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikalleri anahtar rol oynamaktadırlar (Şekil 1.).

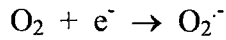
Oksijenin elektron dağılımı serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesine neden olur. Radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş tepkime vermektedir. Oksijen en son suya kadar indirgenmektedir. Bu indirgenme esnasında oldukça reaktif olan oksijen türleri ortaya çıkabilir (Halliwell & Gutteridge, 1999).



Şekil 1: Oksijenin suya indirgenmesi ve diğer oksijen radikallerinin oluşumu

### 2.2.1. Süperoksit Radikali

Aerobik hücrelerin tümünde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikali ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) meydana gelir. Bir elektron temel durumdaki  $\text{O}_2$  molekülüne bağlanırsa bu elektron  $\pi^*$  zıt bağlanma orbitallerinden birine girmelidir. Bu ürün süperoksit radikalidir (Fridovich, 1975,1978; Halliwell, 1981b).



Süperoksit, bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direk olarak zarar vermez. Asıl önemi hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır.

Süperoksit anyonu hem oksitleyici hem de redükleyici özelliğe sahiptir. Redükleyici etkisi Ferrisitokrom c veya nitroblue tetrazolium'un redüksiyonunda bir elektron kaybeder ve oksijene okside olur. Sitokrom c'nin indirgenmesi SOD tarafından inhibe edilir. Serbest radikallerin önemli kaynaklarından biri fagositik hücrelerin yabancı partiküller veya immün komplekslerle karşılaşması sonucunda meydana gelen solunumla ilgili olaylardır (Halliwell, 1982). Nötrofil, monosit, makrofaj ve

eozinofillerin de içinde bulunduğu fagositik hücrelerin  $O_2^-$  meydana getirdiği bilinmektedir. Bundan faydalanılarak SOD aktivitesi ve fagositler tarafından üretilen  $O_2^-$  tayini yapılır (Akkuş, 1995).

### 2.2.2. Singlet Oksijen

Singlet  $O_2$  ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen moleküldür ( $O_2^1\Delta g$ ). Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olur. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle oluşur.  $\Delta$  ve  $\Sigma$  olmak üzere iki şekli vardır (Şekil 1.). Singlet  $O_2$  uyarılmış elektronların daha düşük enerji seviyesine inmesiyle ışık yayar. Singlet  $O_2$ 'nin kimyasal bir bileşikle etkileşimi sonucu kemilüminesans meydana gelmesi ve bunun ölçülmesiyle reaktif oksijen türlerinin direk tayini yapılabilmektedir.

Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu C merkezli radikaller ( $R\cdot$ ), peroksil radikalleri ( $ROO\cdot$ ), alkoksil radikalleri ( $RO\cdot$ ) gibi önemli serbest radikaller meydana gelirler. Bunlardan özellikle poli doymamış yağ asitlerinden meydana gelen peroksil radikali yarı ömrü uzun olan bir radikaldir (Akkuş, 1995).

$O_2$  reaktivitesini yükseltmenin diğer yolu da eşlenmemiş bir elektronu spin kısıtlamasını azaltacak şekilde hareket ettirmektir.  $O_2$ 'nin iki singlet durumu mevcuttur (Şekil.1.). Biyolojik sistemler için en önemli singlet türü Singlet  $O_2^1\Delta g$ 'nin eşlenmemiş elektronu yoktur ve radikal değildir. Singlet  $O_2^1\Sigma^+$  genellikle reaksiyona girmeden önce  $^1\Delta g$  durumuna dönüşmektedir.  $O_2$ 'nin  $^1\Delta g$  durumuna geçişi klorofil, retinal, flavin veya porfirinler gibi bazı biyolojik pigmentlerin  $O_2$  varlığında ilüminasyonu sonucunda gerçekleşebilir (Foote, 1982). Singlet  $O_2$  'in *in vivo* oluşumu ilümine kloroplastlarda (Halliwell, 1981a) ve memelilerde gözün lens ve retinasında meydana gelir (Zigler & Goosey, 1981; Katz ve ark., 1982; Kirschfeld, 1982).

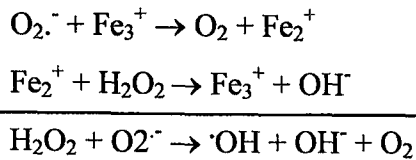
### 2.2.3. Hidrojen Peroksit

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki hidrojen atomuyla birleşerek hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) meydana getirir.  $H_2O_2$  membranlardan kolayca geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır. Ancak biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin oluşumu süperoksidin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir (Halliwell & Gutteridge, 1999).

$O_2$  molekülüne ikinci bir elektronun eklenmesiyle eşlenmemiş elektronu olmayan peroksit iyonu oluşmaktadır ve bu bir radikal değildir. Fizyolojik pH'da tüm peroksit iyonları ( $O_2^{2-}$ )  $H_2O_2$  verecek şekilde protonlanmaktadır çünkü  $H_2O_2$  'nın  $pK_a$ 'sı oldukça yüksektir. Sulu çözeltilerde  $O_2^-$  dismutasyon reaksiyonuna uğrayarak  $H_2O_2$  ve  $O_2$  meydana getirir. Bu dismutasyon kendiliğinden ya da SOD enzimi tarafından katalizlenir. Dismutasyon asidik pH'larda daha hızlı gerçekleşmektedir. pH 4.8'de protonlanmış ve protonlanmamış radikal konsantrasyonu eşittir. Bu formların arttığı pH'larda bu hız belirgin şekilde düşüktür (Tan ve ark., 2000).

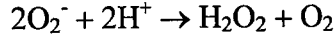
Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli rol oynamaktadır. Çünkü süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir.

Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir. Bu reaksiyon katalizör yokluğunda da varlığında da gerçekleşmektedir. Demirle katalizlenen reaksiyonlar oldukça hızlı gerçekleşmektedir. Bu reaksiyonda önce ferri demir ( $Fe_3^+$ ) süperoksit tarafından ferro demire ( $Fe_2^+$ ) indirgenir, oluşan ferro demir kullanılarak "fenton reaksiyonu" ile hidrojen peroksitten  $\cdot OH$  ve  $OH^-$  üretilir. Bu reaksiyonun mekanizması aşağıdaki şekildedir.



Görüldüğü gibi süperoksit hem hidrojen peroksit kaynağı hem de geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisidir. İndirgenmiş geçiş metalleri okside şekillerine göre hidrojen peroksitle daha reaktiftirler (Akkuş, 1995).

Tüm reaksiyon aşağıda bazı basamakların özeti şeklinde verilmiştir.

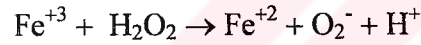


#### 2.2.4. Hidroksil Radikali

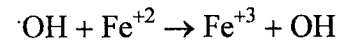
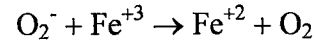
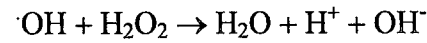
$H_2O_2$ 'deki O-O bağının hemolitik parçalanması iki hidroksil radikali meydana getirmektedir. Isı ve iyonize radyasyon tarafından hemoliz gerçekleştirilebilir.  $H_2O_2$  ve Demir (II) tuzunun basit bir karışımında da  $\cdot OH$  radikali oluşturmaktadır. Bu olay ilk olarak 1894'de Fenton tarafından gözlemlenmiştir.



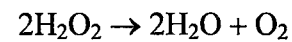
Eser miktarda  $Fe^{+3}$   $H_2O_2$  ile daha fazla reaksiyon verir:



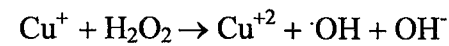
Ve daha fazla reaksiyonun gerçekleşme ihtimali vardır:



$H_2O_2$  ve Demir (II) tuzunun basit bir karışımı bu şekilde bir bütün radikal reaksiyonları serisini teşvik etmektedir. Tüm bu reaksiyonların özeti,  $H_2O_2$ 'nın demirle katalize edilen ayrıştırılmasıdır:



Bakır ( I ) tuzu,  $H_2O_2$  ile  $\cdot OH$  radikali oluşturmak üzere reaksiyona girer ve bu reaksiyon demirinkinden oldukça hızlıdır.



Hidroksil radikalleri hücrede bulunan sekerler, aminoasitler, fosfolipidler, DNA bazları ve organik asitler gibi moleküllerin hemen hemen tümüyle oldukça hızlı reaksiyon verirler (Halliwell & Gutteridge, 1984). Hidroksil radikallerinin reaktivitesi oldukça yüksektir ve canlı sistemlerde oluştuğunda çevresinde rastladığı tüm biyolojik moleküllerle etkileşirler. Bunun sonuncu olarak farklı reaktivitelere sahip ikincil radikaller meydana gelir. Örneğin karbonat iyonu ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) ile reaksiyonları güçlü bir indirgen ajan olan karbonat radikali ( $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ) meydana gelir (Anbar & Neta, 1967).

*In vivo* ortamda  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve Cu (I) ve/veya Fe (II) tuzlarının ortamda bulunursa  $\cdot\text{OH}$  radikalleri oluşacaktır.  $\text{O}_2^{\cdot-}$  üreten bir biyolojik sistem  $\text{O}_2^{\cdot-}$  diğer bir molekülle hemen reaksiyon vermediği takdirde dismutasyon reaksiyonuyla  $\text{H}_2\text{O}_2$  meydana getirir. Bunun oranı ortam pH'sına ve  $\text{O}_2^{\cdot-}$  konsantrasyonuna bağlıdır.  $\text{H}_2\text{O}_2$  oluşumu bazı türlerin tüm bakterilerinde, fagositik hücrelerde, sperm hücrelerinde (Holland ve ark., 1982) ve *in vitro*'da mitokondri, kloroplast ve mikrozomlarda gözlenmiştir (Chance ve ark., 1979; Halliwell, 1981b).

### 2.3. Serbest Radikallerin Kaynakları

Serbest radikal, son yörüngesinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron içeren bazı atomlar ve oksijen redüksiyon ürünleri süperoksit ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), hidroksil ( $\text{OH}$ ) gibi kısa ömürlü reaktif atomlardır (Byung, 1994; Harris, 1992). Bazı atomlar bir yörüngesinde tek elektron bulundurmaları nedeniyle radikaldir. Örneğin önemli bir hava kirliliği etkeni olan nitrit dioksit ( $\text{NO}_2$ ) ve nitrik oksit ( $\text{NO}$ ) bu tip radikallerdendir (Aslan & Dündar, 1998).

Demir, bakır, mangan, molibden gibi geçiş metalleri dış yörüngelerinde birer elektron taşımalarına rağmen radikal karakter göstermezler (Aslan ve ark., 1995). Serbest radikal kabul edilen atom ve moleküller, elektron konfigürasyonuna ek olarak termodinamik yapıları ve lokal kinetik aktiviteleriyle değerlendirilir (Aslan ve ark., 1995; Byung, 1994).

#### Ekzojen kaynakları;

- Aktive olmuş fagositler
- Radyasyon
- Alışkanlık yapan maddeler
- Çevresel ajanlar; sigara dumanı, aromatik hidrokarbonlar, hava kirliliğine neden olan maddeler, pestisidler vb.
- Stres: Streste katekolamin düzeyi artar. Katekolaminlerin oksidasyonu radikal kaynağıdır. Bu olay stresin hastalıkların patojenezindeki rolünün serbest radikallerle ilgisi açısından önemlidir (Mansuy ve ark., 2000)

#### Endojen kaynakları;

- Tioller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, antibiyotikler vb. moleküllerin otooksidasyonu.
- Enzimler ve Proteinler: Ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, hemoglobin, bazı enzim ve proteinler de katalitik döngüleri esnasında serbest oksijen radikalleri oluşturabilirler. Bu enzimlerden biri ksantin oksidazdır. Normal koşullarda NAD-bağımlı dehidrogenaz olarak etki eder ve radikal oluşumuna sebep olmaz. Fakat *in vivo*'da iskemi sonucunda enzim dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüşür ve süperoksit radikali oluşumuna neden olur (Halliwell & Gutteridge, 1999).
- Mitokondriyal elektron taşıma sistemi (Saraste, 1999; Alberts ve ark., 1989; Alvarez ve ark., 2000).
- Endoplazmik retikulum ve çekirdek membran elektron transport sistemleri (Kagan & Tyurina, 1998).
- Peroksizomlar
- Plazma membranı: Plazma membranındaki siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzim sistemlerinin katalize ettiği araşidonik asit metabolizması sonucunda serbest radikaller meydana gelebilir.
- Oksidatif stress yapıcı durumlar: İskemi, travma, intoksikasyon gibi.
- Aktive olmuş fagositler ;

Fagositoz sırasında hücrede önemli ölçüde serbest radikal meydana getirilir. Aktifleşmiş fagositler bakterileri öldürmek için hidrojen peroksit veya hipoklöröz asit meydana getirirler.

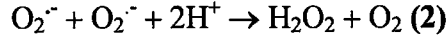
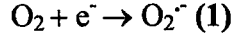
Tablo 2. Bazı radikallerin sembolleri ve özellikleri

Radikal	Simge	Tanımlama
Hidrojen	H <sup>•</sup>	Bilinen en basit radikal
Süperoksit	O <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil	OH <sup>•</sup>	En toksik oksijen radikali
Hidrojen peroksit	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Moleküler hasar yeteneği ve reaktivitesi düşük bir radikal
Singlet oksijen	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Güçlü oksidatif oksijen formu (yarı ömrü kısadır)
Perhidroksi radikali	HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Lipidlerle hızlı çözünerek lipid peroksidasyonunu arttırmaktadır
Peroksil radikali	ROO <sup>•</sup>	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipidlere lokalize olur
Triklorometil	CCl <sub>3</sub>	CCl <sub>4</sub> metabolizması ürünü karaciğerde ürünleri bir radikal
Alkoksil	RO <sup>•</sup>	Organik peroksitlerin yıkımıyla üretilen oksijen metaboliti
Nitrojen oksit	NO	L-arjinin aminoasitden <i>in vivo</i> üretilir
Nitrojen dioksit	NO <sub>2</sub>	NO'nun oksijen ile reaksiyonu sonucunda oluşur

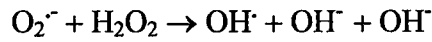
Radikal metabolitler, aslında aerobik organizmaların kaçınılmaz bileşikleri olup hücrelerde kontrollü kullanımları ile bir dizi enzimin sentezi ve bir çok organizmanın antibakteriyel savunmasında önemlidir (Weiss, 1989). Ancak radikal reaksiyonlarını kontrol ederek belli bir düzeyin üstüne çıkmasını engelleyen antioksidant unsurlar bulunmaktadır. Canlı dokuları radikal ataklarına maruz kaldıklarında bunu nötralize edebilecek antioksidant bileşikler yetersiz kalırsa dokular dönüşümsüz hasarlara maruz kalabilir (Byung, 1994).

Oksijen tam olarak indirgendiği reaksiyonlarda son ürün olarak suya dönüşmektedir. Bu indirgenme basamaklarında reaktif metabolitler meydana gelmektedir (Florence, 1990; Şekil 1.).

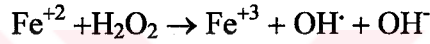
Süperoksit, 7,2 pH'da daha stabil bir molekül olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye dönüşmektedir (Fridowich, 1975).



Süperoksit, Cu<sup>+2</sup> gibi geçiş metalleri ve radikallerle kolay reaksiyon verir ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile "Haber-Weiss" tepkimesini vererek oldukça toksik hidroksil radikalini oluşturmaktadır (Haber & Weiss, 1934).



Demir iyonlarının katalizörlüğünde "Fenton Tepkimesi" gerçekleşir ve reaksiyon ortalama 4000 kez hızlanır (Aslan ve ark., 1995).



Bu sebeple aerobik organizmalar kolay okside olabilen bileşiklerin süperoksitle reaksiyona girmesini önlemek için SOD enzimini, hidrojen peroksiti yok etmek amacıyla da, KAT ve GPx enzimlerini kullanırken (Ji ve ark., 1988), bazı bakteriyel enzimler süperoksit tarafından inaktif getirilmektedir (Machlin & Bendich, 1987).

#### 2.4. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller, hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşenlerine karşı zararlı etkiler göstermektedirler. Mitokondrideki permeabiliteyi bozar, hücrenin potasyum kaybını ve trombosit agregasyonunu arttırmaktadır.

Proteaz, fosfolipaz, elastaz, siklooksijenaz, ksantin oksidaz, lipooksijenaz, triptofan dioksijenaz ve galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktiveleştirirken alfa-1-antitripsin gibi bazı savunma sistemlerini inaktive ederler. Serbest radikaller bu etkileri farklı şekillerde gösterebilirler (Halliwell & Gutteridge, 1984).

##### 2.4.1. Membran Lipidlerine Etkileri

Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştuğu zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Biyomoleküllerin tüm

büyük sınıfları serbest radikaller tarafından etkilenirler. Bu biyomoleküllerin en hassası lipidlerdir. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluşturur. Poli doymamış yağ asitlerinin (PUFA) oksidatif yıkımına lipid peroksidasyonu adı verilir. Lipid peroksidasyonu canlı metabolizması üzerinde oldukça zararlı etkileri vardır. Lipid peroksidasyonu, kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oluşturduğu hasarlar geri dönüşümsüzdür.

Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan poli doymamış yağ asidi zincirlerinden bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlar. Bu olayın sonucunda yağ asidi zinciri bir lipid radikali niteliği kazanır. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle dien konjugatları ve daha sonra lipid radikallerinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksil radikali meydana gelir. Lipid peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer poli doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna sebep olurlar. Lipid peroksil radikalleri açığa çıkan hidrojen radikallerini alarak lipid hidroperoksitlerine dönüşür. Bu şekilde olay kendi kendine katalizlenerek devam eder. Lipid peroksidasyonu ya toplayıcı reaksiyonlarla sonlandırılır ya da otokatalitik yayılma reaksiyonlarıyla devam eder.

Plazma membranı ve organel lipid peroksidasyonu, serbest radikal kaynaklarının hepsiyle uyarılabilir ve metallerin varlığında artar. Bu metaller redoks katalisti olarak görev yaparlar ve süperoksit ve hidrojen peroksitin daha güçlü oksidantlara dönüşümüne sebep olur.

Lipidlerden, araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine “enzimatik lipid peroksidasyonu”, diğer radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna ise “enzimatik olmayan lipid peroksidasyonu” adı verilir.

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksitlerinin yıkımı geçiş metalleri iyon katalizini gerektirmektedir. Lipid hidroperoksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler meydana gelir. Bu bileşikler hücre düzeyinde metabolize edilebileceği gibi başlangıçtaki etki alanlarından difüze olarak hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiobarbitürik asitle ölçülebilen malondialdehit (MDA) meydana

gelir. Bu metot lipid peroksidasyon seviyesinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır. Malondialdehit, yağ asiti oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir fakat lipid peroksidasyon derecesiyle korelasyon göstermektedir.

Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Doğrudan membran yapısına ve dolaylı olarak reaktif aldehytler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Bu şekilde birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olur lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması yüzünden reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerle meydana gelir. Membran geçirgenliği ve mikroviskozitesi bu yüzden oldukça ciddi şekilde etkilenir. Peroksidasyonla oluşan malondialdehit, membran bileşenlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler malonaldehitin niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar (Halliwell & Gutteridge, 1984).

#### **2.4.2. Proteinlere Etkileri**

Proteinler serbest radikal etkisine karşı PUFA`dan daha az hassastırlar ve başlayan zarar verici zincir reaksiyonlarının hızla ilerleme ihtimali daha azdır. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme dereceleri amino asit kompozisyonuna bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana gelirler. Bu reaksiyonlar sonucunda IgG ve albümin gibi fazla sayıda disülfid bağı içeren proteinlerin üç boyutlu yapıları bozular. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Serum proteinlerinde, kataraktlı lens proteinlerinde ve inflamatuvar eklem hastalığı olan kişilerin sinovial sıvılarındaki IgG`lerinde serbest radikal hasarı tespit edilmiştir. Ayrıca serbest radikallerle muamele edilen IgG`lerin romatoid faktör antikorları ile bağlanmalarının arttığı görülmüştür. Bu şekilde daha fazla immün kompleks oluştururlar ve bu şekilde daha fazla radikal oluşmaktadır. Serbest radikal ve immün kompleks oluşumu arasındaki bu karşılıklı etkileşme, romatoid arteritteki inflamasyonun bazı özelliklerini kısmen açıklar.

Sitoplazmik ve membran proteinleri ozon ve protoporfirin IX gibi okside edici ajanlara maruz kaldıklarında çapraz bağlanarak dimerleşirler ve ya daha büyük agregatlara dönüşürler. Prolin ve lizin, süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında enzimatik olmayan hidroksilasyona maruz kalabilirler. Proteinler üzerine olan serbest radikal hasarları birikmişse ya da belirgin proteinlerin spesifik bölgesi üzerinde yoğunlaşmışsa hücrenin canlılığı tehlike altına girer.

Hem proteinleri de serbest radikallerin hasarlarına maruz kalırlar. Özellikle oksihemoglobin, süperoksit veya hidrojen peroksit ile reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur (Akkuş, 1995).

### 2.4.3. Nükleik Asitler Üzerine Etkileri

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek lezyonlara sebep olurlar. Sitotoksisite, genelde nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır. Hidroksil radikali, deaksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerin oluşturduğu hidrojen peroksit, membranlardan kolayca geçerek hücre çekirdeğine ulaşır. Bu yolla DNA hasarı, hücre işlev bozuklukları ve hatta hücre ölümleri meydana gelebilir. Bu yüzden DNA serbest radikallerden kolay zarar gören önemli bir hedeftir. Süperoksite maruz kalan DNA molekülleri hayvanlara enjekte edildiklerinde daha fazla antijenik özellik gösterirler. Bu etki oldukça önemlidir. Çünkü otoimmün bir hastalık olan sistemik lupus eritematozis'te (SLE) ve romatoid artrit'te (RA) dolaşımda anti-DNA antikorları bulunur. SLE'lı hastaların süpresör hücrelerinde bir kusur bulunduğu kaydedilmiştir. Aynı durum RA'lı hastaların sinovial sıvılarındaki süpresör hücreler içinde geçerlidir.

T lenfositleri genelde serbest radikal ataklarına karşı daha hassastırlar. *In vitro* deneylerde serbest oksijen radikallerinin, T-süpresör hücreleri için helper T hücrelerine göre daha sitotoksik oldukları gösterilmiştir. Bu bulgular, serbest radikal reaksiyonlarının immün süpresör hücrelerin otoimmün reaksiyonları kontrol etmelerini engelleyebilecekleri görüşünü desteklemektedir (Akkuş, 1995).

#### 2.4.4. Karbonhidratlara Etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve oksoaldehitler meydana gelir. Bunlar diabet ve sigara kullanımına bağlantılı kronik hastalıklarda önemli etkileri vardır.

Oksoaldhitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar.

Bağ dokusunun önemli bir mukopolisakkariti olan hyalüronik asit sinoviyal sıvıda bol bulunmaktadır. Enflamatuvar eklem hastalıklarında sinovial sıvıya çok sayıda polimorf hücre geçmektedir ve muhtemelen immün komplekslerle aktivasyonu sonucu ekstraselüler sıvıya  $H_2O_2$  ve  $O_2^-$  salgırlarlar. Bu radikallerin *in vitro* hyalüronik asidi parçaladıkları gösterilmiştir. Hyalüronik asit parçalanması enflamatuvar eklem hastalıklarında sinoviyal sıvının karakteristik bir özelliğidir.

Gözün vitreous humour`unda da bol miktarda hyalüronik asit içerir ve bunun oksidatif hasarı katarakt oluşumuna neden olur.

Serbest radikaller, bu tip etkilerinden dolayı çok çeşitli hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Diabet ve diabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, sedef hastalığı, romatoid artrit, behçet hastalığı, çeşitli deri, kas, göz hastalıkları, kanser ve yaşlılık gibi birçok hastalıkta serbest radikal üretiminin arttığı ve antioksidant savunma sisteminin yetersiz olduğu gözlenmiştir. Ancak bu hastalıkların çoğunda serbest radikallerin hastalığın sebebi mi yoksa sonucu mu olarak ortaya çıktıkları bilinmemektedir (Akkuş, 1995).

#### 2.5. Serbest Radikallerin Etkilerine Karşı Savunma Mekanizmaları

Hücreler oksidatif hasarı engelleyen, sınırlayan yada tamir eden bazı sistemlere sahiptir. Aerobik canlılarda oksidatif hasar üç şekilde engellenir;

- Detoksifikasyon mekanizmasıyla oluşan radikallerin uzaklaştırılması.
- Serbest radikal oluşturan reaksiyonların sonlandırılması.
- Serbest radikal oluşumunun sınırlandırılması.

Oksidatif hasara karşı savunmada öncelikli olarak enzim sistemleri ön plana çıkmaktadır. Antioksidant savunmanın önemli bir kısmı, süperoksit ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' uzaklaştırılmasında görev alan SOD, KAT, GPx, glutatyon redüktaz ve glukoz 6 fosfat dehidrogenaz enzimleriyle gerçekleştirilmektedir. Serbest radikallerin sentez ve yıkım hızı ve bazı eser elementlerin besin yoluyla alınımı bu enzimlerin aktivitelerini etkilemektedir.

Enzimsel savunmanın yanı sıra E vitamini ve β karoten gibi lipid içinde çözünen antioksidant vitaminler ve sitoplazmada bulunan glutatyon, ürik asit, bilürubin ve askorbik asit gibi antioksidant etkili maddeler serbest radikallerin etkilerini ortadan kaldırırlar.

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar antioksidant savunma sistemleri olarak adlandırılırlar. Antioksidantlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidantlar, doğal (endojen) kaynaklı ve dış (ekzojen) kaynaklı olabildiği gibi serbest radikal oluşumunu engelleyen ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde de iki gruba ayrılabilir. Ayrıca enzim yapısında olanlar ve enzim yapısında olmayanlar şeklinde de sınıflandırılabilir. Hücrenin hem sıvı hem de membran kısımlarında bulunabilirler (Halliwell & Gutteridge, 1984; Tablo 3.)

## 2.6. Antioksidant Enzimler

### 2.6.1. Süperoksit Dismutaz ( E.C.1.15.1.1)

Serbest radikallere karşı ilk savunma SOD enzimi tarafından gerçekleştirilir. SOD, KAT ve GPx'dan farklı olarak serbest radikali substrat olarak kullanır. SOD, süperoksitin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'e dismutasyonunu katalize eden bir metaloenzimdir (Fridovich, 1978).



Ökaryotik hücrelerde SOD'nin üç izoenzimi bulunmaktadır. Sitoplazmada ve membranlar arası boşlukta bulunan SOD'un moleküler ağırlığı 32 kDa'dur. Cu ve Zn

Tablo 3. Antioksidant maddeler

Endojen Antioksidantlar		Ekzojen Antioksidantlar		Gıda Antioksidantları
• Enzimler	• Enzim Olmayanlar	• Ksantin oksidaz inhibitörleri		• BHT
Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi	- Yağda çözünenler	- Tungsten		• BHA
Süperoksit Dismutaz	α-tokoferol	- Allopürinol		• Sodyum benzoat
Katalaz	β-karoten	- Oksipürinol		• Ethoksiquin
Glutasyon peroksidaz	Ürat	- Folik asit		• Propilgalat
Glutasyon-S-transferaz	Sistein	- Pterin aldehit		• Fe-SOD
Hidroperoksidaz	Seruloplazmin	• NADPH oksidaz inhibitörleri		
	Transferrin	-Adenozin		
	Laktoferrin	- Lokal anesteziçiler		
	Myoglobin	- Kalsiyum kanal blokerleri		
	Hemoglobin	- Non-steroid aninflamatuar ilaçlar		
	Ferritin	- Cetiedil		
	Metionin	- Difeniilin iyodonyum		
	Albumin	• Rekombinant Süperoksit Dismutaz		
	Bilirubin	• Trolox C (E vitamini analogu)		
	Glutasyon	• Endojen antioksidant aktiviteyi arttıran maddeler		
		- Ebselen, asetilsistein		
		• Diğer enzimatik olmayan radikal toplayıcıları		
		-Mannitol, albumin, DMSO		
		• Demir redoks döngüsünün inhibitörleri		
		- Deferoksamin, sertüloplazmin		
		• Nötrofil adezyon inhibitörleri		
		• Sitokinler		
		- TNF, interlökin I		
		• Barbitüratlar		
		• Demir şelatörleri		

içeren enzim iki alt birimden oluşmaktadır. Primer olarak mitokondrial matrikste bulunan SOD'un moleküler ağırlığı 80kDa'dur ve Mn içermektedir. Hücre dışı sıvılarda bulunan ve tetramerik glikoprotein yapısıyla hücre içi izoenzimlerden farklı yanı gösteren Cu ve Zn içeren ekstraselüler SOD enzimi bulunmaktadır (Barber & Horris, 1994).

Prokaryotlarda FeSOD ve Mn SOD enzimleri bulunur. Molekül ağırlığı 39kDa olan Fe SOD molekül başına +3 değerlikli bir Fe iyonu içermektedir ve birbirine eşit iki alt birim içermektedir. Fe SOD aerobik bakterilerin çoğunda bulunmaktadır. Genel olarak Fe SOD konstitütif, Mn SOD ise indüklenabilir enzimdir. Fe SOD ve Mn SOD amino asit dizilişi bakımından birbirine oldukça benzer olmasına karşın CuZn SOD oldukça farklıdır (Guemouri ve ark., 1991; Markey ve ark., 1990).

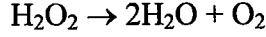
CuZn SOD aktivitesi pH 9.5'e kadar sabit kalırken Mn SOD ve Fe SOD izoenzimleri alkali pH'da inhibe olurlar. Çözünürlüğü çok yüksek olan sığır SOD enzimi 100°C'de 30 saniyede tamamen inaktive olmaktadır. 0.1 mM pH 7.8 EDTA içeren fosfat tamponunda ise 75°C'de 6.5 dakikada SOD enzimi aktivitesinin yarısını kaybeder (Cebellus ve ark., 1990). CuZn SOD enzimi siyanürle inhibe olmasına karşın Mn SOD enzimi siyanüre karşı dirençlidir. SOD enziminin katalizlediği reaksiyonun son ürünü olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> CuZn SOD ve Fe SOD izoenzimlerini inaktive ederken Mn SOD üzerine etkisi yoktur (Guemouri ve ark., 1991; Markey ve ark., 1990).

SOD enziminin bütün izoenzimlerinde enzimin aktif bölgesinde bulunan yapının şelat yapıcı ajanlarla uzaklaştırılması katalitik aktivitenin kaybına neden olmaktadır. Uzaklaştırılan metalin geri kazanımı aktivitenin geri kazanımını sağlar. CuZn SOD enziminde bakır iyonunun katalitik, çinko iyonunun yapısal fonksiyonu vardır (Cebellus ve ark., 1990; Bolan & Ulvik, 1991).

### 2.6.2. Katalaz (E.C.1.11.1.6.)

Katalaz tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan, peroksizomlarda hidrojen peroksidi parçalayan yüksek moleküler ağırlıklı porfirin içeren enzimdir. %20 oranında sitoplazmada ve %80 oranında peroksizomlarda bulunmaktadır. Molekül ağırlığı 240.000 olup 4 alt birimden oluşmaktadır. Her bir alt birim aktif merkeze bağlı bir hem grubu içermektedir. Molekülün alt birimlerine ayrılması enzim aktivitesinin kaybına yol açar. Asit, siyanür ve indirgenmiş glutatyon KAT'i inhibe eder. Hücre içi

oksidatif reaksiyonlar moleküler oksijeni hidrojen peroksida dönüştürür. KAT bütün makromolekülleri peroksitlerin yıkıcı etkisinden korumaktadır (Barber & Horris, 1994; Guemouri ve ark., 1991).

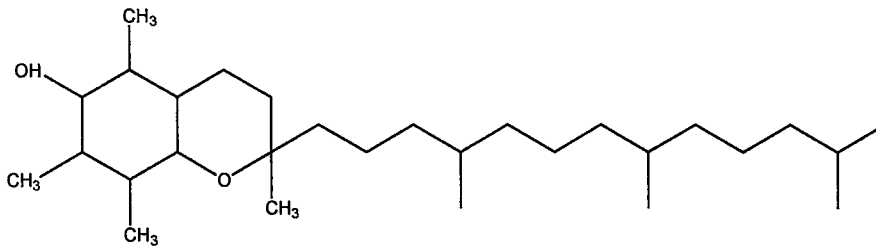


Memeli hücrelerinde, NADPH KAT'a bağlıdır ve  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin inaktivasyonundan KAT'ı koruyabilir. Tek hücrelilerde, KAT'ın antioksidant fonksiyonu oldukça aktiftir. Fakat memeli hücrelerinin çoğunda hidrojen peroksit konsantrasyonu yüksek olan peroksizomlarda KAT etkindir. Peroksizomlar dışında KAT'ın yoğun olarak bulunduğu eritrositlerde bile hidrojen peroksit GPx tarafından parçalanır. Fridovich, süperoksit radikallerinin KAT'ı inhibe ettiğini göstermiştir (Fridovich, 1986; Chauiere & Ferrari-Iliou, 1999).

## 2.7. Antioksidant Maddeler

### 2.7.1. E vitamini ( $\alpha$ -tokoferol)

E vitamini ilk olarak Evans ve Sure tarafından tanımlanmış ve 1958 yılında izole edilmiştir. Doğal olarak alfa, beta, gama, delta, eta ve zeta gibi formları bulunmaktadır. D- $\alpha$ -tokoferol en geniş doğal dağılımı olan formdur. Ayrıca antioksidant aktivitesi en yüksek olan da  $\alpha$ -tokoferoldur. Yapısında bulunan fenolik hidroksil grubuna sahip aromatik halka, vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidant özelliği bu gruptan kaynaklanmaktadır (Horwitt, 1979; Evans, 1976; Korner, 1978).



Şekil 2. E vitamininin ( $\alpha$ -tokoferol) moleküler yapısı

$\alpha$ -tokoferol dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunur. En yüksek vitamin E konsantrasyonları, mitokondri ve mikrozoimler gibi membranca zengin hücre fraksiyonlarında bulunur (Bernard ve ark., 1970).

Bitkisel yağlar ve tohumlar, E vitamini bakımından zengin kaynaklardır. Bitkisel yağların sabunlaşmayan kısımlarında ve en çok yer fıstığı, badem, pamuk yağı ve keten tohumunda bulunur. Zeytin yağında eser miktarda bulunur (Zino ve ark., 1997).

Diyette yağda çözünmüş olarak alınır ve yağların sindirimi esnasında emilir. Herhangi bir taşıyıcı protein olmadan pasif difüzyonla emilir. Önce şilomikron yapısına dahil olur. Şilomikronlar lipoprotein lipaz aracılığıyla hidroliz olurken E vitamininin bir bölümü dokulara taşınır. Kalan E vitamini ise şilomikron kalıntılarıyla birlikte karaciğer tarafından alınıp, hepatik kökenli lipidler aracılığıyla tekrar dolaşıma katılmaktadır. E vitamini en fazla düşük yoğunluklu lipidlerde bulunmaktadır. E vitamininin en önemli depolanma yeri yağ dokusudur (Jialal & Fuller, 1993).

Güçlü bir antioksidant olan E vitamini, hücre membran fosfolipidlerinde bulunan poli doymamış yağ asitleri serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattıdır. Bir molekül  $\alpha$ -tokoferol 100 molekül poli doymamış yağ asitinin peroksidasyonunu engelleyebilir. E vitamini, süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksi radikallerini ve diğer türleri indirger (Evelson ve ark., 1997; Smith ve ark., 1997).

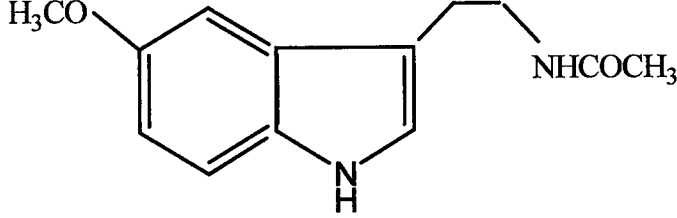
Glutatyon peroksidaz ile E vitamini serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. Enzim oluşan peroksitleri ortadan kaldırırken E vitamini peroksitlerin sentezini engeller (Parker, 1991).

E vitamini, selenyum metabolizmasında da önemli rol oynar. Selenyum, pankreas fonksiyonları ve E vitamininin lipidlerle emilimini gerçekleştirmek için gereklidir. Ayrıca E vitamininin lipoproteinler içinde tutulmasına yardımcı olur. E vitamini ise selenyumun organizmadan kaybını önleyerek veya onu aktif tutarak selenyum ihtiyacını azaltır (Smith ve ark., 1997).

E vitamini zincir kırıcı bir antioksidant olarak bilinir. Çünkü fonksiyonları, lipid peroksi radikallerini parçalamak ve böylece lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırmaktır (Combs ve ark., 1975).

### 2.7.2. Melatonin

Melatonin antioksidant etki gösterdiği 1993 yılında belirlenmiştir. Melatonin en zararlı radikal olan  $\cdot\text{OH}$  radikalini ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır. Günümüzde bilinen antioksidantların en güçlüsü olarak kabul edilmektedir (Halliwell & Gutteridge, 1999).



Şekil 3. Melatoninin kimyasal yapısı

Melatonin çok geniş dağılımı olan triptofan türevi bir maddedir. Bitkilerde (Balzer & Hardeland 1996; Reiter ve ark., 2001; Van Tassel ve ark., 2001), bakterilerde (Manchester ve ark., 1995), tek hücrelilerde (Hardeland ve ark., 1995), omurgasızlarda (Hardeland & Fuhrberg 1996), insanlar (Brzezinski, 1997) ve diğer omurgalılarda (Reiter, 1991) bulunmuştur. Memelilerde melatonin çeşitli organ ve hücrelerde üretilebilir (Bubenik.2001; Stefulj ve ark., 2001). Fakat başlıca üretildiği yer pineal bezlerdir (Reiter, 1991). Pineal bezlerin fizyolojik görevi son yıllarda anlaşılabilmiştir. Melatonin düzeyinin tüm türlerde artan yaşla birlikte azaldığı belirlenmiştir (Reiter, 1992). Melatonin, işlevsel olarak mevsimsel üremenin düzenlenmesi (Reiter, 1980), sirkadian ritmi güçlendirme (Arendt, 1988), bağışıklık sisteminin uyarılması (Guerrero & Reiter, 1992, 2002; Maestroni, 2001), kanser başlangıcı ve tümör gelişimi üzerine baskılayıcı etkisi (Reiter, 1999; Karbownik & Reiter, 2000; Blask ve ark., 1991; Sauer ve ark., 2001) ve uykuyu düzenleyici etkileri vardır (Garfinkel ve ark., 1995; Dijk & Cajochen, 1997).

Melatonin  $\cdot\text{OH}$  radikaliyle reaksiyona girdikten sonra indolil katyon radikaline dönüşür ki bunun da ortamdaki  $\text{O}_2^-$  radikalini tutarak antioksidant aktivite gösterdiği kaydedilmiştir (Reiter ve ark., 2000).

Serbest oksijen radikalleri oluşturmak suretiyle kansere sebep olan safröl'ün DNA üzerindeki hasarının melatonin tarafından çok etkili bir şekilde engellendiği gözlenmiştir (Tan ve ark., 1993b, 1994).

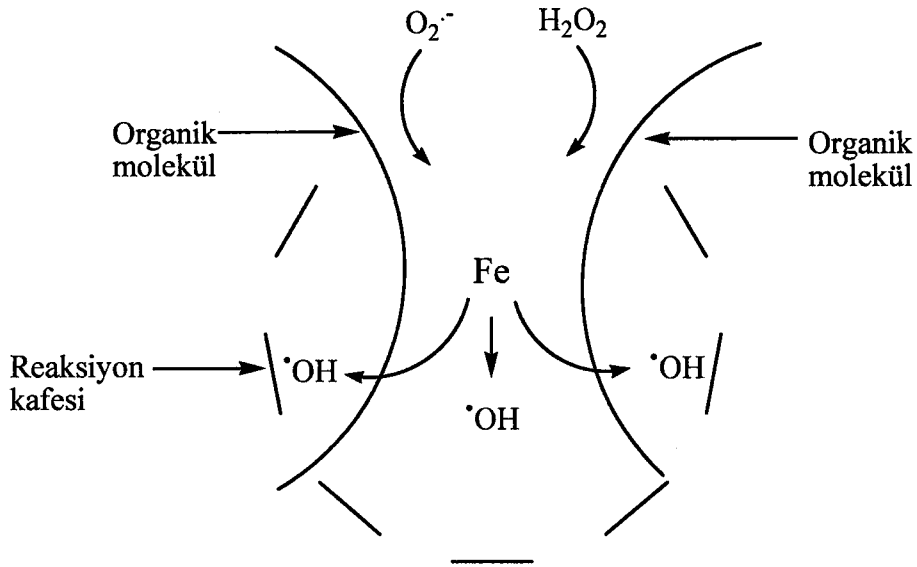
Melatoninin diğer önemli bir özelliği de lipofilik olmasıdır. Dolayısıyla hücrenin hemen hemen bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gibi kan-beyin bariyeri gibi bariyerleri de kolayca geçer. Böylece çok geniş bir alanda antioksidant aktivite gösterir. Melatoninin başka bir avantajı da diğer antioksidantların aksine çok yüksek dozlarda (300mg/gün) ve uzun süre kullanımda (5 yıla kadar) bile toksik bir etkisinin olmamasıdır. Ayrıca bazı antioksidantlar belli oranda prooksidant aktiviteye sahip oldukları halde melatoninin böyle bir etkisi de yoktur (Reiter ve ark., 2000).

Melatoninin hücre çekirdeğine girebilmesi, DNA'yı oksidatif hasardan koruması bakımından diğer antioksidantlara göre üstün bir özelliktir. Yaşlanmayla birlikte melatonin üretimi azaldığından yaşlanma ve yaşlanmayla ilgili hastalıkların patojenezinde önemli rolü olabileceği düşünülmektedir (Reiter, 1997a).

Sonuç olarak, melatoninin klinik açıdan da ihmal edilmemesi gereken son derece önemli bir antioksidant ve anti kanserojen olduğuna inanılmaktadır.

#### **2.7.2.1. Reaktif Oksijen Türleri ile Melatonin Arasındaki Etkileşimler**

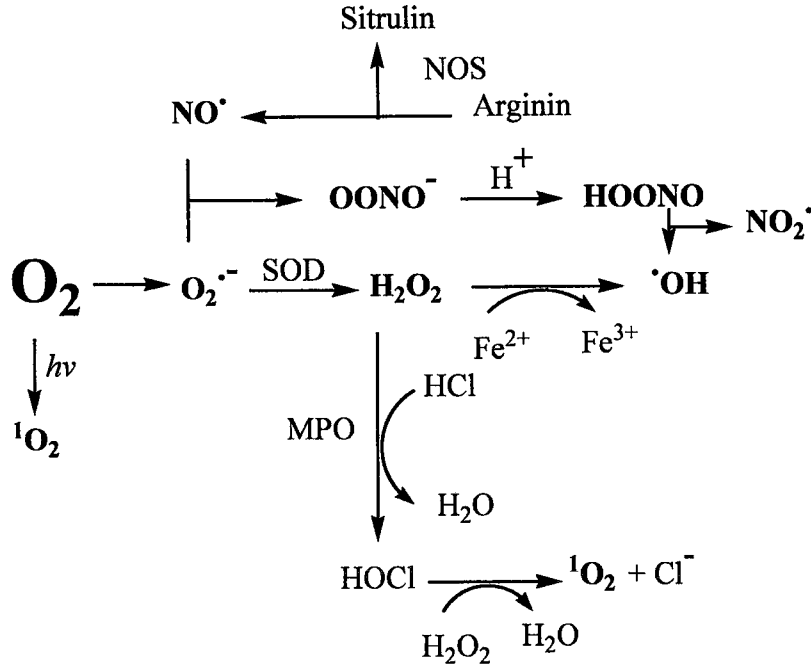
Hidroksil radikali bilinen en etkili reaktif oksijen radikalidir (Halliwell & Gutteridge, 1999). Hidroksil radikalleri meydana geldiğinde çevresinde bulunan hemen hemen tüm moleküllerle etkileşirler. 1993 yılında Tan ve arkadaşları tarafından melatoninin hidroksil radikalini süpürücü etkisini keşfedilmiştir (Tan ve ark., 1993a). Yapılan çalışmalarda 'OH radikalinin hidrojen peroksit'in fotolizi sonucu ortaya çıktığı ESR ile belirlenmiş ve bu veriler farklı bilim grupları tarafından doğrulanarak (Matuszak ve ark., 1997; Mahal ve ark., 1999; Stasica ve ark., 1998; Chyan, 1999), melatonin etkili bir 'OH radikali süpürücüsü olduğu kabul edilmiştir.



Şekil 4. Hidroksil radikalının organik moleküllere etkisi (Reiter, 2002)

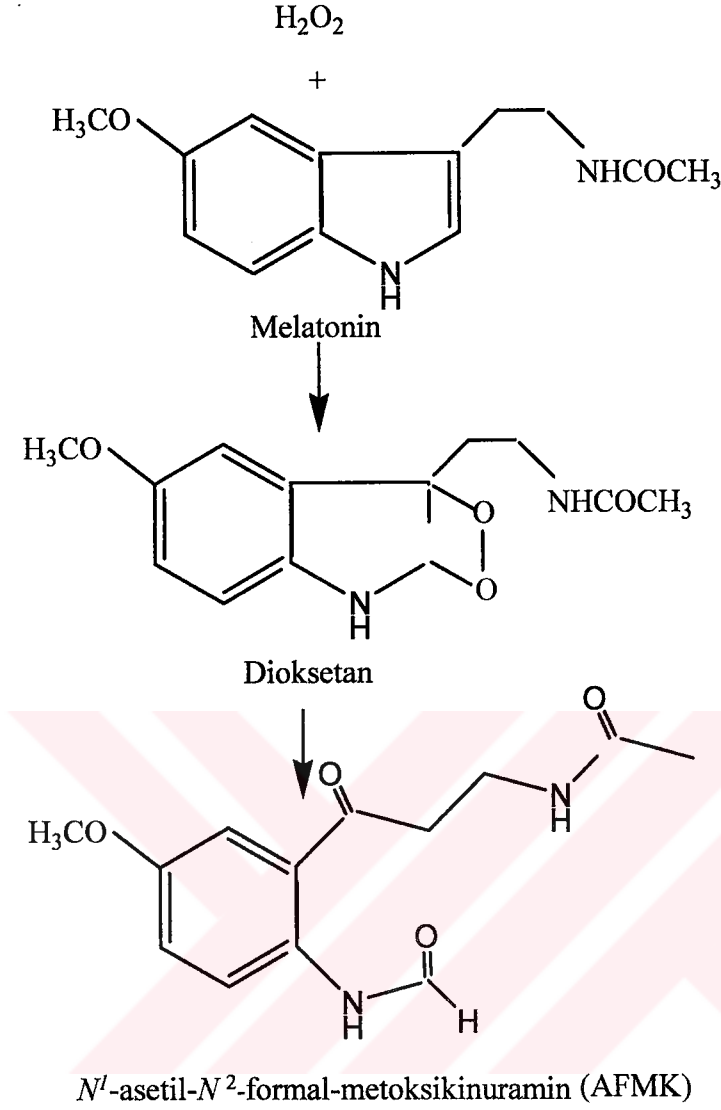
Hidrojen radikalleri tüm hücre altı yapılarda meydana gelir ve çevresindeki tüm organik moleküllerle etkileşirler (Örneğin protein, lipit, DNA vb.). Yüksek reaktivitesi dolayısıyla organik moleküllerin yapısını bozarken çok kısa bir mesafe kat eder ve reaksiyon kafesi içerisinde zararlı etkisini gösterir.  $\cdot\text{OH}$  radikalleri, diğer bazı reaktiflerden farklı olarak reaktif olmayan maddelere enzimatik olarak metabolize edilemezler ve doğrudan serbest radikal gideren mekanizmayla nötralize edilirler.

E vitamini gibi lipitte çözünen, C vitamini gibi de suda çözünen antioksidantlar hücre içinde sınırlı bir dağılım gösterirken, melatonin bu bilinen antioksidantlardan farklı olarak hem sıvı hem de lipid yapıdaki hücre altı yapılara ulaşarak  $\cdot\text{OH}$  radikalının oluşturduğu hasarları engelleyebilir. Melatoninin lipid yapıdaki ortamlarda oldukça yüksek çözünürlük gösterdiği (Costa ve ark., 1997) ve sulu ortamlarda da iyi çözüldüğü belirlenmiştir (Shida ve ark., 1994).



Şekil 5. Moleküler oksijenden meydana gelen serbest radikaller ve toksik bileşikler (Reiter, 2002)

Melatonin tarafından nötralize edilen tek oksijen türevli radikal  $\cdot OH$  radikalidir.  $\cdot OH$  radikallerinin öncüllerinin de melatonin tarafından etkisizleştirildiği bulunmuştur. Hücrede  $H_2O_2$ 'nin enzimatik yolla uzaklaştırılmasında KAT ve GPx enzimleri görev almaktadır. Son bulgularda  $H_2O_2$  ile melatonin arasındaki etkileşim kimyasal olarak saf bir sistemde doğrudan etkileşim ile  $H_2O_2$  düzeyinin azalması mekanizmasına açıklık getirmiştir. Melatonin- $H_2O_2$  etkileşiminin ürünü AFMK'dır (Tan ve ark., 2000, 2001). Melatoninin hücre içinde  $H_2O_2$  ile etkileşip etkileşmediği de araştırılmalıdır (Şekil 6.).



Şekil 6. Saf sistemlerde etkili bir antioksidan olan AFMK'nın oluşum mekanizması (Reiter ve ark., 2002).

Saf kimyasal sistemde melatonin doğrudan  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile reaksiyona girerek AFMK oluşturur. AFMK da etkili bir antioksidant olup melatoninin etkisinin artmasına katkıda bulunmaktadır (Reiter ve ark., 2002).

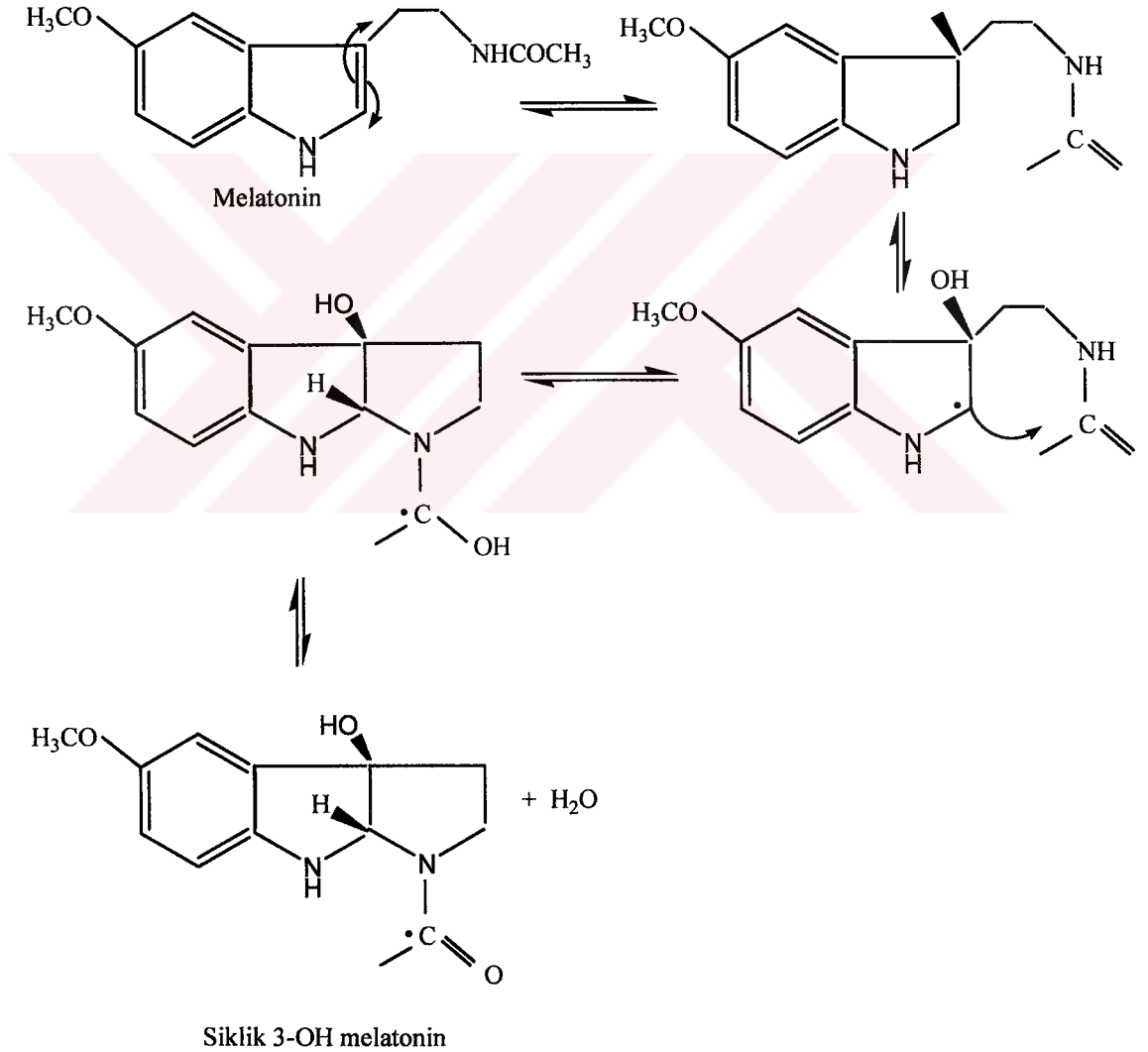
Melatonin ile  $\cdot\text{OH}$  radikali arasındaki etkileşim mekanizması aynı grup tarafından belirlenmiştir (Hardeland ve ark., 1993). Özet olarak, elektronca zengin bir molekül olan melatonin indirgeyici güç olarak davranabilir ve  $\cdot\text{OH}$  radikaline elektron verebilme yeteneğine sahiptir. Nispeten stabil olan ara metabolit melatoninil katyon radikalının en muhtemel reaksiyon metaboliti olduğu düşünülmektedir. Bu tür muhtemelen  $\text{O}_2^{\cdot-}$

radikaline süpürücü etki yapar ve son ürün AFMK'yı oluşturur. Hardeland ve arkadaşları (Hardeland ve ark., 1993) tarafından önerilen reaksiyon mekanizması dolaylı olarak diğer araştırma gruplarının bulduğu sonuçlarla desteklenmiştir (Mahal ve ark., 1999; Scaiano, 1995; Stasica ve ark., 1998). Bu gruplar tarafından melatoninil radikallerinin varlığını destekleyen deliller bulunmuştur. Aslında, melatonin ve hidroksil radikali arasındaki reaksiyonlarda katyon radikallerinin spektrumu ile çeşitli indol türevlerinin indolil tip radikal spektrumları ile benzerdir. Bu tip çalışmalarda spektrofotometrik analizlerin kullanımı radikalleri belirlemede bazı sınırlamalar ortaya çıkarmaktadır. Serbest radikalleri belirlemede, ESR daha güvenilir bir metottur. Ne yazık ki, indolamin ve  $\cdot\text{OH}$  radikali arasındaki etkileşimin sonucu olarak melatoninil katyon radikalının mevcudiyetini kesin olarak gösterebilecek bir çalışma henüz yapılmamıştır. Turjanski ve arkadaşları  $\cdot\text{OH}$  radikaline elektron aktarımı yerine,  $\cdot\text{OH}$  radikalinden indolik hidrojenin çıkarılarak nötral indolil radikalinin oluşumu ve bunun diğer birçok yolla AFMK'ya dönüştürülebileceğini önermişlerdir. Ayrıca,  $\cdot\text{OH}$  radikali melatoninin indol halkasına da nötral bir radikal oluşturmak üzere eklenebilir. Bu nötral radikal o zaman  $\text{O}_2^-$  radikallerini süpürerek AFMK meydana getirir (Turjanski ve ark., 1998).

Tan ve arkadaşları, melatonin ve  $\text{OH}$  radikali arasındaki reaksiyon mekanizmasının daha iyi anlaşılması için yoğun çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Melatoninin  $\cdot\text{OH}$  radikali tarafından oksidasyonu ile ilgili ürünlerini tanımlamışlardır. Hücre ve enzim bulunmayan,  $\cdot\text{OH}$  radikali oluşturan iki reaksiyon sistemi seçmişlerdir. İlki Fenton reaksiyon sistemi ve diğeri de  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin ultraviyole fotolizidir. Kütle spektrometresi (MS), nükleer manyetik rezonans (NMR), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), kullanılarak melatonin  $\cdot\text{OH}$  radikali ve oksidasyonu sırasında oluşan oksidasyon ürünleri tanımlanmıştır. Bu çalışmalar sonucunda melatoninin  $\cdot\text{OH}$  radikali ile etkileşimini açıklayan bir mekanizma önermişlerdir (Tan ve ark., 1998; Şekil 7).

Bu yolda, bir molekül  $\cdot\text{OH}$  radikali melatoninin indol halkasının 3. pozisyonuna eklenerek 3-hidroksimelatonin nötral radikali oluşur. Bu nötral radikal, halkasal 3-hidroksimelatonin radikali oluşturacak molekül içi bir düzenlenmeye uğrar. Halka oluşumu indol halkasının 2. pozisyonu ile yan zincirdeki nitrojen atomu arasında gerçekleşir. Sonuç olarak halkasal 3-hidroksimelatonin'in radikali diğer bir  $\cdot\text{OH}$  radikali ile reaksiyona girerek halkasal 3-hidroksimelatonin ve su molekülü oluşturur. Bu olayda

bir molekül melatoninin iki  $\cdot\text{OH}$  radikalini süpürmektedir (Tan ve ark., 1998). Bu model, triptofan ve  $\cdot\text{OH}$  radikali arasında benzer reaksiyonların meydana geldiğini gösteren çalışmalarla desteklenmiştir (Nakagawa ve ark., 1977; Uchida ve ark., 1990 ). Bu yüzden halkasal 3-hidroksimelatonin ve bir molekül indolaminin 2  $\cdot\text{OH}$  radikalini süpürmesi sonucu meydana gelen ürün, melatoninin  $\cdot\text{OH}$  radikali süpürücü etkisini sağlayan stabil ürünlerden biridir (Tan ve ark., 1998). İndolamin ve  $\cdot\text{OH}$  radikali arasındaki reaksiyon mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır.



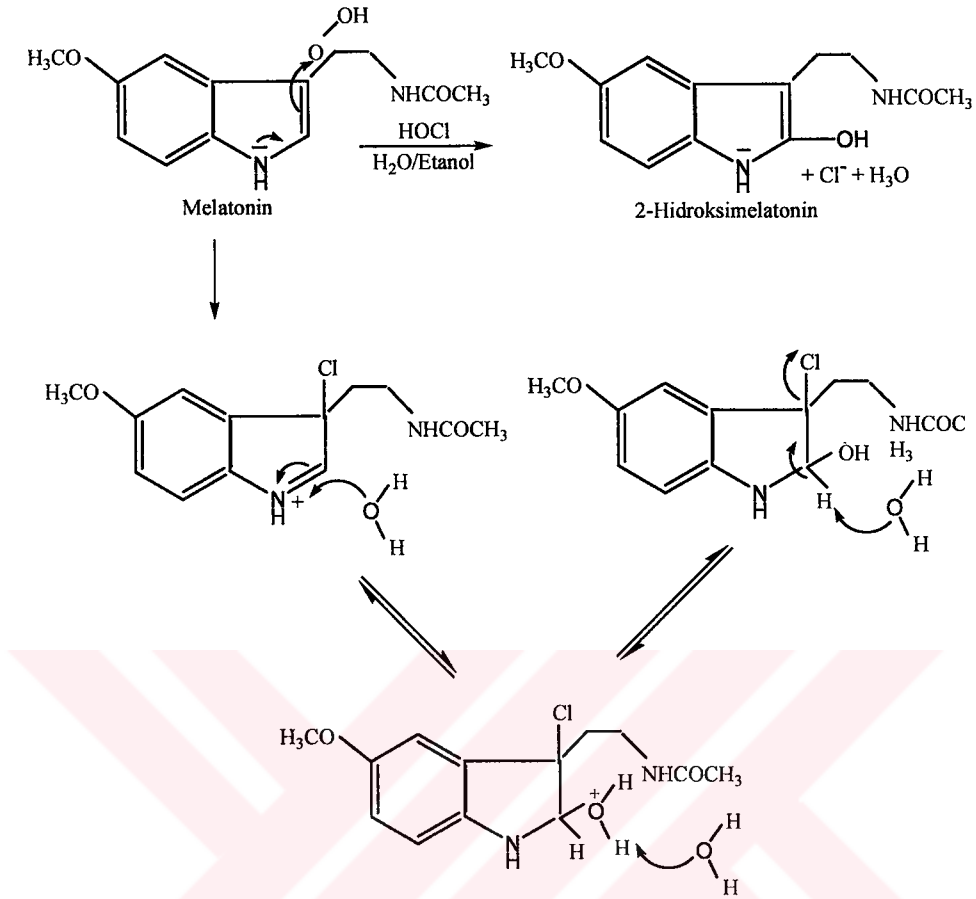
Şekil 7. Melatonin ve hidroksil radikali etkileşim mekanizması (Tan, 1998)

Süperoksit iyonu ( $O_2^{\cdot-}$ ) fagositik hücrelerde solunumsal yanma esnasında oluşabildiği gibi mitokondride oksijen suya indirgenirken tesadüfen de meydana gelebilir. Süperoksit iyonu *in vitro* olarak  $O_2^{\cdot-}$ 'nin elektrokimyasal redüksiyonu, pulse radyolizi, fotokimyasal veya enzim katalizli reaksiyonlarla ve bazı azo-bileşiklerin bozunmasıyla meydana gelebilir. Fizyolojik pH'da,  $\cdot OH$  radikaliyle  $O_2^{\cdot-}$  radikali karşılaştırıldığında,  $O_2^{\cdot-}$  radikalinin sulu çözeltilerde radikal olmayan türler üzerinde oldukça az reaktif olduğu gözlenmiştir (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Melatoninin  $O_2^{\cdot-}$  radikalinin giderilmesinde etkisiz olduğu söylenmektedir (Marshall ve ark., 1996). Bu çalışmalarda  $O_2^{\cdot-}$  radikali hem sitokrom C hem de nitroblue tetrazolyum varlığında hipoksantin/ksantin sistemiyle oluşturulmuştur (Chan & Tank, 1996).

Hidrojen peroksit *in vivo*'da ksantin, urat ve D-aminoasit oksidazları içeren bazı enzim sistemleri tarafından üretilmektedir. Buna ilaveten,  $O_2^{\cdot-}$  radikali oluşturan tüm biyolojik sistemler,  $O_2^{\cdot-}$  radikalinin dismutasyonu ile  $H_2O_2$  meydana getirir. *In vivo*'da  $H_2O_2$  düşük oksidasyon ve redüksiyon yeteneğine sahip bir moleküldür. Bu faktörler  $H_2O_2$ 'ye hücre membranından geçebilme ve oluştuğu bölgeden yayılabilme özelliği kazandırmıştır.  $H_2O_2$  genelde  $Fe^{2+}$  gibi geçiş metal iyonlarının varlığında oldukça az reaktivite gösterir. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları aracılığıyla çok daha fazla reaktif olan  $\cdot OH$  radikaliye dönüştürülür (Halliwell & Gutteridge, 1999).

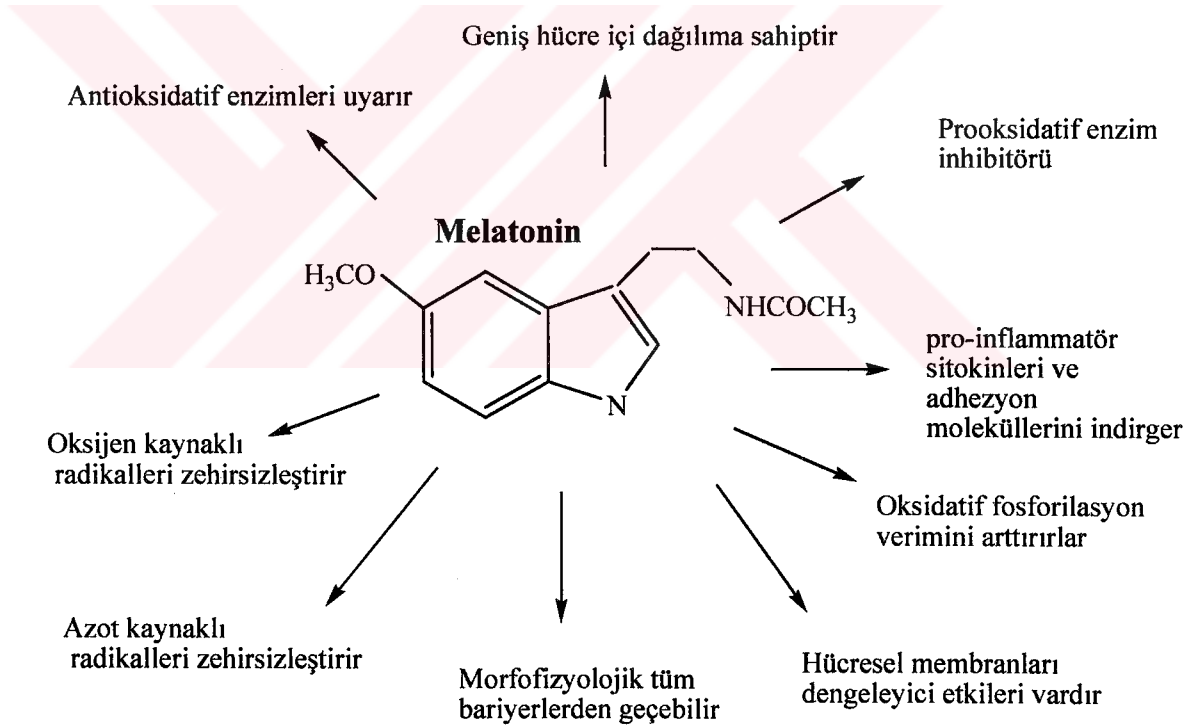
Melatoninin saf bir kimyasal sistemde doza bağımlı olarak  $H_2O_2$  giderilmesinde etkili olduğu görülmüştür (Tan ve ark., 2000). Fenol red/horse radish peroksidaz kullanılarak yapılan çalışmada, indolamin ve  $H_2O_2$  arasındaki reaksiyon ve etkileşim süreci değerlendirilmiştir. Bu reaksiyonda iki faz gözlenmektedir. Hızlı fazda, indolamin ve  $H_2O_2$  arasındaki etkileşim 5s'de dengeye ulaşmaktadır. Yavaş gerçekleşen ikinci faz  $H_2O_2$ 'nin birkaç saatlik periyot içerisinde kademeli bir şekilde azalışı ile karakterize edilmektedir. İndolaminin  $H_2O_2$  tarafından oksidasyon metabolizması tanımlanan ana metabolit temel alınarak tasarlanmıştır. Reaksiyon, indol halkasının oksidatif yıkımına yol açarak MS,  $^1H$ -NMR ve  $^{13}C$ -NMR ile tanımlanan AFMK bileşiği meydana getirir. Araştırmacılar, AFMK'nın dioksetan ara metaboliti ile meydana gelebileceği gibi diollerin hidrolizini takip eden standart alken epoksidasyonu vasıtasıyla da oluşarak AFMK'ya okside edilebileceğini belirtmiştir. Tan ve arkadaşları tarafından önerilen bu mekanizma aşağıda gösterilmektedir (Şekil 8.).



Şekil 8. Melatonin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> etkileşim mekanizması (Tan, 2000)

Singlet oksijen hücreler tarafından üretilen, bilinen en reaktif oksijen türüdür ve makromoleküller için oldukça zararlıdır. Singlet oksijen moleküler oksijenin yüksek enerjili bir formudur ve *in vitro* da bir çok yolla üretilebilir. Singlet oksijen, boyaların ve biyolojik pigmentlerin içinde bulunduğu bir çok substratın fotosensitizasyon reaksiyonlarında çok sık olarak meydana gelir (Halliwell & Gutteridge, 1999). Poeggeler ve arkadaşları, riboflavinin parlak ışıktaki otooksidasyonunda melatonin, singlet oksijen oluşumunu baskıladığını göstermiştir (Poeggeler, 1974). Bu sistemde AFMK reaksiyon ürünü olarak belirlenmiştir fakat herhangi bir mekanizma önerilmemiştir. Melatoninin bu baskılayıcı etkisi Zang ve arkadaşları tarafından kanıtlanmıştır (Zang ve ark., 1998). Melatoninin UV ışınında oluşan singlet oksijenin giderilmesinde etkili olduğu belirlenmiştir (Roberts ve ark., 2000).

Bir çok çalışma grubu tarafından hidroksi radikalleri ve melatonin arasındaki ilişki detaylı bir şekilde çalışılmıştır. Bu büyük ilginin sebebi melatoninin peroksil radikalleriyle etkileşime girerek zincir kırıcı antioksidant özelliği göstermesidir. Melatoninin güçlü bir antioksidant olduğu bilinmektedir. Livrea ve arkadaşları melatoninin biyomimetik lipozomal sistemlerde zincir kırıcı antioksidant davranışlarını analiz etmişlerdir (Livrea ve ark., 1997). Bu çalışmada araştırmacı, peroksidedilemeyen ve peroksidedilebilen lipozomlarla çalışmış ve böylece melatoninin peroksil radikalleriyle ve çift tabaka içindeki zincir taşıyıcı lipid peroksi radikalleriyle etkileşimlerini ayırt edebilmiştir. Bu sistemde indolamin, zincir kırıcı antioksidant olarak etkili olamamıştır.



Şekil 9. Melatoninin ilaç metabolizmasındaki çeşitli koruyucu etkileri (Reiter, 2002)

## 2.8. Nikotin

Nikotin ilk olarak 1809 yılında tütün özütünden distile edilmiştir. Ondokuz yıl sonra Posselt ve Reinmann tarafından tütünden saf olarak ayrıştırılarak izole edilmiştir. Nikotin, 3-(1-metil-2-pirolidinil) piridin olarak isimlendirilmektedir. İlk olarak ülser ve kabızlığın tedavisinde ilaç olarak kullanılmıştır. Fakat günümüzdeki genel kabul nikotinin vücudumuz üzerinde zararlı etkilerinin olduğudur (Pailer, 1964).

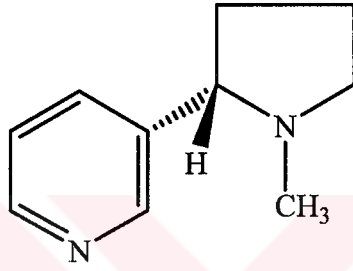
Nikotin, sigara dumanında bulunan spesifik bileşenlerden biridir ve sigara bağımlılığına neden olan başlıca bileşiktir. Nikotin, sigara kullanımı sırasında vücuda alınmaktadır. Nikotin çoğunlukla akciğerler tarafından emilir. Solunum yoluyla beyine 10-15 saniyede ulaşır. Sigara dumanında 4000'den fazla kimyasal bileşik ve radikal türler bulunmaktadır.

Tütün kullanımının hızlı bir şekilde yaygınlaşmasını teşvik eden iki faktör vardır. Bunların ilki uygulama şeklinin kolaylığı ikincisi ise merkezi sinir sistemi üzerine etkilerinin hızlı bir şekilde ortaya çıkmasıdır. Bu etkiler solunum yoluyla alınan nikotinin dozu ve bireysel absorpsiyon oranına bağlı olarak merkezi sinir sisteminin uyarılması, sakinleşme ve her iki etkinin birlikte görülmesi olarak görülür. Fakat bu rahatlatıcı duygular nikotinin sigara kullanan bireyler üzerindeki baskılayıcı etkisini ortadan kaldırmamaktadır. Nikotin ganglion hücrelerinin oluşturduğu uyarıları önce teşvik eder ve daha ileriki aşamalarda ise bunları engellemektedir (Mandelzys & Cooper, 1992). Nikotin kalp ve adrenal medula gibi bazı farklı organlar üzerine de dolaylı etkileri olmaktadır. Ayrıca nikotin kotinine metabolize olarak zararlı N-nitrozaminlerin oluşumunda artışa neden olmaktadır (Hoffmann & Brunnemann, 1983).

Nikotin, bitkilerde bulunan alkaloid yapıda bir bileşiktir. Alkaloidler bitkilerde doğal olarak meydana gelen nitrojen içeren ve insanlarda farmakolojik etkilere sahip komplekslerdir.

İnsanlar ve laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan birçok çalışma yaşın ilaç metabolizmasındaki kompleks etkileri üzerine yoğunlaşmıştır (Vestal ve ark., 1977; Gillette, 1979; Schmucker & Wang, 1980; Kamataki ve ark., 1985; Greenblatt ve ark., 1986) ve bu konu oldukça iyi gözden geçirilmiştir (Durnas ve ark., 1990). Yaşın artmasıyla karaciğer, böbrek ve kalp gibi organların fizyolojik fonksiyonları azalmakta özellikle ilaçların yok edilmesinde kritik noktaya yaklaşmaktadır. Yaşın karaciğer ilaç metabolizmasına etkisi substrat ve türe özgü ve faz II glukuronidasyon reaksiyonunu

katalize eden enzimlerden sitokrom P450 izozimleri ve UDP-glukuronosil transferazlarda, nitel ve nicel artışa neden olmaktadır (Rikans ve Notley, 1982a; Chengelis, 1988 a,b; Miners & Mackenzie, 1991; Imaoka ve ark., 1991). Spesifik P450 izozimlerinin fenobarbital ve  $\beta$ -naftoflavon gibi klasik indüserler tarafından indüksiyon miktarı yaşa bağlı bu indüserlerin farklı indüksiyonları dolayısıyla da değişkenlik göstermektedirler (Rikans & Notley, 1981, 1982b; Sun ve ark., 1986; Okey, 1990). En çok gözlenen etki seçilen sitokrom P450 izoziminin teşvik edilebilirliğinin yaşa bağlı düşüşüdür.



Şekil 10. Nikotinin kimyasal yapısı

### 2.8.1. Yaşa Bağlı Nikotin Metabolizmasındaki Değişiklikler

İnsanlar üzerinde yapılan çalışmaların çoğunda denek olarak yetişkinler kullanılmıştır (Kyerematen ve ark., 1990a; Curvall ve ark., 1990; Bryd ve ark., 1992; Benowitz & Jacob, 1993). Bundan dolayı, insan gelişiminde nikotin metabolizmasındaki değişimlerle ilgili bilgiler oldukça yetersizdir. Bu konu üzerinde yapılan bazı çalışmalarda nikotinin biyotransformasyonun gelişimin erken dönemlerinden itibaren arttığı, erişkinlikte platoya ulaşmış ve yaşamın geri kalan kısmında da bir düşüş gösterdiği belirlenmiştir (Kelin & Gorrod, 1978; Hibberd ve ark., 1981).

Bazı ksenobiyotik metabolizmalara sahip olan insan fetüsü sigara içen anneden veya sigara içmeyen annenin çevresel sigara dumanını teneffüs etmesiyle nikotine maruz kalmaktadır. İnsanda fetal karaciğer, ölçülebilir nikotin metabolize edici aktivite göstermektedir (Hibbert ve ark., 1981). Yeni doğan bebeklerden alınan idrar örneklerinde nikotin analizi yapılarak annenin sigara kullanımı, çevresel sigara dumanına maruz kalma veya her ikisinden ortaya çıkan nikotine maruz kalma

durumunu belirlenebilmektedir (Etzet ve ark., 1985). İdrardaki kotinin konsantrasyonu kreatin konsantrasyonu ile karşılaştırarak standartize edilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda kotininin sigara içen anneden çocuğa geçtiğini göstermiştir. Bununla birlikte bu çalışma kotininin neonatal metabolizma aracılığıyla mı yoksa anneden mi köken aldığı açıklanamamıştır.

Nikotin metabolizması çalışmalarında ihmal edilen grup bluğ çağındaki çocuklardır. Bu grup hızla büyüyen tiryakiler grubudur (Pierce ve ark., 1989). İsveç ve ABD`de 13 yaşındaki tiryakilerin oranı % 2-5 arasında değişiklik gösterirken bu oran Avustralya ve Uruguay`da % 30`u bulmaktadır (Masironi & Roy, 1982). Fakat nikotin metabolizması çalışmaları özellikle erişkinlerde sürdürülmektedir. Bluğ çağındaki çocuklar üzerinde henüz bir çalışma gösterilmemiştir.

Yapılan çalışmalarda, 55 yaş ve üzeri tiryakilerde gençlere oranla NNX`e göre daha fazla kotinin salgılandığı belirlenmiştir bu çalışmalarda günlük 15 ve ya daha az sigara kullananlar hafif içiciler 40 veya daha fazla sayıda sigara tüketen bireyler ağır içiciler olarak gruplandırılmıştır. Sonuçta nikotinin kotinine C-oksidasyonunun selektif azalışı nedeniyle, kotinin salgılanmasının yaşla birlikte azaldığı görülmüştür (Klein & Gorrod, 1978). Kotinin oluşumundaki bu azalmanın özel nedeni belirlemek için daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Kotinin oluşumundaki azalma kotinin öncülüğü olan NIM konsantrasyonunda bir artışa neden olabilir. NIM mikrozomal proteinlerle bileşikler oluşturabilmektedir (Obach & Van Vunakis, 1988). Yaşın insandaki nikotin metabolizması yolları üzerine nasıl etki ettiği ile ilgili bilgiler eksiktir ve bu eksiklik çalışmalara önem kazandırmaktadır.

İnsanlarda olduğu gibi laboratuvar hayvanlarında da yaşa bağlı nikotin biyotransformasyonundaki potansiyel değişimler için kapsamlı çalışma gerçekleştirilmemiştir. Nikotinin yaşa bağlı değişimiyle ilgili fareler üzerinde yapılan çalışmada *in vitro*`da sadece eser miktarda kotinin ve ilgili metabolitlerin fetal karaciğer tarafından oluşturulduğu gözlenmiştir (Stalhandske ve ark., 1969). Bir haftalık fare karaciğerinde erişkin kapasitesinin % 25`i kadar kotinin, % 40`ı kadar da diğer metabolitler üretilmektedir. İki haftalık olduğunda fare karaciğeri ergin bireyin karaciğerinde bulunan tüm metabolitleri üretebilmektedir fakat bu düşük düzeylerde olmaktadır. Dördüncü haftada kotinin oluşumu yetişkinlerdeki düzeye ulaşır. Fetal metabolizma üzerinde yapılan diğer çalışmalar primatlar (Suzuki ve ark., 1974) ve

fareler (Tjälve ve ark., 1968) üzerinde annelere intravenöz radyoaktif işaretli nikotin uygulanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Fetal fare dokularındaki nikotin ve kotinin konsantrasyonları nikotin uygulanmasını takiben farklı zamanlarda belirlenmiştir. Bu anneden köken alan nikotin ve metabolitlerin düşük seviyede bulunduğunu göstermektedir. Bunlar plesenta tarafından elimine edilir ve hiçbir metabolitin fetüs tarafından oluşturulmadığı görülür. Rhesus maymunlarında anne fetusuna nikotin uygulanması sonrası çoklu kan örnekleri sağlamak amacıyla intravenüs kateterler yerleştirilmiştir. Sonuçlar fetal karaciğerin nikotin detoksifikasyonunda etkili olmadığını göstermiştir. Anneye uygulanan nikotinin büyük bir bölümü fetüse ulaşmaz, fetüse ulaşan çoğu metabolize edilmemiş nikotin plasenta tarafından salınmaktadır.

Nikotin metabolizmasının yaşa bağlı değişkenliği bazı pratik karışıklıklar içermektedir ve ileriye dönük çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. *In vitro* veriler insan metabolizmasının *in vivo*'da nikotini metabolize ederek reaktif metabolitler üretebileceğini göstermektedir. Bluğ çağındaki sigara kullanıcıları hızla büyüyen bir gruptur fakat henüz yeterli araştırmaya konu olmamıştır ve nikotin metabolizması şekli erişkinlere göre farklı olabilir. Ellili yaşlar sonrası oksidatif yolla nikotin metabolizmasının hızı yavaşlamaktadır. Bu, potansiyel olarak sigara içenlerde nikotin toksitesini artırmaktadır. Ayrıca, nikotin metabolitlerinin glukuronidasyonunun şekli ve hızında yaşa bağlı olarak çalışılmaya değer değişiklikler meydana gelebilir.

Nikotin metabolizmasında yaşa bağlı değişimler ile ilgili çalışmalarda deneklerin seçimi de göz önüne alınmalıdır. Bu çalışmalarda, yaşa bağlı değişkenliğin şiddetini azaltmak için, denekleri mümkün olduğunca yakın yaşta seçmek ve elli beş yaşından aşağıda olanları tercih etmek tavsiye edilmektedir. Eğer değişken olarak yaşın etkisi ele alınacaksa o zaman farklı yaş gruplarına ihtiyaç duyulur.

### **2.8.2. Gıda Hammaddelerindeki Nikotin**

Bazı besinsel kimyasalların, spesifik sitokrom P450 enzimlerinin etkinliğini değiştirdiğini gösteren mekanizmalar bulunmuştur. Fakat mikro ve makro besin maddelerinin bu gibi etkilerinin mekanizmaları oldukça iyi anlaşılmış durumda değildir. Bununla birlikte, spesifik besinler, bir ilaçtan diğerine değişen metabolik etkiler gösterebilirler (Yang ve ark., 1992). Eş kalorili besinlerde protein ve karbonhidratların nispi oranı, birçok ksenobiyotik maddenin oksidatif metabolizma hızını etkilemektedir.

Teofilin (Alvares ve ark., 1976; Feldman ve ark., 1982), antipirine (Kapas ve ark., 1976) ve propranonol (Fagan ve ark., 1987)'un faz I metabolizmasını protein oranındaki artış hızlandırırken, karbonhidrat oranındaki artış yavaşlatmaktadır. Laboratuvar hayvanlarında, yüksek proteinli besinlerin hepatik sitokrom P450 içeriğine teşvik edici etkisi barbituratlarınkine benzerlik göstermektedir (Argyris, 1971; Hartshorn ve ark., 1979). Yüksek karbonhidrat içeriğine sahip besinlerin oksidatif metabolizma üzerinde geciktirici etkisi simetidininkine benzerlik göstermektedir. Gerçi yavaşlayan metabolizma farklı mekanizmalarla ortaya çıkmaktadır (Anderson, 1988).

Eş kalorili besinlerin makro moleküler yapılarındaki değişimlerin faz II metabolik reaksiyonlarına etkileri tam olarak saptanamamıştır. Bir çalışmada, yüksek karbonhidrat ve düşük protein içeren bir besin, glukuronidasyon hızını artırmıştır (Pantuck ve ark., 1991). Yüksek protein içeren besinlerle, yüksek karbonhidrat içeren besinlerin değişimi diğer metabolik yollarda harcanan asetaminofen glukuronid ve oksazepam glukuronid'in idrarda geri kazanımını artırır, bu yüzden net bir metabolik temizlenme gözlenmemiştir.

Normal yetişkin erkeklerde, yüksek proteinli yiyecekler nikotin metabolizmasını artırmaktadır (Lee ve ark., 1989). Denekler 150 dakika boyunca 0.35µg/kg/dak. nikotinbitartaratın sabit infüzyonunu takiben 2.5 µg/kg/dak. doz nikotinbitartarat almıştır. Nikotin uygulaması başladıktan 90 dakika sonra yüksek protein içerikli yiyecekler tüketilmiştir. Yemek sonrası plazma nikotin konsantrasyonunun düşmesi, nikotin metabolizmasındaki yükselmeye işaret etmektedir. Bu değişim kontrol deneklerinde meydana gelmemiştir (Lee ve ark.,1989). Nikotin metabolizmasına diğer besin maddelerinin etkilerini belirlemek için yeni çalışmalar gerçekleştirilmelidir. Besin maddeleri olarak, sebzeler (kurusifer) ve metilksantinlerin sindirimi kadar ızgara et ürünlerinin de etkileri gözlenebilir (Anderson, 1988).

Nikotin metabolizması ve besinsel faktörlerle ilgili çalışmalarda diğer bir faktör besinlerdeki nikotin mevcudiyetidir. Nikotin, domates, patates, patlıcan gibi sebzeler ve çayda tespit edilmiştir (Castro & Monji, 1986; Sheen, 1988; Davis ve ark., 1991; Domino ve ark., 1993). Bu besinler metabolik çalışmalarda denek olan bireyler tarafından besin yoluyla alınmış olabilir. Bu ihtimal, nikotin dağılımı çalışmalarında besinle ilgili ana faktörlerin belirlenmesi kontrolündeki ihtiyacı gösteren diğer bir örneği göstermektedir (Idle, 1990).

### 2.8.3. Nikotin Metabolizmasındaki Tür Varyasyonlarının *in vitro* Çalışmaları

Genelde, nikotin metabolizmasındaki türler arasındaki farklılıkları belirlemek için yapılan *in vitro* çalışmalar genelde nicel belirlemeden ziyade niteldir. Bazı türlerin karaciğerinden hazırlanan 10000 g süpernatant preparasyonlarında yapılan çalışmalar, nikotinin kobaylar, tavşanlar ve hamsterlarda çok hızlı, farelerde az ve ratlarda da çok az metabolize edildiğini göstermiştir (Jenner ve ark., 1971,1973; Jenner & Gorrod, 1973).

Benzer sonuçlar, insanlardan ve diğer dört türden elde edilen hepatositlerin rasemik-<sup>14</sup>C-işaretli nikotinle inkübasyonunu takiben elde edilmiştir (Kyerematen ve ark., 1990b). İnsan hepatositleri ratlardaki gibi düşük nikotin metabolizması aktivitesi göstermiştir.

Nikotin toksisitesiyle ilgili türler arası farklılık, türler arasındaki nikotin metabolizmasındaki hız farklılıklarından kaynaklanabilir. Örneğin, Rhesus maymunları nikotin etkisiyle oluşan gastrointestinal kasılmaya, köpeklerden 5-10 kat daha dirençlidir. Her iki türün karaciğer mikrozomal preparasyonları H<sup>3</sup>-nikotin ile inkübe edildiğinde primatların köpeklere kıyasla nikotin metabolizmaları her protein gramı başına % 30 daha hızlıdır (Dohi ve ark., 1973).

Bazı *in vitro* çalışmalar nikotin metabolizmasındaki belli yolların türe özgü olduğunu göstermiştir. Örneğin, nikotin enantiyomerlerinin N-metilasyonu geniş tür varyasyonları göstermektedir (Crooks & Godin, 1988). Daha önceki çalışmalar köpeklerde N-metil nikotinyumun (-)- nikotin metabolizmasındaki başlıca metabolit olduğunu göstermiştir (McKennis ve ark., 1963). Oysa rat karaciğerinin sitosölü her iki nikotin izomerini de metilleyemez ve kobay sitosölü (+)-R-izomeri için mutlak özgüllük göstermektedir. Bu sonuçlar, *in vivo* çalışmalarda elde edilen verilerle tutarlılık göstermektedir (Cundy ve ark., 1985; Nwosu ve ark., 1988). İnsan karaciğer sitosölü N-metil nikotinyum iyonunun her iki enantiyomerini N-metiller fakat R-izomeri daha iyi bir substrattır (Crooks & Godin, 1988). Bu metabolik yol önemli ipuçlarına sahiptir. Çünkü N-metil nikotinyum iyonu farmakolojik olarak aktiftir.(Euler & Persson, 1970; Hedqvist, 1970; Bhattacharya, 1968). Ve nikotinin toksikolojik etkisinde önemli rol oynayabilir.

#### 2.8.4. Nikotin Metabolizmasındaki Tür Varyasyonları Üzerine *in vivo* Çalışmalar

*In vivo* çalışmalar nikotin biyotransformasyonunun nicel değerlendirmelerini yapmamıza izin vermektedir. Çünkü bireysel nikotin metaboliklerini tanımlama ve miktarını idrardan belirleme şansına sahip oluruz. (-)-S-<sup>3</sup>H-timidin metabolizmasında bu maddenin intraperitoneal enjeksiyonu sonucunda türe bağlı farklılıklar meydana gelmektedir (Nwosu & Crooks, 1988). 24. saat idrar örneklerinde tespit edilen radyoaktivite tavşanlarda en yüksek (% 92), hamsterlarda (% 78), kobaylarda (% 68) ve en düşük olarak ratlarda (% 55) gözlenmiştir. Kobaylarda, 3-hidroksikotinin, kotinin, NNX ve iki tane belirlenememiş madde idrar örneklerinde belirlenmiştir oysa hamster'lar kotinin veya NNX, tavşanlar NNX salgılamazlar. Ratlar hariç tüm türlerin idrarında primer metabolit 3-hidroksikotininin, ratlarda kotinindir (Nwosu & Crooks, 1988).

Nikotin metabolizmasının glukuronidasyon yolunda tür farklılıkları da gözlenmiştir. İnsanlarda glukuronidasyona uğramış metabolitler, idrar metabolitlerinin % 30'u kadar hesaplanmıştır (Byrd ve ark., 1992; Curvall ve ark., 1991). Benzer sonuçlar maymunlar üzerine yapılan çalışmalar sonucunda da elde edilmiştir (Seaton ark., 1991). Hamsterlarda, nikotin metabolitlerinin idrara salınımı üzerine yapılan çalışmalarda konjugasyonun asıl yol olduğu önerilmiştir fakat bu sonuç ratlar için geçerli değildir. Ratlarda glukuronidasyon nadir görülmektedir (Rustemeier ve ark., 1993; Seaton ve ark., 1993).

Nikotin metabolizmasında elde edilen sonuçlar geniş tür varyasyonları göstermektedir. Bu yüzden bir tür için elde edilen sonuçlarla diğer tür üzerinde yorum yapmak uygun olmamaktadır. Tek tür içerisinde bile genetik ve suş farklılıklarının bulunması, çalışmalar arası yorumların yararsızlığını gösterir. Bu değişkenler kontrol altına alınmadığı sürece farklı türler üzerinde gerçekleştirilen *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar genel nikotin metabolizması profiline yeni anlayış sağlamıştır. Bu tip çalışmalarda, nikotin metabolizmasıyla ilgili bilinen ve önerilen yollardan oluşturulan bir çerçeve oluşturulmuştur (Kyerematen & Vesell, 1991).

Nikotin metabolizmasında genetik varyasyonların varlığı laboratuvar hayvanlarında da gözlenmiştir. Rat suşları doğuştan tek tip mikrozomal ilaç metabolize edici aktivite profili göstermektedir (Koster ve ark., 1989). Ve bu sonuçlarla tutarlı olarak , idrardaki nikotin metabolitlerinin profili 4 farklı rat suşunda farklılık gösterir (Garg, 1969). Ek

olarak, 3 inbred fare suşuna tek doz intraperitoneal nikotin uygulanması sonrası, genotipik farklılıklar plazma kotinin konsantrasyonları gibi nikotin dağılımı hacmindeki türler arası varyasyonların 2 kat artışından sorumludur (Petersen ve ark., 1984). Aynı çalışmada, NNX konsantrasyonunda suşlar arası varyasyonda 2 kat farklılık gösterir.



### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarda kullanılan analitik saflıktaki maddeler;  $H_2O_2$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $Na_2HPO_4$ ,  $CuSO_4$ ,  $NaOH$ ,  $Na_2CO_3$  Merck-Deutschland firmasından, Ksantin, Ksantin oksidaz, sitokrom C, SOD, Folin fenol çözeltisi, Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), Bovin serum albumini (BSA) Sigma-London-ENGLAND firmasından, Na-K tartarat Pancreac-Mantplet S Esteban SA-Barcelona-SPAIN firmasından, Nikotin dihidrat ditartarat ve melatonin Acros Organics-BELGIUM firmasından sağlanmıştır.

#### 3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada, işlem görmemiş kontrol, nikotin, melatonin, nikotin ve melatonin verilmiş 4 grup oluşturularak çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Her grup için 3 fare kullanılmıştır.

Farelerin enjeksiyonu 18:00`da gerçekleştirilip enjeksiyon işlemi takip eden 2., 4., 8., 12., 24. saatlerde fareler servikal dislokasyonla öldürülerek gerekli deneysel işlemler gerçekleştirilmiştir.

Aynı jenerasyondan olmasına özen gösterilerek kullanılan fareler 25-35 gr. ağırlıkta olup enjeksiyondan önceki 24 saat aç bırakıldı.

#### 3.3. Deney Hayvanları

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Yetiştirme Laboratuvarında yetiştirilen Swiss albino deney hayvanları kullanılmıştır. Deney hayvanları, hava sirkülasyonu olan ısıtma sistemli laboratuvarda (25°C) Samsun Yem Fabrikasında üretilen standart fare yemi kullanılarak beslenmiştir. Su, serbest olarak verilmiştir.

#### 3.4. Deneklere Uygulanan Maddeler

Çalışmada kullanılan maddeler Acros Organics firmasından sağlanmıştır. Melatonin bidistile su ile seyreltilmeden önce etanolde çözülmüştür. Melatonin çözeltisi içerisindeki etanol`ün son konsantrasyonu <1 olacak şekilde hazırlanarak farelerin vücut ağırlıklarına göre enjekte edilecek miktar 0,1cc/25gr. olacak şekilde melatoninin

günlük dozu olan 10mg/kg madde intraperitoneal yolla farelere enjekte edilmiştir (Reiter, 1997b). Aynı şekilde nikotin de LD50 dozu olan 3mg/kg madde bidistile su içerisinde çözülerek melatonininden 30 dakika önce enjekte edilmiştir (Zbinden & Flury-Roversi, 1981).

### 3.5. Çalışmada Kullanılan Aletler

OMÜ Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında bulunan;

SİGMA Laboratory Cetrifuges 3K30  
 SANYO Soniprep 150 (MSE) Sonikatör  
 Ultra-Turrax T-25 homojenizatör  
 Jenway 6105 UV-VIS spektrofotometre  
 Jenway 3010 pH metre  
 Fissons vorteks cihazı  
 Chiltern Hotplate Magnetic Stirrer HS 31  
 SANYO Ultra Low derin dondurucu kullanılmıştır.  
 Avery Berkel model terazi

### 3.6. Deneysel Çalışmalar

Fareler servikal dislokasyonla öldürüldükten sonra karaciğere serum fizyolojik kullanılarak perfüzyon işlemi gerçekleştirilmiş ve karaciğerler alınarak soğuk tampon içerisinde yıkanıp süzgeç kağıdında kurutulduktan sonra tartılarak 0.25'lik sükröz içerisinde alınarak deneysel aşamalara geçene kadar derin dondurucuda saklanmıştır.

Derin dondurucuda saklanan karaciğerler buz içerisinde alınarak 800 rpm'de 20sn'lık periyotlarla 3 kez tekrarlanarak homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sonrası elde edilen örnekler 1,5 dak. 30 sn.'lık periyotlarla sonikasyona tabi tutulmuştur. Sonikasyon sonrasında elde edilen homojenatlar 15000 rpm'de 30 dak. Santrifüj edilmiştir. Satrifüj sonrası süper natantta protein tayini (Lowry, 1951), SOD (Flohé & Ötting, 1984) ve KAT (Aebi, 1984) enzimlerinin aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir.

### 3.7. Enzim Aktivitelerinin Tayini

#### 3.7.1. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Tayini

SOD enziminin aktivitesi L. Flohé ve F. Ötting (1984)'in belirlediği metoda göre belirlenmiştir. Bu metotta enzim aktivitesi pH 7,8 ve 25°C'de süperoksit radikali etkisiyle sitokrom c'nin indirgenmesiyle meydana gelen  $O_2^-$  radikalini oluşturan ksantin-ksantin oksidaz oluşumu sonucunda gözlemlendi. Burada enzim aktivitesi değişik konsantrasyonlarda SOD enzimiyle hazırlanan standart grafikten yararlanarak belirlendi.

Reaktifler;

Reaktif çözeltiler A çözeltisi ve B çözeltisi olarak hazırlandı.

A çözeltisi; 0,76 mg (5 $\mu$ mol) ksantin 10 mL 0,001N sodyum hidroksit ve 24.8 mg (2 $\mu$ mol) sitokrom c pH 7.8 100mL 50mM 0,1 mM EDTA içeren fosfat tamponu ile karıştırılarak hazırlanır. Bu çözelti 4°C'de üç gün kararlıdır.

B çözeltisi; 0,1mM EDTA içerisinde yeni hazırlanmış ksantin oksidaz çözeltisi,  $\cong$ 0,2 U/mL'dir.

Not: Ksantin oksidaz aktivitesi değişken olabilir, bunun önüne geçebilmek için SOD kullanılmayan testlerde sitokrom c inhibisyon hızını 0,025 absorbansa ünitesi/ dakika olacak şekilde yeterli miktarda enzim eklenmelidir.

Yöntem;

1 ünite SOD belirtilen koşullar altında cyt c inhibisyon hızını %50 baskılayan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Bu miktarın belirlenmesi için farklı konsantrasyonlarda enzim çözeltileri kullanılır.

B çözeltisi buzda, A çözeltisi 25°C'de muhafaza edilir. Spektrofotometre 550nm dalga boyuna ayarlanır. 3 mL'lik küvetler kullanılır.

1. 3 mL'lik küvet içerisine 2,9 mL A çözeltisi pipetlenir.
2. Kör için 50 $\mu$ L Deiyonize su, standartlar için SOD ve örnekler için homojenat pipetlenir.
3. 50 $\mu$ L B çözeltisi ile reaksiyon başlatılır.
4. Karıştırıldıktan sonra 550nm'deki absorbans değişimi kaydedilir.
5. Kalibrasyon grafiğine göre enzim aktivitesi değerlendirilir.

SOD'un bir ünitesi, ksantin/ksantin oksidaz sistemi tarafından meydana getirilen süperoksit anyonu ile sitokrom C'nin redüksiyonunun %50 inhibisyonu için geçerli enzim miktarı olarak belirlenir. 550 nm'de spektrofotometrik olarak izlenir.

### 3.7.2. Katalaz Aktivitesinin Tayini

Katalaz enziminin aktivitesi Hugo Aebi (1984)'nin geliştirdiği metoda göre gerçekleştirilmiştir. Bu metotta KAT enziminin aktivitesi, pH 7.0 ve 25°C'de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tüketilmesi sonucunda meydana gelen absorbans değişimlerinin gözlenmesiyle belirlenmiştir.

Çözeltiler;

50mM fosfat tamponu pH 7.0; (a) 6,81 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (b) 8,90 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O distile su içerisinde çözülür ve herbiri 1000mL'ye tamamlanır. Daha sonra (a) ve (b) 1/1.5 (v/v) oranında karıştırılır.

30mM hidrojen peroksit; 0,34 mL %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 mL fosfat tamponu ile seyreltilir.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ultraviyole aralıkta azalan dalga boylarına karşılık sürekli artış gösteren absorpsiyon göstermektedir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin parçalanması 240nm'de absorbansta düşüş gözlenmesine neden olur. Bu birin zamandaki değişim ( $\Delta A_{240}$ ) KAT aktivitesinin ölçütüdür.

Aktivitenin ölçümü sırasında enzim inaktivasyonu veya O<sub>2</sub>'nin serbest kalmasından kaynaklanan küvette hava kabarcıklarının oluşumunu engellemek için nispeten düşük konsantrasyonda (10mM) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanmamız gerekmektedir.

Katalaz karaciğer ve böbrek gibi dokularda nispeten yüksek aktiviteye sahiptir. Tüm organellerin lizisi gerçekleştirilerek uygun bir çözelti veya ekstrakt elde edilirse katalaz aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlenebilir. Stok homojenatları hazırlanırken mutlaka deterjan kullanılmalıdır (örneğin; %1 Triton X-100, 1+9 veya 1+19), aksi takdirde çok düşük değerlerle sonuçlanacaktır. Daha ileri seyreltmeler pH 7.0 fosfat tamponuyla yapılabilir (dokuya bağlı olarak 1/100'den 1/500'e kadar). Eğer örnekler organellerin lizisi sonrasında bu şekilde seyreltilmezlerse Triton-X-100'ün dikkate değer UV absorpsiyonu dikkate alınmalıdır.

**Yöntem;**

1) Kör, 2.99 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 0.01 mL deiyonize su ile hazırlanır. Örnekler için 1.00 mL fosfat tamponu, 1.99 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 0.01 mL hemolizat ilave edilir ve köre karşı okuma yapılır.

2) Spektrofotometrenin dalga boyu 240nm`ye ayarlanır ve örneklerin son hacmi 3mL olacak şekilde hazırlık yapılır. 2.00 mL enzim çözeltisi veya hemolizat ve 1.00 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren örneklerin substrat yerine 1.00 mL fosfat tamponu ve 2.00 mL enzim çözeltisi veya hemolizat içeren kör`e karşı 20°C`de okumaları yapılır. Reaksiyon, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilavesi ile başlatılır. Başlangıç absorbansı yaklaşık olarak A=0.500 olmalıdır. İyice karıştırılır ve absorbansdaki düşüş 30 saniyede bir kaydedilir.



## 4. BULGULAR

Nikotin ve melatoninin ayrı ayrı ve birlikte radikal süpürücü enzim aktivitelerine etkilerini belirleyebilmek amacıyla, kontrol grubu (K), nikotin enjekte edilen grup (N), melatonin enjekte edilen grup (M) ve nikotin ve melatoninin birlikte enjekte edildiği grup (N+M) olmak üzere 4 grup oluşturuldu. Aktivite değişimleri hiçbir işlem uygulanmayan kontrol grubuna göre değerlendirilmiştir.

### 4.1. Nikotin ve Melatonin Etkisiyle Süperoksit Dismutaz Enzimi Aktivitesinde Gözlenen Değişimler

#### 4.1.1. Nikotinin Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Üzerine Etkileri

SOD aktivitesi kontrol gruplarına göre genelde artış eğiliminde olduğu, saatler arasında yapılan karşılaştırma sonucunda belirlenmiş olup enjeksiyonu izleyen 24. saatte en yüksek değerine ulaşmıştır.

Nikotin verilen grupta enjeksiyonu izleyen 2. saatte kontrol grubuna göre SOD aktivitesi %78 oranında artış gözlenirken 4. saatte önemli bir düşüş gözlenmiş ve nikotin enjeksiyonu yapılan gruptaki en düşük değer 4. saatte kaydedilmiş olup kontrole göre SOD aktivitesinde %33 inhibisyon gözlenmiştir. 8. saatte aktivite yeniden yükselerek kontrole göre SOD aktivitesinde %78 oranında bir aktivasyon gözlenmiştir. 12. saate aktivitede kontrole göre %6'lük bir inhibisyon gözlenmiş ve 24. saatte SOD aktivitesi kontrole oranla %228 oranında bir artış göstererek gruptaki en yüksek değer gözlenmesine neden olmuştur (Tablo 4; Şekil 11.).

#### 4.1.2. Melatoninin Süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine etkileri

Melatonin etkisiyle SOD aktivitesinde başlangıçta önemli bir değişim (<math><5\%</math>) gözlenmemesine rağmen 4. saatte başlayan inhibisyon azalarak 12. saate kadar devam etmiş ve 12. saatten sonra başlayan aktivasyon 24. saatte kontrole oranla %160'lik bir artış göstermiştir. Bu grupta 4. saatte maksimum inhibisyon kontrole oranla %44 olarak gözlemlenmiştir (Tablo 4; Şekil 12).

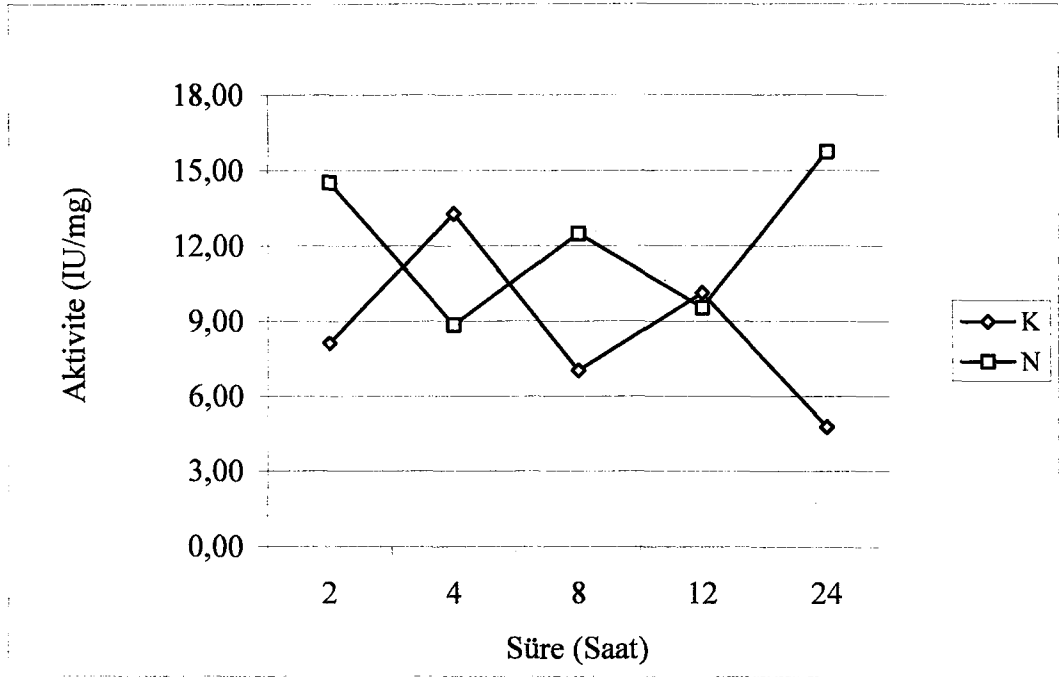
#### 4.1.3. Nikotin ve Melatoninin Süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine etkileri

Nikotin ve Melatonin verilen grupta diğer gruplara oranla SOD aktivitesi yüksek gözlenmiştir. Enjeksiyonu takip eden 8. saatte kontrole oranla SOD aktivitesi %192'lik bir aktivasyon göstererek en yüksek aktivasyon değerine ulaşmıştır. 8. saatten sonra başlayan inhibisyon 12. saatte SOD aktivitesinde %41'lik bir aktivasyon gözlenmesine sebep olmuştur. 24. saatte SOD aktivitesinde kontrole oranla %149'lük bir aktivasyon gözlenmiştir (Tablo 4; Şekil 14).

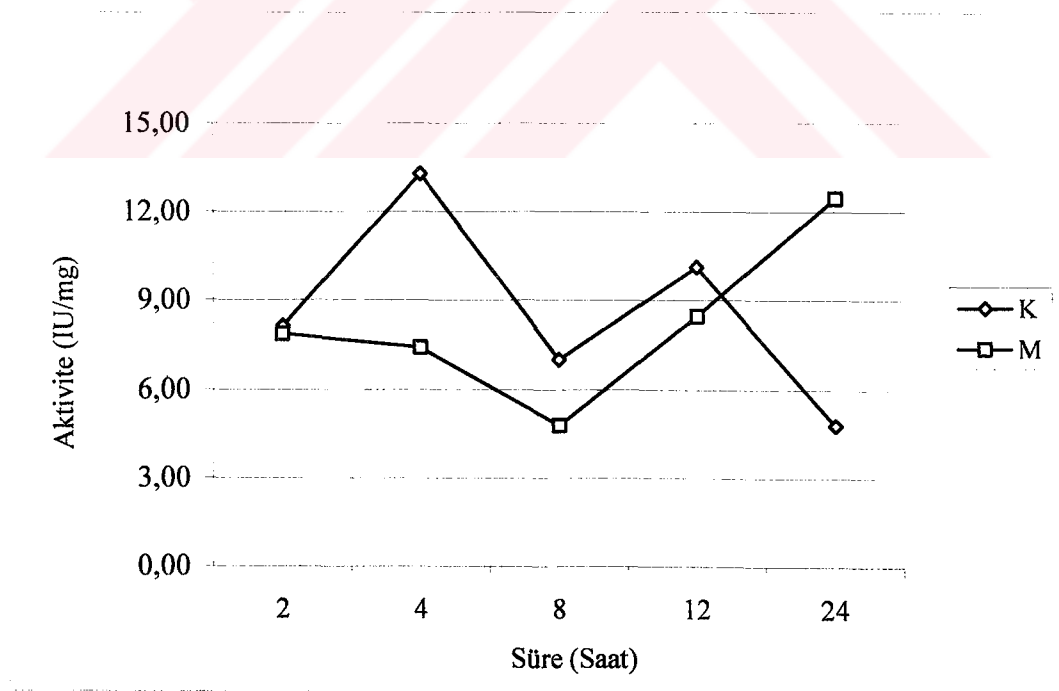
Verilere uygulanan iki yönlü ANOVA testi sonucunda SOD enzim aktivitesinin kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak çok önemli farklılık gösterdiği bulunmuş ( $p<0,01$ ), buna karşın enjeksiyondan sonraki saatler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmemiştir (Tablo 5).

Tablo 4. Nikotin ve Melatonin verilmiş Swiss albino tip laboratuvar farelerinde SOD aktivitelerinin zamana bağlı olarak değişimi

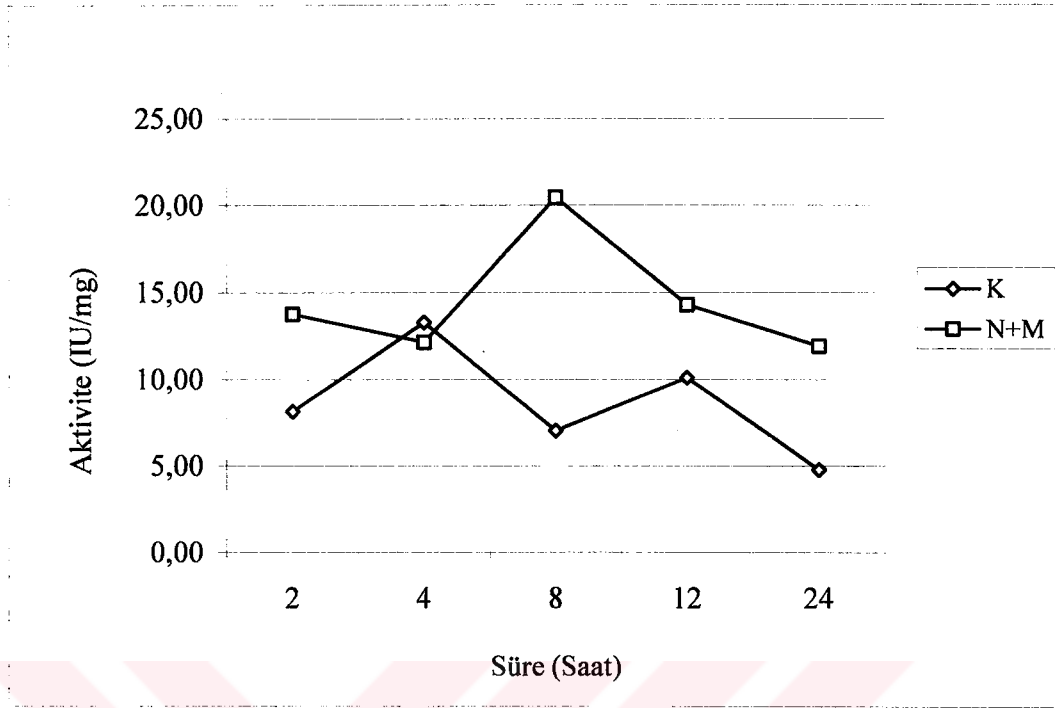
Enjeksiyon Sonrası (saat)	Kontrol (K)	Nikotin (N)	Melatonin (M)	Nikotin ve Melatonin (N+M)
2.	8,12±0,4	14,50±0,11	7,87±0,16	13,75±0,15
4.	13,27±0,26	8,84±0,21	7,41±0,07	12,13±0,23
8.	7,01±0,2	12,49±0,16	4,78±0,04	20,44±0,19
12.	10,12±0,19	9,53±0,26	8,47±0,13	14,31±0,27
24.	4,79±0,09	15,73±0,65	12,45±0,54	11,91±0,23



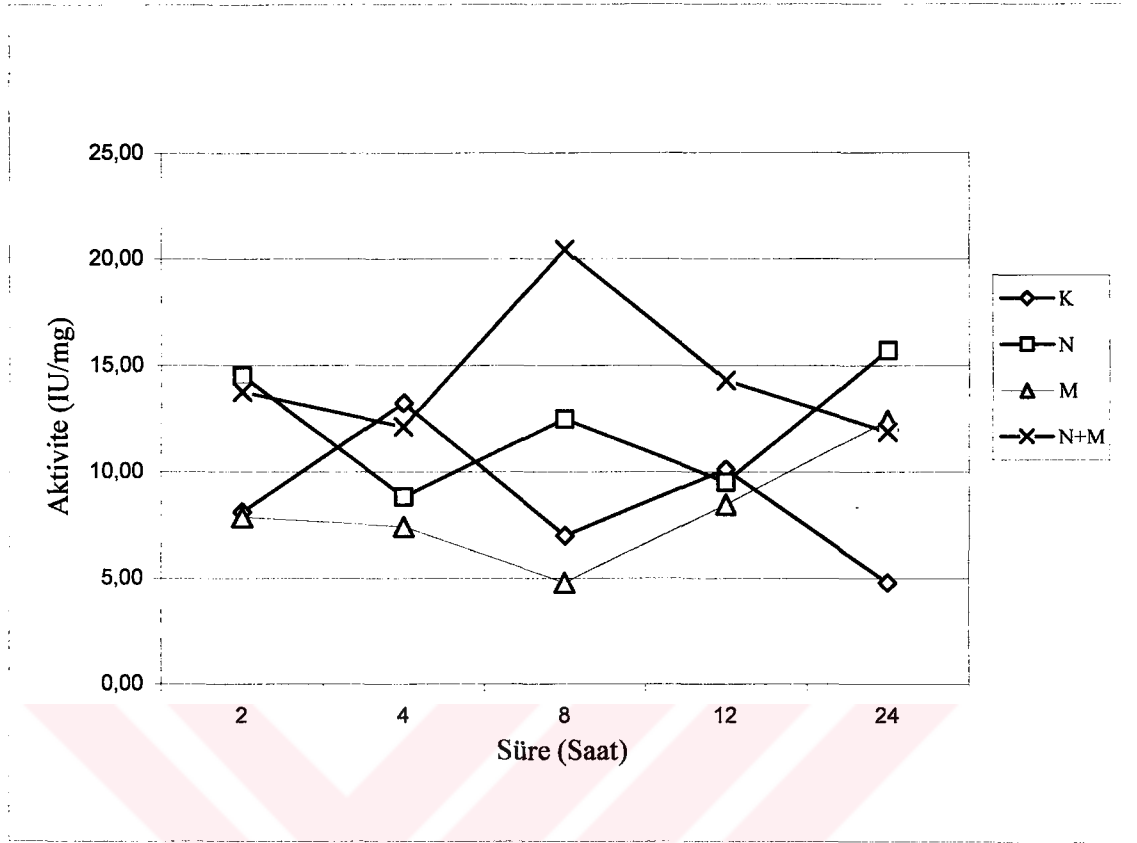
Şekil 11. Nikotin verilmiş Swiss albino tip laboratuvar farelerinde SOD aktivitelerinin zamana bağlı olarak değişimi



Şekil 12. Melatonin verilmiş Swiss albino tip laboratuvar farelerinde SOD aktivitelerinin zamana bağlı olarak değişimi



Şekil 13. Nikotin ve Melatonin birlikte verilmiş Swiss albino tip laboratuvar farelerinde SOD aktivitelerinin zamana bağlı olarak değişimi



Şekil 14. Nikotin ve Melatonin verilmiş Swiss albino tip laboratuvar farelerinde SOD aktivitelerinin zamana bağlı olarak değişiminin değerlendirilmesi

Tablo 5. SOD aktivitesinin iki yönlü ANOVA testi ile analizi

Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	Olasılık
Grup	3	347,4	115,8	6,39	0,001**
Saat	4	34,1	8,5	0,47	0,757
Etkileşim	12	379,4	31,6	1,75	0,093
Hata	40	724,3	18,1		
Toplam	59	1485,2			

\*\* $p < 0,01$

## **4.2. Nikotin ve Melatonin etkisiyle Katalaz enzimi aktivitesinde gözlenen değişimler**

### **4.2.1. Nikotinin Katalaz aktivitesi üzerine etkileri**

KAT aktivitesinin kontrol gruplarına göre genelde inhibisyon gösterdiği, saatler arasında yapılan karşılaştırma sonucunda belirlenmiş olup enjeksiyonu izleyen 12. saatte en yüksek inhibisyon değerine ulaşmıştır.

Başlangıçta kontrole göre KAT aktivitesinde önemli bir değişim gözlenmezken (<%5), 4. saatten itibaren başlayan inhibisyon 12. saatte en yüksek değerine ulaşmıştır (%56). 12. saatten sonra inhibisyon azalarak devam etmiştir (Tablo 6; Şekil 15).

### **4.2.2. Melatoninin Katalaz aktivitesi üzerine etkileri**

Melatonin, enjeksiyondan sonra 2. saatte kontrole oranla %24'lük bir aktivasyona neden olmuştur. Aktivasyonu takiben 4. saatten itibaren enzim aktivitesinde başlayan inhibisyon 8. saatte en yüksek değerine ulaşmıştır. 8. saatte %72'lik bir inhibisyon değeri gözlenmiştir. Bu değer 8. saatten sonra azalarak 24. saate %16 inhibisyon gözlenmiştir (Tablo 6; Şekil 16).

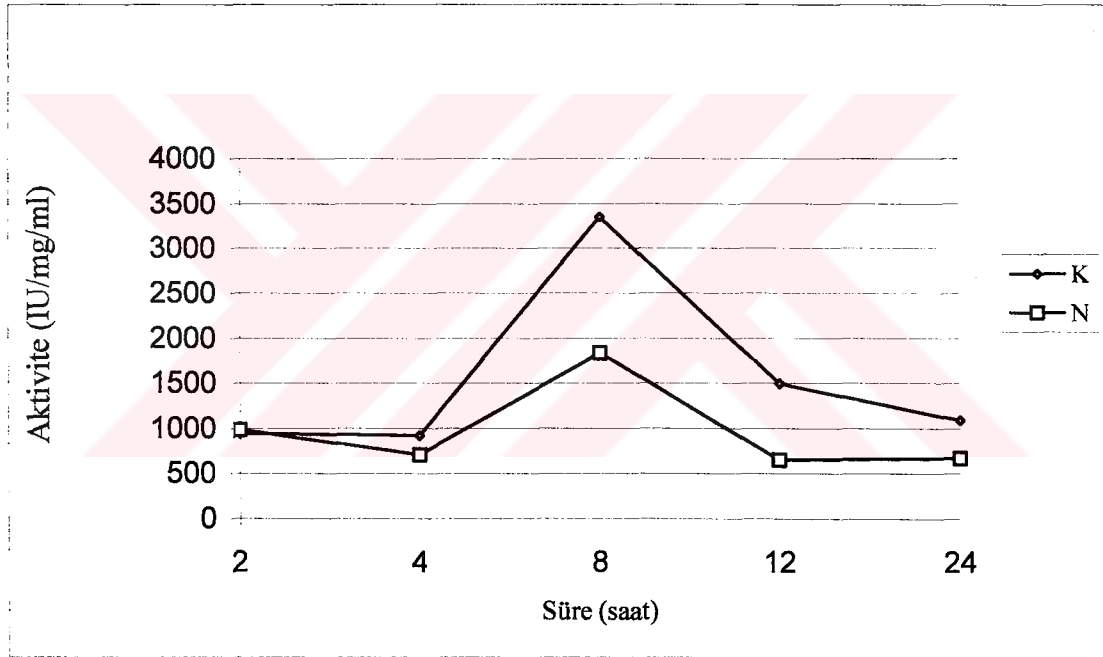
### **4.2.3. Nikotin ve Melatoninin Katalaz aktivitesi üzerine etkileri**

Nikotin ve melatoninin birlikte uygulandığı grupta KAT aktivitesinde başlangıçta önemli bir değişim gözlenmemiştir. 4. saatte kontrole oranla %18'lik bir aktivasyon gözlenmiştir. 8. saatte KAT aktivitesinde kontrole göre %52'lik inhibisyon gözlenmiştir. İnhibisyon 12. saate kadar azalarak devam etmiş ve 12. saatte kontrole %18 inhibisyon gözlenmiştir. 24. saatte KAT enzimi aktivitesinde kontrole göre %169 oranında bir aktivasyon gözlenmiştir. grup içinde kontrole göre enzim aktivitesindeki en yüksek aktivasyon 24. saatte gözlenirken en yüksek inhibisyon değeri 8. saatte gözlenmiştir (Tablo 6; Şekil 17).

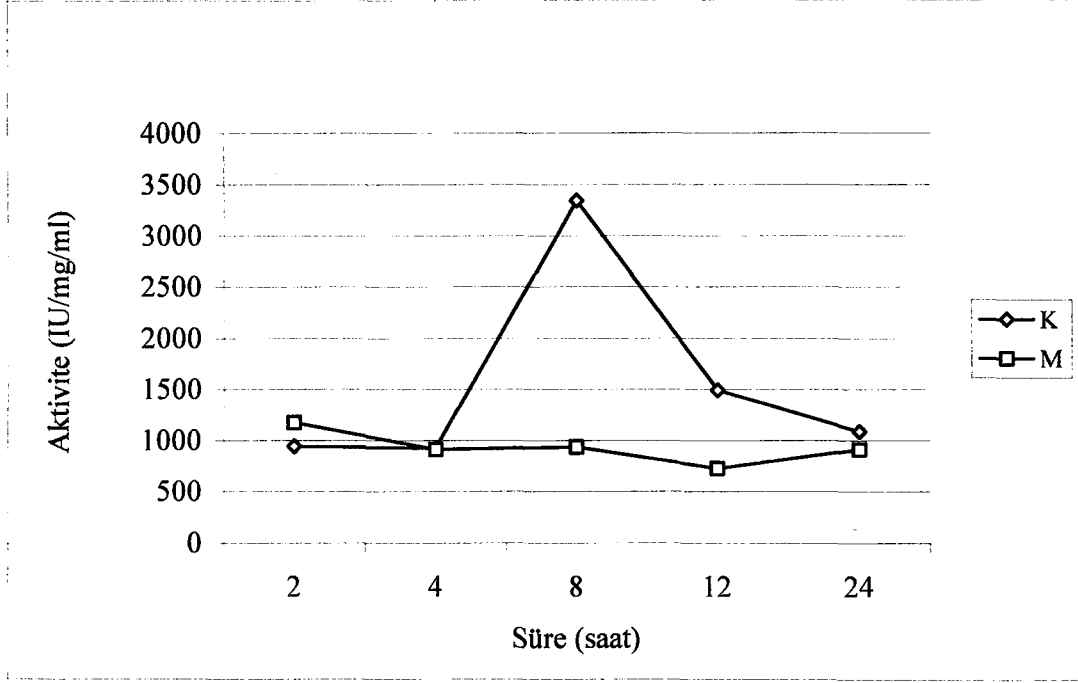
Verilere uygulanan iki yönlü ANOVA testi sonucunda KAT enziminin aktivitesinde deney grupları ve enjeksiyon sonrası geçen süreler arasında istatistiksel olarak önemli ( $p<0,01$ ) bir fark gözlenmiştir (Tablo 7).

Tablo 6. Nikotin ve Melatonin verilmiş Swiss albino tip laboratuvar farelerinde KAT aktivitelerinin zamana bağlı olarak değişimi

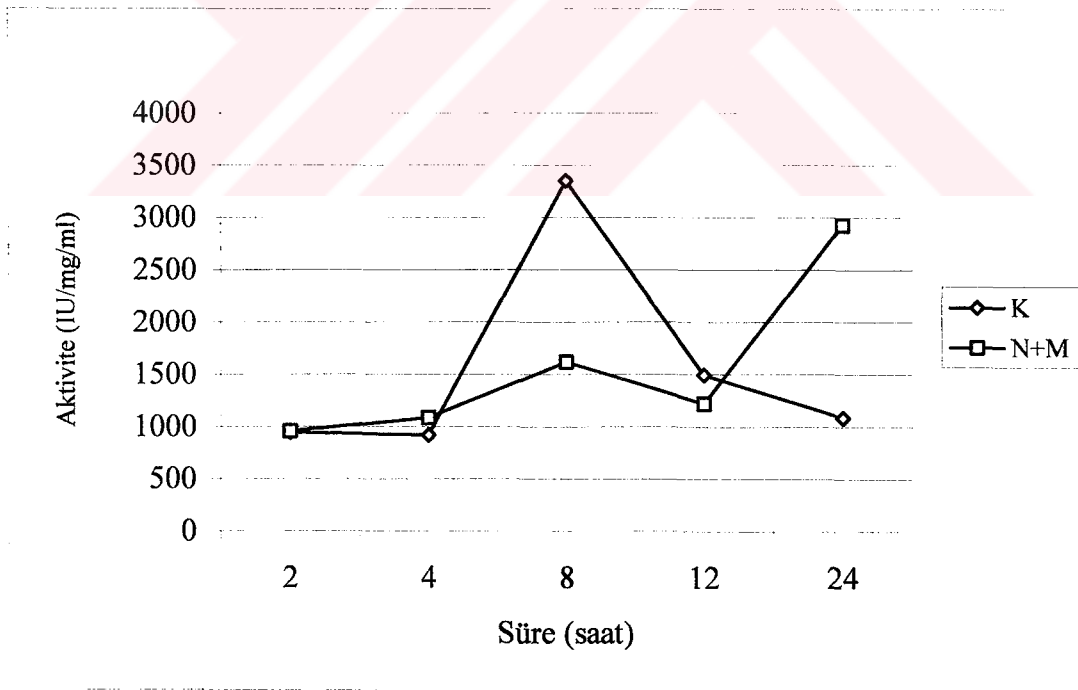
Enjeksiyon Sonrası (saat)	Kontrol (K)	Nikotin (N)	Melatonin (M)	Nikotin ve Melatonin (N+M)
2.	944,17±20,5	985,29±35,1	1172,79±11,7	955,85±201,3
4.	920,53±16,5	706,65±12,3	910,36±29,7	1087,16±195,5
8.	3345,76±104,4	1830,88±15,7	938,50±42,7	1615,12±168,5
12.	1491,41±19,5	650,44±7,8	723,39±16,7	1217,27±142,5
24.	1088,37±26,6	673,64±9,2	910,75±24,7	2928,19±147,6



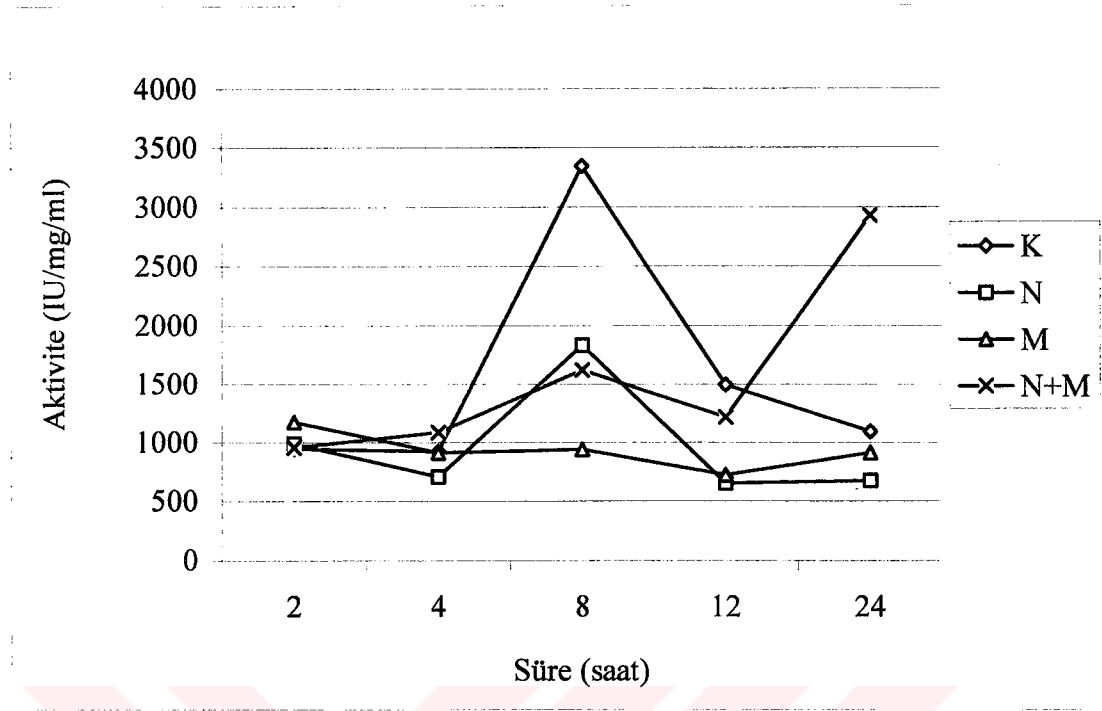
Şekil 15. Nikotin verilmiş Swiss albino tip laboratuvar farelerinde KAT aktivitelerinin zamana bağlı olarak değişimi



Şekil 16. Melatonin verilmiş Swiss albino tip laboratuvar farelerinde KAT aktivitelerinin zamana bağlı olarak değişimi



Şekil 17. Nikotin ve Melatonin birlikte verilmiş Swiss albino tip laboratuvar farelerinde KAT aktivitelerinin zamana bağlı olarak değişimi



Şekil 18. Nikotin ve Melatonin verilmiş Swiss albino tip laboratuvar farelerinde KAT aktivitelerinin zamana bağlı olarak değişiminin değerlendirilmesi

Tablo 7. KAT aktivitesinin iki yönlü ANOVA testi ile değerlendirilmesi

Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	Olasılık
Grup	3	4985808	1661936	6,69	0,001**
Saat	4	9129958	2282490	9,18	0,000**
Etkileşim	12	14935233	1244603	5,01	0,000
Hata	40	9943932	248598		
Toplam	59	38994931			

\*\* $p < 0,01$

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Biyolojik sistemlerde metabolizma ve çevresel etkiler sonucunda moleküler oksijenden süperoksit, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi bazı reaktif türler meydana gelebilir. Oluşan reaktif oksijen türleri, etkisizleştirilmediği sürece vücutta önemli fonksiyonlara sahip moleküllere, zar yapısına ve genetik materyale zarar vererek hücrel yapıyı tehdit eder. Meydana gelebilecek hasarlar antioksidant sistemlerle yok edilir. Bu sistemler SOD, Katalaz ve peroksidazları içermektedir. SOD, süperoksit anyonunu hidrojen peroksit indirger. Katalaz ve peroksidazlar da hidrojen peroksiti su ve oksijene indirgeyerek hücrenin maruz kalabileceği hasarları engeller (Harris, 1992). Ayrıca oksijen radikallerinin yabancı mikroorganizmalara karşı dirençte önemli rol oynadığı ve eksikliğinde hastalıklara yol açtığı bilinmektedir (Miller & Britigan, 1997).

Süperoksit radikallerinin etkilerinin ve hastalıkların patojenezindeki rolünün anlaşılabilmesi için birçok araştırmacı konu üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmada süperoksit radikallerinin hücrel konumları göz önüne alınarak, dünyada bir çok insanın doğrudan veya dolaylı yollardan maruz kaldığı sigara dumanının ana bileşeni nikotinin serbest radikaller üzerine etkileri antioksidant enzim düzeyleri takip edilerek aydınlatılmaya çalışılmıştır. Nikotinin serbest radikal oluşumu üzerine etkilerinin yanı sıra bu etkinin azaltılabilmesi için bilinen güçlü bir radikal süpürücü ve antioksidant madde (Reiter ve ark., 1997b; Tan ve ark., 1993) olan melatoninin etkilerinin de incelenmesi bu çalışmada gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızın sonucunda SOD enzimi aktivitesinin deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterdiği ( $p<0,01$ ), fakat enjeksiyondan sonraki saatler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği belirlenmiştir. Katalaz enzim aktivitesi için yapılan çalışma sonucunda deney grupları ve enjeksiyon sonrası geçen süreler arasında istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,01$ ) bir fark gözlenmiştir.

SOD enzim aktivitesindeki değişimler incelendiğinde nikotin enjekte edilen grupta genellikle SOD aktivitesinin kontrole oranla düşük olduğu gözlenmiştir. Nikotinin SOD enzimi üzerinde bir inhibisyona neden olduğu belirlenmiştir. Başlıca etkinin nikotin ve aromatik hidrokarbonların enzim sistemlerini etkileyerek meydana geldiği bilinmektedir (Conney ve ark., 1977; Jusko, 1978; Dawson & Vestal, 1982). Ratlarda nikotinin kronik subkutan enjeksiyonunun beyinde P450 ekspresyonunu teşvik ettikleri görülmüştür

(Anandatheerthavarada ve ark., 1993a,b). Bu bilgiler ışığında nikotinin P450 gibi enzimlerin artışı teşvik ederek oksidatif etkilerin azaltıldığı düşünülmektedir.

Melatonin enjekte edilen grupta melatonin 12. saate kadar SOD enzim aktivitesini inhibe etmiştir. 24. saatte kontrole oranla %160'lık bir artış göstermiştir. Melatoninin pineal bezden salınan hormonal yapısı nedeniyle uyku ritmini düzenleyici etkisiyle bağlantılı olarak veya melatonin yıkımı sonucu böyle bir sonucun ortaya çıktığını düşünmekteyiz. *Gallus domesticus*'un üç farklı dokusunda (cerebral korteks, karaciğer ve akciğer) antioksidant enzim SOD'un endojen ritmi incelendiğinde SOD'un cerebral korteks, karaciğer ve akciğerde 24 saatlik dikkate değer bir ritim gösterdiği ve en yüksek aktivitenin, melatonin ve total antioksidant miktarının en yüksek olduğu zamanlarla uygunluk gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada 7 gün boyunca sürekli olarak ışığa maruz bırakılan deneklerde melatonin ritminin ve buna paralel olarak da SOD aktivitesinin ve total antioksidant durumunun değiştiği ve bu endojen ritmin bozulduğu belirlenmiştir. Bu bulgular ışığında melatonin ritminin gece saatlerindeki SOD aktivitesi ve kandaki total antioksidant kapasitesinin artışı ile bağlantılı olduğu düşünülmüştür (Albarrán ve ark., 2001). Nikotin ve melatonin verilen grupta SOD aktivitesinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Melatoninin süperoksit radikallerini gidermede beklenen etkiyi göstermediği gözlenmiştir.

Katalaz aktivitesindeki değişimler incelendiğinde nikotin enjekte edilen grupta nikotinin kontrol grubuna göre enzim aktivitesinde inhibisyona neden olduğu gözlemiştir. En yüksek inhibisyon değeri 12. saatte gözlenmiştir. 12. saatten sonra inhibisyon azalarak devam etmiştir. Nikotinin metabolizması böyle bir sonucu ortaya çıkarabilir. Melatonin enjekte edilen grupta 4. saate başlayan inhibisyon 8. saatte en yüksek değerine ulaşmış ve bu inhibisyon hızla azalarak 24. saatte kontrole oranla %16'lık bir değere düşmüştür. Gerçekleştirdiğimiz çalışmada melatonin gruplarında enjeksiyon saatleriyle melatoninin inhibisyonundaki değişimleri melatoninin hormonal yapısı ve uygulanan dozun miktarına bağlı olarak yıkımından etkilendiği düşünülmektedir. Nikotin ve melatonin uygulanan grupta başlangıçta önemli bir değişim gözlenmemesine rağmen 8. saatte nikotin ve melatonin grubu ile nikotin grubu karşılaştırdığında katalaz aktivitesinde %12 bir azalma göze çarpmaktadır. Ayrıca melatonin grubunda katalaz aktivitesinde yaklaşık olarak %72'lik inhibisyon ve nikotin grubunun katalaz aktivitesi, melatonin grubu ile karşılaştırıldığında yaklaşık 2 kat fazla

olduğu gözlenmiştir. Bu etki 12. saatte giderek azalmıştır. 12. saatte nikotin grubunda kontrole göre görülen inhibisyonun melatoninin antioksidant etkisini azalttığını düşünüyoruz. Bu bulgular bize, 8. saatte nikotin ve melatonin grubunda görülen katalaz aktivitesindeki inhibisyonun melatoninin antioksidant etkisi sonucu ortaya çıktığını düşündürmüştür. 24. saatte nikotin ve melatonin grubunda kontrole göre %169'lük bir aktivasyon gözlenmiştir. Bu aktivasyon melatoninin diğer gruplarda da gözlediğimiz gibi 24. saate antioksidant etkisini kaybettiği göstermektedir. Ayrıca katalaz aktivitesinde 8. saatten sonra görülen inhibisyon nikotin metabolizması sonucu oluşan metabolitlerin katalaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi olduğunu düşündürmektedir. Hadley ve arkadaşları sigara dumanının bazı bileşenlerinin ilaç metabolizması enzimlerini (P450) inhibe edici etkisi olduğunu göstermişlerdir (Hadley & Dahl, 1982).

Nikotinin toksisite mekanizması günümüzde açıklık kazanmış durumdadır. Bununla birlikte günümüze kadar yapılan çalışmalarda birçok delil nikotinin hücre fonksiyonları üzerine etkisini belirlememizde bize yardımcı olmuştur. Nikotinin hücre fonksiyonları üzerine etkisi hücre hasarı ve bunu takip eden hücre ölümleriyle sonuçlanabilir. Nikotin, hücre metabolizması ve protein sentezini etkiler (Konno ve ark., 1991), DNA'ya 3H-timidin bağlanmasını inhibe eder (Bonita ve ark. 1990), transmembran potansiyelini düşürür (Horster ve ark., 1984).

Ayrıca nikotinin farklı enantiyomerlerinin farklı oranlarda toksisite gösterdiği belirlenmiştir (Yildiz ve ark., 1998). Yapılan çalışmada Nikotinin üç farklı enantiyomerinin gösterdiği nikotin toksisitesinin farklı oranlarda oksidatif hücre hasarı oluşturabileceği önerilmiştir. Nikotin enantiyomerlerinin oksidatif stresi teşvik edici etkisinin belirlenmesi için, Yıldiz ve arkadaşları CHO hücrelerinde GSH ve MDA düzeylerini belirleyerek oksidatif etki miktarını belirleme yoluna gitmişlerdir. GSH antioksidant savunma sisteminin en önemli öğelerinden biridir ve direkt serbest radikal süpürücü etki göstermektedir (Meister, 1981). Radikal süpürücü SOD ve katalaz varlığında ortadan kalkan, GSH düzeyindeki belli miktardaki düşüş, nikotin enantiyomerlerinin CHO hücreleri üzerine oksidatif etki gösterdiğine işaret etmektedir. Nikotin mevcudiyetine oksidatif stresin oluşumu lipid peroksidasyon düzeyindeki artışla da desteklenmiştir. Oksidatif stres dolayısıyla oluşan lipid peroksidasyon düzeyi MDA seviyesi belirlenerek ölçülür. MDA, serbest radikal saldırıları sonucunda ortaya çıkan lipid peroksidasyon ürünüdür. Nikotin enantiyomerlerine maruz kalan CHO

hücrelerinde artış gösteren MDA düzeyi serbest radikal oluşumunun varlığını destekleyen diğer bir bulgudur.

Hücrel membranlarda oksidatif stres lipitlerin moleküler organizasyonunda membran geçirgenliğinin artışıyla sonuçlanan önemli değişimler meydana getirmektedir. Lipit peroksidasyonu sonucunda meydana gelen bu tip yapısal organizasyon bozuklukları sonucunda LDH gibi sitoplazmik belirteçler (markir) salınmaktadır (Wetscher ve ark., 1995). CHO hücrelerinin nikotin enantiyomerlerine maruz kaldıklarında gözlenen LDH varlığı ve bunun antioksidant enzimler mevcudiyetinde inhibisyonu, azalan glutatyon ve artış gösteren MDA seviyeleriyle tutarlılık göstermektedir. Ayrıca SOD ve Katalaz varlığında LDH inhibisyonu reaktif oksijen türlerinden süperoksit anyonları ve hidrojen peroksidin enantiyomer muamelesi sonucunda ortaya çıktığını da göstermektedir.

Nikotin enantiyomerlerinin serbest radikal oluşumu üzerine etkileri henüz netlik kazanmamıştır. (-)-nikotin'in mitokondriyal solunum zincirini etkileyerek süperoksit anyonunun ve hidrojen peroksit oluşumunda artışa sebep olduğu bilinmektedir (Gvozdjakova ve ark., 1992). *Manduca sexta* larvalarında nikotin'in sitokrom P-450 enzim aktivitelerini 1 ila 10 kat arttırdığı görülmüştür (Snyder ve ark., 1993). Karışık fonksiyonlu oksidazların toksik kimyasalları metabolize ederken serbest radikal oluşturdukları bilinmektedir (Meister, 1981). Bu nedenle serbest radikallerin, nikotin enantiyomerlerinin hücre içi metabolizması sırasında sitokrom P-450 enzimlerinin artan aktiviteleri sonucunda meydana gelebileceği düşünülebilir.

Nikotinin toksisitesi ve oksidatif stresi teşvik edici özelliğinin anlaşılabilmesi için aynı miktarda nikotin içeren saf nikotin çözeltilisi ve tütün özümü ile memeli hücre kültüründe yapılan çalışmada, nikotin'in tütün özününe oranla oldukça az toksik olduğu belirlenmiştir (Yildiz ve ark., 1999). Nikotin ve tütün özümü arasındaki bu farklılık tütün özününde nikotin haricinde bulunan hücre yaşamını olumsuz etkileyen biyolojik olarak aktif bileşenlerin bulunmasıdır (Brunnemann ve ark., 1996). Tütünde N-nitrözaminlerin ve benzo[a]piren gibi karsinogenik bileşenlerin bulunuşu tütün özütünün saf nikotine oranla daha yüksek inhibitör etki göstermesini açıklayabilir.

Tütün'e özgü bazı N-nitrözaminlerin memelilerde, metabolik olarak aktive olarak hücredeki nükleofilik molekülle etkileşen oldukça reaktif elektrofillerin oluşumuna neden olduğu bilinmektedir (Hecht & Hoffmann, 1988.).

Laboratuar fareleri (*Mus musculus*) üzerinde yapılan çalışmada Aspirin ve antioksidant butillenmiş hidroksi anisel`ün (BHA) karaciğer mikrozomal benzo[a]piren hidroksilaz (BPH) enzimi üzerine etkisi araştırılmış ve Aspirin ve BHA`nın BPH aktivitesinin inhibe ettiği belirlenmiştir. Aspirin ve BHA verilen grupta gözlenen enzim aktivitesi, ayrı uygulanan gruplara oranla daha yüksek inhibisyon göstermiştir (Eren, Z., 1997).

Serbest radikal kaynaklı lipid peroksidasyonunun travma sonrası nöronal dejenerasyona sebep olan önemli bir faktör olduğu kabulü giderek yaygınlaşmaktadır. *In vitro`da* merkezi sinir sistemi dokuları üzerinde oluşturulan radikal hasarının melatonin tarafından engellendiği ve özellikle omurilik sıvısında en etkili olarak antioksidant etki gösterdiği belirlenmiştir (Kaptanoğlu ve ark., 2003).

İçsel kaynaklı serbest radikal oluşumu sonucunda meydana gelen mitokondriyal hasarlar hücresel yaşlanma sürecinde etkili olmaktadır. Akut melatonin uygulamasının mitokondriyal metabolizmayı etkilediği belirlenmiştir. SAM suşu farelerde yaş bağı olarak görülen karaciğer mitokondriyal işlevlerde azalma melatoninin akut enjeksiyonu ile engellenmiştir. Mitokondride ileri yaşa bağı olarak ortaya çıkan zararlı oksidatif değişimler, indol tarafından uyarılmış mitokondriyal solunum zinciri aktivitesi tarafından azaltılabilir (Okatani ve ark., 2003).

Gama radyasyonunun beyinde ciddi hasarlara neden olduğu bilinmektedir. Hasarları engellemek için birçok madde denenmiştir. Tüm vücudu gama radyasyonuna maruz bırakılan farelerin beyin dokusunda lipid peroksidasyon düzeyi ve histopatolojik değişimler incelenmiş ve hasarların melatonin ve E vitamini tarafından engellenebildiği belirlenmiştir. MDA düzeyindeki artış E vitamini terapisiyle oldukça az engellenirken melatonin tarafından nispeten daha iyi giderilebilmiştir. Histopatolojik çalışmalar sonucunda E vitamininin yalnızca nekrozları engellediği buna karşılık melatoninin ödem, nekroz ve nöronal dejenerasyonu azalttığı gözlenmiştir. Her iki maddenin de vasodilasyonu engelleyemediği belirlenmiştir. Sonuçta radyasyon etkisi sonucunda oluşan serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu sekonder beyin hasarındaki patolojik değişimleri önlemede etkili olabileceği belirlenmiştir (Erol ve ark., 2003).

Deneysel omurilik zedelenmesinde prostoglandin E1, melatonin ve oksitetrasiklinin lipid peroksidasyonu, antioksidant ve paraoksonaz aktiviteleri ve homosistein seviyeleri üzerine etkileri omurilik dokusu ve kanda MDA ve plasma

homosistein düzeyleri, plasma GPx, SOD, paraoksonaz aktiviteleri belirlenerek incelenmiştir. Melatoninin özellikle 4. saatte önemli oranda etkiye sahip olduğu, oksitetrasiklinin de 1. ve 4. saatte etkili olduğu prostoglandin E1`in hasarlı gruba oranla etkili olduğu fakat melatonin ve oksitetrasiklin kadar etkili olmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak melatonin ve oksitetrasiklinin omurilik zedelenmelerinde lipit peroksidasyonunu engellemede etkili olduğu söylenebilir. Ayrıca antioksidant savunma sisteminin takip edilebilmesi için SOD ve GPx`den yararlanılabileceği gibi paraoksonaz ve homosisteinden de yararlanılabilmektedir (Topsakal ve ark., 2003).

Kronik melatonin uygulanması diabetik ratlarda böbrek hasarını azalttığı belirlenmiştir. Diyabetli hastalarda melatonin oksidatif stresi azaltıcı ve bağlantılı böbrek hasarlarını engelleyebilecek kullanışlı terapötik seçenek olabilmektedir (Cam ve ark., 2003). Melatoninin birçok diabetik komplikasyonu oksidatif stresi azaltarak engellediği ve ilgili organları oksidatif strese karşı koruduğu belirlenmiştir. Ayrıca E vitamini ile karşılaştırıldığında melatoninin çok düşük konsantrasyonlarının bile özellikle beyin ve böbrekte daha etkili antioksidant olduğu bilinmektedir (Baydaş ve ark., 2002). Antibiyotik maddelerin neden olduğu böbrek hasarlarında melatoninin fizyolojik konsantrasyonu önemliyen farmakolojik konsantrasyonu etkili olmamaktadır (Parlakpınar ve ark., 2003).

Melatoninin reperfüzyona bağlı organ hasarlarını antioksidant ve serbest radikal süpürücü etkisi sayesinde engelleyebilir. Melatonin, ACS`de (Abdominal Compartment Syndrome) reperfüzyon hasarını sınırlayıcı etki yapan bir madde olarak terapötik önemi vardır (Şener ve ark., 2003a).

Asetilsalisilik asit (ASA) ve diğer non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçların mide mukozasında oluşturduğu hasara omeprazol ve famotidin`in koruyucu etkisi olduğu bilinmektedir. ASA tarafından oluşturulan hasarda aktif oksijen türlerinin ve lipit peroksidasyonunun rol oynadığı bilinmektedir. Omeprazol ve famotidin melatoninle karşılaştırılmış ve antioksidant olarak melatonin kadar etkili olmadıkları belirlenmiştir (Sener-Muratoglu ve ark., 2001).

Nikotin ile ratlar üzerinde yapılan çalışmada hamilelik ve emzirme döneminde nikotinin içme suyuyla anneye verilmesi doğumda yavru sayısını ve doğumu takip eden 10 gün içerisinde de yavru ağırlıkları etkileyecek bir etki göstermemiştir. Doğum öncesi nikotin verilmesi doğumda fokal nekroz mevcudiyetini önemli ölçüde attırmıştır. Ve

ayrıca karaciğer hasarı 10 günlük farelerde dahi içme sularında nikotine maruz bırakılmalarına rağmen kolayca gözlenmiştir. Doğum sonrası nikotin uygulanması devam ettirildiğinde fokal ve yaygın nekrozun mevcudiyetinde şiddetinde artış gözlenmiştir (Sheng ve ark., 2001).

Son yıllarda Alzheimer hastalığı ve oksidatif stres arasında ilişki olduğu ve Alüminyum'un oksidatif olayları arttırdığı ileri sürülmüştür. Ratlarda Al'nın bu etkisi ve melatoninin koruyucu etkisinin araştırılması için yapılan çalışmada Al'nın farklı nöral bölgelerde oksidatif stresi teşvik ettiği belirlenmiş ve Al konsantrasyonlarında da önemli bir artış gözlenmemiştir. Nöral dokularda gözlemlenen biyokimyasal değişimler Al'nin pro-oksidant etki gösterdiğinin, Al uygulanan deneklerde de melatonin antioksidant etki gösterdiği belirlenmiştir. Al tarafından teşvik edilen oksidatif stresin sebep olduğu hücresel hasarlara karşı koruyucu etkileri olan melatonin nörolojik bozuklukların tedavisinde oksidatif etkileri azaltarak tedavi sürecinde etkili bir madde olacağı sonucuna varılmıştır (Esparza ve ark., 2003).

Ratlarda yapılan çalışmada antioksidant enzim düzeyleri incelenmiş ve melatonin uygulanmasının SOD ve GPx aktivitelerini ve redükte glutatyon miktarını böbrek ve karaciğerde arttırıcı etki gösterdiği belirlenmiştir. Beyinde SOD aktivitesinde artışa, okside glutatyonun redükte glutatyona oranını azalmasına sebep olmuştur (Liu ve ark., 2000).

Civa vücutta çeşitli toksik etkiler göstermektedir. Hg(II) oluşturduğu oksidatif stres benzeri mekanizma indirgen glutatyon düzeyindeki azalışa, DNA hasarına ve Lipit peroksidasyonuna neden olarak toksik etki göstermektedir. Bu toksik etkinin giderilmesinde akut ağır metal zehirlenmesi tedavisinde kullanılan ve bir antioksidant olan N-asetilsisteinin melatoninle karşılaştırılmış ve melatoninin de böbrek, karaciğer, akciğer ve beyin dokularında bu toksik etkinin bastırılmasında her iki antioksidanında etkili olduğu belirlenmiştir Bu sonuç N-asetilsistein ve melatoninin HgCl<sub>2</sub> tarafında meydana gelen oksidatif hasarın bu dokularda engelleyebileceği görülmüştür (Şener ve ark., 2003b).

Bu değerlendirmelerin çalışmalarımızın devamı olarak sürdürülen histolojik çalışmalarla birlikte farklı yorumlar kazanacağına inanıyoruz. Ayrıca ileride yapılacak çalışmalarda melatonin ve nikotin farklı organlarda gözlenerek antioksidant enzim düzeyleri üzerine etkileri araştırılacaktır.

## 6. KAYNAKLAR

- Aebi, H., 1984.** Catalase *in vitro*. Methods in Enzymology, Vol 105,121-126.
- Akkuş, İ., 1995.** Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, 38, Kuzucular Ofset, Konya.
- Albarràn, M.T., Lòpez-Burillo, S., Pablos, M.I., Reiter, R.J., 2001.** Endogenous rhythms of melatonin, total antioxidant status and superoxide dismutase activity in several tissues of chick and their inhibition by light. J. Pineal Res. 30:227-233.
- Alberts, et al., 1989.** Molecular biology of the cell. Second edition. Garland Publishing Inc. NY & London.
- Alvarez, A.P., Anderson, K. E., Conney, A. H., Kappas, A., 1976.** Interactions between nutritional factors and drug biotransformations in man. Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A. 73: 2501-2504.
- Alvarez S, et al., 2000.** The mitochondria. Published in Antioxidants and life style on line. [www.antioxidants.com.ar](http://www.antioxidants.com.ar).
- Al-Kazwini, A.T., O'Neill, P., Adams, G.E., 1990.** One-electron oxidation of methoxylated and hydroxylated indoles by azide 1. Characterization of primary indolic radicals. J. Phys. Chem. 94: 6666-6670.
- Anandatheerthavarada, H.K.,Williams, J.F., Wecker, L., 1993a.** The chronic administration of nicotine induces cytochrome P450 in rat brain. J. Neurochem. 60:1941-1944.
- Anandatheerthavarada, H.K.,Williams, J.F., Wecker, L., 1993b.** Differential effect of chronic nicotine administration on brain cytochrome P4501A/2 and P4502E1. Biochem. Biophys. Res. Commun. 194: 312-318.
- Anbar, M., Neta, P., 1967.** Int. J. Appl. Radiat. Isot. 18, 495-523.
- Anderson, K.E., 1988.** Influence of diet and nutrition on clinical pharmacokinetics. Clin. Pharmacokinet. 14: 325-346.
- Arendt, J., 1988.** Melatonin and human circadian system. In: Miles, A., Philbrick, D.R.S., Thompson, C. (eds) Melatonin: clinical perspective. Oxford Press, Oxford, pp. 43-61.
- Argyris, T.S., 1971.** Additive effects of phenobarbital and high protein diet on liver growth in immature male rats. Devl. Biol. 25: 293-309.
- Aslan, R., Şekercioğlu, M.R. ve Bayıroğlu, F., 1995.** Serbest radikal türlerin lipid peroksidasyonuna etkileri ve antioksidan savunma. Sağlık Bilg. Der. 2:137-142.

- Aslan, R., Dündar, Y., 1998.** Nitric oxide as a biophysiological component and a radical metabolite. *Hay. Arat. Ens. Derg.* 1-2:35-8.
- Balentine, J.D., 1982.** Pathology of oxygen toxicity, Academic Press, New York.
- Balzer, I., Hardeland, R., 1996.** Melatonin in algae and higher plants: possible roles as a phytohormone and antioxidant. *Bot. Acuta* 109:180-183.
- Barber, D.A. Horris, S.R., 1994.** Oxygen free radicals and antioxidants: a review. *Am. Pharm.* NS34(9):26-35.
- Baydas, G., Canatan, H. and Turkoglu, A., 2002.** Comparative analysis of the protective effects of melatonin and vitamin E on streptozocin-induced diabetes mellitus. *J. Pineal Res.* 32: 225-230.
- Benowitz, N.L., Jacob, P., III, 1993.** Nicotine and cotinine elimination pharmacokinetics in smokers and nonsmokers. *Clin. Pharmac. Ther.* 53:316-323.
- Bernard, D.G., Ramon, D.B., Ramon, C., 1970.** Ozon and vitamin E. *Science.* 169: 605-606.
- Bhattacharya, I.C., 1968.** Uptake of noradrenaline in the isolated perfused rat heart after depletion with decarborane. *Acta. Physiol. Scand.* 73: 128-138.
- Blask, D.E., Cos, S., Hill, S.H., Burns, D.M., Lemus-Wilson, A., Grasso, D.S., 1991.** Melatonin action on oncogenesis. In: Frascini, F., Reiter, R.J. (eds) role of melatonin and pineal peptides in neuroimmunomodulation. New York, Plenum Press, pp 233-240.
- Bolann, B.J., Ulvik, R.J., 1991.** Improvement of a direct spectrophotometric assay for routine determination of superoxide dismutase activity. *Clin. chem.* 37 11:1993-1999.
- Bonita, L., Perkins, K.A., Perkins, M., 1990.** The effects of nicotine on metabolic rate. *Sports Med.* 10: 277-285.
- Brunnemann, K.D., Prokopczyk, B., Djordjevic, M.V., Hoffmann, D., 1996.** Formation and analysis of tobacco-specific N-nitrosamines. *Crit. Rev. Toxicol.* 26(2):121-37.
- Brzezinski, A., 1997.** Melatonin in humans. *New Engl. J. Med.* 336: 186-195.
- Bubenik, G.A., 2001.** Localization , physiological significance and possible clinical implication of gastrointestinal melatonin. *Biol. Signals recept.* 10: 350-356.
- Byrd, G.D., Chang, K.M., Greene, J.M., deBethizy, J.D., 1992.** Evidence for urinary excretion of glucuronide conjugates of nicotine, cotininand trans-3'-hydroxycotinine in smokers. *Drug Metab. Disp.* 20: 192-197.
- Byung, P.Y., 1994.** Cellular defenses against damage from reactive species. *Physiological Rewievs.* 74(1): 139-172.

- Cam, M., Yavuz, Ö., Guven, A., Ercan, F., Bukan, N. and Üstündağ, N., 2003.** Protective effects of chronic melatonin treatment against renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Pineal Res.* 35: 212-220.
- Castro, A., Monji, N., 1986.** Dietary nicotine and its significance in studies on tobacco smoking. *Biochem. Arch.* 2: 91-97.
- Ceballos, I., Lafon, M., Javoy-Agit, F., Hirsch, E., Nicole, A., Sinet, P.M., Agid, Y. 1990.** Superoxide dismutase and parkinson's disease. *The Lancet.* 335:1035-1036.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A., 1979.** *Physiol. Rev.* 59: 527-605.
- Chan, T.Y., Tang, P.L., 1996.** Characterization of the antioxidant effects of melatonin and related indolamines *in vitro*. *J. Pineal Res.* 20: 187-191.
- Chauviere, J. and Ferrari-Iliou, R., 1999.** Intracellular Antioxidants: from Chemical to Biochemical Mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 949-962.
- Chengelis, C.P., 1988a.** Age- and sex-related changes in the components of the hepatic microsomal mixed function oxidase system in Sprague-Dawley rats. *Xenobiotica* 18: 1211-1224.
- Chengelis, C.P., 1988b.** Age- and sex related changes in epoxide hydrolase, UDP-glucuronosyl transferase, glutathione S-transferase and PAPS sulphotransferase in Sprague-Dawley rats. *Xenobiotica.* 18:1225-1237.
- Chyan, Y.J., Poeggeler, B., Omar, R.A. et al., 1999.** Potent protective properties against Alzheimer  $\beta$ -amyloid by an endogenous melatonin related structure, indole-3-propionic acid. *J. Biol. Chem.* 274: 21937-21942.
- Combs, G.F., Noguchi, T., Scott, M.L., 1975.** Mechanisms of action of selenium and vitamin E in protection of biological membranes. *Federation Proc.* 34: 11.
- Conney, A.J., Pantuck, E.J., Hsiao, K.-C., Kuntzman, R., Alvarez, A.P. and Kappas, A., 1977.** Regulation of drug metabolism in man by environmental chemicals and diet. *Fed. Proc.* 36: 1647-1652.
- Costa, E.J.X., Shida, C.S., Biaggi, M.H., Ito, A.S., Lamy-Freund, M.P., 1997.** How melatonin interact with lipid bilayers: a study by fluorescence and ESR spectroscopies. *FEBS Lett.* 416: 103-106.
- Crooks, P.A., Godin, C.S., 1988.** N-methylation of nicotine enantiomers by human liver cytosol. *J. Pharm. Pharmacol.* 40: 153-154.
- Crooks, P.A., Godin, C.S., Pool, W. F., 1992.** Enantiomeric purity of nicotine in tobacco smoke condensate. *Med. Sci. Res.* 20: 879-880.

- Cundy, K.C., Crooks, P.A., 1985.** *In vitro* characteristics of guinea pig lung aromatic azaheterocycle N-methyltransferase. *Drug. Metab. Disp.* 13: 658-663.
- Cundy, K.C., Sato, M., Crooks, P.A., 1985.** Stereospecific *in vivo* N-methylation of nicotine in the guinea pig. *Drug Metab. Disp.* 13: 175-185.
- Curvall, M., Elvin, C.E., Kazemi-Vala, E., Warholm, C., Enzell, C.R., 1990.** The pharmacokinetics of cotinine in plazma and saliva from non-smoking healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmac.* 38: 281-287.
- Curvall, M., Kazemi-Vala, E., Englung, G., 1991.** Conjugation pathways in nicotine metabolism In: *Effects of Nicotine on Biological Systems*, pp. 69-75, Adlkofer, F. and Thomas, K. (eds) Birkhauser, Basel.
- Dündar, Y., Arslan, R., 2000.** Hekimlikte oksidatif stress ve antioksidanlar, Afyon.
- Davis, R.A., Stiles, M.F., deBethizy, J.D., Reynolds, J.H., 1991.** Dietary nicotine: a source of urinary cotinin. *Food Chem. Toxic.* 29: 821-827.
- Dawson, G.W. and Vestal, R.E., 1982.** Smoking and drug metabolism. *Pharmac. Ther.* 15: 207-221.
- Dijk, K.D.J., Cajochen, C., 1997.** Melatonin and circadian regulation of sleep initiation, consolidation, structure and the sleep. *EEG. J. Biol. Rhythms* 12: 627-639.
- Dohi, T., Kojima, S., Tsujimoto, A., 1973.** Comperative studies of hepatic nicotine metabolizing enzyme activities in monkeys and dogs. *Jap. J. Pharmac.* 13:748-751.
- Domino, E.F., Hornbach, E., Demana, T., 1993.** Relevance of nicotine content of common vegetables to the identification of passive tobacco smokers. *Med. Sci. Res.* 21: 571-572.
- Durnas, C., Loi, C.-M., Cusack, B.J., 1990.** Hepatic drug metabolism and aging. *Clin. Pharmacokin.* 19:359-389.
- Eren, Z., 1997.** The effects of aspirin and antioxidant butylated hydroxy anisole on the liver microsomal benzo (A) pyrene hydroxylase activity in mice (*Mus musculus*). *Biochem. Arch.*, 13 (1): 43-52.
- Erol, F.S., Topsakal, C., Ozveren, M.F., Kaplan, M., Ilhan, N., Ozercan, I.H., Yildiz, O.G., 2003.** Protective effects of melatonin and vitamin E in brain damage due to gamma radiation: An experimental study. *Neurosurg Rev.* 27(1):65-9.
- Esparza, J.L., Gòmez, M., Romeu, M., Mulero,, M., Sànchez, D.J., Mallol, J., Domingo, J.L., 2003.** Aluminum-induced pro-oxidant effects in rats: protective role of exogenous melatonin. *J. Pineal Res.* 35: 32-39.
- Etzel, R.A., Greenberg, R.A., Haley, N.J., Loda, F.A., 1985.** Urine cotinine excretion in neonates exposed to tobacco smoke products in utero. *J. Pediatr.* 107: 144-148.

- Euler, U.S., Persson, N.-A., 1970.** Potentiation of adenergic cardiovascular effects of two quaternary nicotine analogs by reserpine. *Acta physiol. Scand.* 78: 459-464.
- Evans, H.M., 1976.** The pioneer history of vitamin E. *Vitamins and Hormons.* 20: 379.
- Evelson, P., Ordonez, C.P., Llesuy, S., Boveris, A., 1997.** Oxidative stress and *in vivo* chemiluminescence in mouse skin exposed to UVA radiation. *J. Photochem. Photobiol.* 38 (2-3): 215-219.
- Fagan, T.C., Walle, T., Oexmann, M.J., Walle, U.K., Bai, S.A., Gaffney, T.E., 1987.** Increased clearance of propranolol and theophylline by high protein compared with carbohydrate diet. *Clin. Pharmac. Ther.* 41: 402-406.
- Feldman, C.H., Hutchinson, V.E., Sher, T.H., Feldman, B.R., Davis, W.J., 1982.** Interaction between nutrition and theophylline metabolism in children. *Ther. Drug Monit.* 4: 69-76.
- Flohe, L., Ötting, F., 1984.** Superoxide dismutase assays. *Methods in Enzymology*, Vol:105.
- Florence, T.M., 1990.** Free radicals, antioxidants and cancer prevention. *Prot. Nutr. Soc. Aust. Annu. Conf.* 15:88-93.
- Foote, C.S., 1982.** In pathology of Oxygen (Author, A.P.,ed.), pp. 21-44, Academic Press, New York.
- Fridowich, I., 1975.** Superoxide dismutase. *Annu. Rev. Biochem.* 44:147-159.
- Fridowich, I., 1978.** *Science* 201: 875-880.
- Fridowich, I., 1983.** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23: 239-257.
- Fridovich, I., 1986.** Superoxide dismutases. *Adv. Enzymol.* 58:61-64.
- Garfinkel, D., Laudon, M., Nof, D., Zisapel, N., 1995.** Improvement of sleep quality in elderly people by controlled-release melatonin. *Lancet* 346: 541-544.
- Garg, M., 1969.** Variation in effects of nicotine in four strains of rats. *Psychopharmacologia, Berl.* 14: 432-438.
- Gilberd, D.L., 1981.** *Oxygen and Living Processes: An Interdisciplinary Approach*, Springer Verlag, New York.
- Gillette, J.R., 1979.** Biotransformation of drugs during aging. *Fed. Proc.* 38: 1900:1909.
- Greenblatt, D.J., Abernethy, D.R., Shader, R.I., 1986.** Pharmacokinetic aspect of drug therapy in the elderly. *Ther. Drug Monit.* 8:249-255.
- Grisham, M.B., 1992.** *Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine.* R.G. Landis Company, Austin, Texas. P. 104.

- Guemouri, L., Artur, Y., Herbeth, B., Jeandel, C., Cuny, G., Siest, C., 1991.** Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood. *Clin. Chem.* 37(11): 1932-1937.
- Guerrero, J.M., Reiter, R.J., 1992.** A brief survey of pineal gland – immune system interactions. *Endocrine Res.* 18: 91-103.
- Guerrero, J.M., Reiter, R.J., 2002.** Melatonin-immune system relationships. *Curr. Topics Med. Chem.* 2: 167-180.
- Gvozdjakova, A., Kucharska, J., Gvozdjak, J., 1992.** Effect of smoking on the oxidative processes of cardiomyocytes. *Cardiology.* 81(2-3):81-4.
- Haber, F. and Weiss, J.J., 1934.** The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. Lond. Ser.* 147:332-351.
- Hadley, W.M. and Dahl, A.R., 1982.** Cytochrome P-450-dependent monooxygenase activity in rat nasal epithelial membranes. *Toxic Lett.* 10:417-422.
- Halliwell, B., 1981a.** *Chloroplast Metabolism: the Structure and Function of Chloroplasts in Green Leaf Cells*, Oxford University Press, Oxford.
- Halliwell, B., 1981b.** in *Age Pigments* (Sohal, R.S., ed.), pp. 1-62, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- Halliwell, B., 1982.** *Cell Biol. Int. Rep.* 6: 529-542.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1984.** Oxygen toxicity and oxygen radicals, *Transition Metals and Disease Biochem. J.*, 219, 1-14.
- Halliwell, B. and Arumoa, O.I., 1991.** DNA damage by oxygen derived species. Its mechanisms and measurement in mammalian species. *FEBS Lett.*, 281, 9-19.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999.** *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford.
- Hardeland, R., Reiter, R.J., Poeggeler, B. et al., 1993.** The significance of metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17:347-357.
- Hardeland, R., Balzer, I., Poeggeler, B., Fuhrberg, B., Uria, H., Behrmann, G., Wolf, R., Meyer, T.J., Reiter, R.J., 1995.** On the primary functions of melatonin in evolution: mediation of photoperiodic signals in unicells, photo-oxidation and scavenging of free radicals. *J. Pineal Res.* 18: 104-111.
- Hardeland, R., Fuhrberg, B., 1996.** Ubiquitous melatonin-presence and effects in unicells, plants and animals. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 2: 2545.
- Harris, E.D., 1992.** Regulation of antioxidant enzymes. *Faseb Jour.* 6:2675- 2683.

- Hartshorn, R.D., Demers, L.M., Sultators, L.G., Lang, C.M., Hughes, H.C., Jr, 1979.** Effects of chronic parenteral carbohydrate administration on hepatic drug metabolism in the rat. *Pharmacology*. 18:103-111.
- Hecht, S.S., Hoffmann, D., 1988.** Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. *Carcinogenesis*. 9(6):875-84.
- Hedqvist, P. 1970.** On the mechanism of depletion of noradrenaline stores by isomonomethylnicotinium bromide. *Acta physiol. Scand.* 78: 117-122.
- Hibberd, A.R., Abrahams, Y., Gorrod, J.W., 1981.** Metabolism of nicotine, cotinine and nicotine  $\Delta^{1(5)}$  iminium ion by human foetal liver, *in vitro*. In: *Progress in Clinical Pharmacy III*, pp. 79-88, Turakka, H. and Van Der Kleijn, E. (eds) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amstardam.
- Hill, H.A.O., 1981.** *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B.* 294: 119-128.
- Hoffmann, D., Brunnemann, K.D., 1983.** Endogenous formation of N-nitrosoproline in cigarette smokers. *Cancer Res.* 43: 5570-5574.
- Holland, M.K., Alvarez, J.G., Storey, B.T., 1982.** *Biol. Reprod.* 27: 1109-1118.
- Horster M, Brechtelsbauer H, Wilson P, Schmolke M., 1984.** Effects of nicotine on epithelial nephron cells in culture. *Klin. Wochenschr.* 62: 86-91.
- Horwitt, M.K., 1979.** Vitamin E: a reexamination. *The amer. J. Clin. Nutr.* 29: 568.
- Idle, J.R., 1990.** Titrating exposure to tobacco smoke using cotinine-a minefield of misunderstandings. *J.clin. Epidemiol.* 43:313-317.
- Imaoka, S., Fujita, S., Funae, Y., 1991.** Age dependent expression of cytochrome P450s in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 1097: 187-192.
- Jenner, P., Gorrod, J.W., 1973.** Comparative *in vitro* hepatic metabolism of some tertiary N-methyl tobacco alkaloids in various species. *Res. Commun. Chem. Path. Pharmac.* 6: 829-843.
- Jenner, P., Gorrod, J.W., Beckett, A.H., 1971.** Comparative C- and N-oxidation of (+) - and (-) -nicotine by various species. *Xenobiotica* 1: 497-498.
- Jenner, P., Gorrod, J.W., Beckett, A.H., 1973.** Species variation in the metabolism of R-(+) - and S-(-)-nicotine by  $\alpha$ -C- and N-oxidation *in vitro*. *Xenobiotica* 3: 573-580.
- Ji, L.L., Stratman, F.W. and Lardy, H.A. 1988.** Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscles. Influences of selenium deficiency, chronic training and acute exercise. *Arch. Biochem. Biophys.* 263: 150-160.
- Jialal, I., Fuller, C.J., 1993.** Oxidized LDL and antioxidants. *Clin. Cardiol.* 16:16-9.

- Jovanovich, S.V., Steenken, S., 1992.** Substituent effect on spectral, acid base and redox properties of indolyl radicals: a pulse radiolysis study. *J. Phys. Chem.* 96: 6674-6679.
- Jusco, W.K., 1978.** Role of tobacco smoking in pharmacokinetics. *J. Pharmacokinet. Biopharmaceut.* 6: 7-39.
- Kagan, A. and Tyurina YY., 1998.** Recycling and redox cycling of phenolic antioxidants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Nov 20;854: 425-34.
- Kamataki, T., Maeda, K., Shimada, M., Kitani, K., Nagai, T., Kato, R., 1985.** Age related alteration in the activities of drug-metabolizing enzymes and contents of sex specific forms of cytochrome P-450 in liver microsomes from male and female rats. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 233: 222-228.
- Kapras, A., Anderson, K. E., Conney, A. H., Alvares, A. P., 1976.** Influence of dietary protein and carbohydrate on antipyrine and theophylline metabolism in man. *Clin. Pharmac. Ther.* 20: 643-653.
- Kaptanoglu, E., Palaoglu, S., Demirpence, E., Akbiyik, F., Solaroglu, I, Kılınç, A., 2003.** Different responsiveness of central nervous system tissues to oxidative conditions and to the antioxidant effect of melatonin. *J. Pineal Res.* 34: 32-35.
- Karbownik, M., Reiter, R.J., 2000.** Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 225: 9-22.
- Katz, M.L., Parker, K.R., Handelman, G.R., Bramel, T.L., Dratz, E.A., 1982.** *Exp. Eye Res.* 34: 339-369.
- Kirschfeld, K., 1982.** *Proc. R. Soc. London Ser. B.* 216: 71-85.
- Kılınç, K., Kılınç, A., 2002.** Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*; 33(2):110-118.
- Klein, A. . E., Gorrod, J. W. 1978.** Age as a factor in the metabolism of nicotine. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.* 1: 51-58.
- Konno, S., Oronsky, B.T., Semproni, A.R., Wu, J.M., 1991.** The effect of nicotine on cell proliferation and synthesis of secreted proteins in BALB/C 3T3 cells. *Biochem. Int.* 25, 7-17.
- Korner, F.W., Voom, J., 1978.** *Vitamins.* Basel: La Roche.
- Koster, A. S., Nieuwenhuis, L., Frankhuijzen-Sierevogel, A. C. 1989.** Comparison of microsomal drug-metabolizing enzymes in 14 inbred strains. *Biochem. Pharmac.* 38: 759-765.
- Kyerematen, G. A., Vesell, E. S. 1991.** Metabolism of nicotine. *Drug Metab. Rev.* 23: 3-41.

- Kyerematen, G. A., Morgan, M. L., Chattopadhyay, B., De Bethizy, J. D., Vesell, E. S. 1990a.** Disposition of nicotine and eight metabolites in smokers: identification in smokers of two metabolites that are longer lived than cotinine. *Clin. Pharmac. Ther.* 48: 641-651.
- Kyerematen, G. A., Morgan, M., Warner, G., Martin, L. F., Vesell, E. S. 1990b.** Metabolism of nicotine by hepatocytes. *Biochem. Pharmac.* 40: 1747-1756.
- Lee, B. L., Jacob, P., III, Jarvik, m. E., Benowitz, N. L. 1989.** Food and nicotine metabolism. *Pharmac Biochem. Behav.* 9: 621-625
- Liu F, Ng TB. 2000.** Effect of pineal indoles on activities of the antioxidant defense enzymes superoxide dismutase, catalase, and glutathione reductase, and levels of reduced and oxidized glutathione in rat tissues. *Biochem Cell Biol.* 78(4):447-53
- Livrea, M.A., Tesoriere, L., D'arpa, D. et al. 1997.** Reaction of melatonin with lipoperoxyl radicals in phospholipid bilayers. *Free Radical Biol. Med.* 23:706-711
- Lowry, O., Rosebrough, A., Farr, A., Randall, R. 1951.** Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Machlin, L. and Bendich, A. 1987.** Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *Faseb journal.* 1: 441-445.
- Maestroni, G.J.M., 2001.** The immunotherapeutic potentialof melatonin. *Exp. Opin. Invest. Drugs* 10: 467-476.
- Mahal, H.S., Sharma, H.S., Mukherjee, T., 1999.** Antioxidant properties of melatonin: a pulse radiolysis study. *Free Radical Biol. Med.* 26:557-565.
- Manchester, L.C., Poeggeler, B., Alvarez, F., Ogden, G.B., Reiter, R.J., 1995.** Melatonin immunoreactivity in the prokaryote *Rhodospirillum rubrum*: implications for an ancient antioxidant system. *Cell. Mol. Biol. Res.* 41: 391-395.
- Mandelzys, A., Cooper, E., 1992.** effects of ganglionic satellite cells and NGF on the expression of nicotinic acetylcholine currents by sensory neurons. *J. Neurophysiol.* 67: 1213-1221.
- Mansuy P, et al., 2000.** Hopital Pitie Salpetriere, France. *J Cardiovasc Pharmacol.*35:806-13. 42-47.
- Markey, B.A., Phan, S.H., Varani, J., Ryan, U.S., Ward, P.A., 1990.** Inhibition of cytotoxicity by intracellular superoxide dismutase supplementation. *Free Radic. Biol Med.* 9:307-314.
- Marshall, K.A., Reiter, R.J., Poeggeler, B. et al. 1996.** Evolution of the antioxidant activity of melatonin *in vitro*. *Free Radical Biol. Med.* 21:307-315.

- Masironi, R., Roy, L. 1982.** Cigarette smoking in young age group: unpublished document. WHO/SMO/82.3. World Health Organization, Geneva.
- Matuszak, Z., Rezska, K.J., Chignell, C.F. 1997.** Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radicals. ESR and spin trapping investigation. *Free Radical Biol. Med.* 23:367-372.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969.** Superoxide dismutase an enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244,6049-6055.
- McKennis, H., Jr, Turnbull, L. B., Bowman, E. R. 1963.** N-Methylation of nicotine and cotinine *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 238: 719-723.
- Meister, A., 1981.** Metabolism and functions of glutathione. *TIBS* 231-234.
- Miller, R.A., Britigan, B.E., 1997.** Role of Oxidants in Microbial Pathophysiology. *Clinical Microbiology Reviews*, vol.10(1): p. 1-18.
- Miners, J. O., Mackenzie, P.I., 1991.** Drug glucuronidation in humans. *Pharmac. Ther.* 51: 347-369.
- Morris, J.G., 1976.** *J. Appl. Bacteriol.* 40: 229-239.
- Nakagawa, M., Watanabe, H., Kodato, S. et al., 1977.** A valid model for the mechanism of oxidation of tryptophan to formylkynurenine - 25 years later. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 4:4730-4733.
- Navarro-Alarcon, M. and Lopez-Martinez, M.C., 2000.** Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *Sci Total Environ.* 2000;249:347-371.
- Nwosu, C. G., Crooks, P. A. 1988.** Species variation and stereoselectivity in the metabolism of nicotine enantiomers. *Xenobiotica* 18: 1361-1372.
- Nwosu, C. G., Godin, C. S., Houdi, A. A., Damani, A., Crooks, P. A. 1988.** Enantioselective metabolism during continuous administration of S-(-)- and R-(+)-nicotine isomers to guinea-pigs. *J. Pharm. Pharmac.* 40: 862-869.
- Obach, R. S., Van Vunakis, H. 1988.** Non-metabolic covalent binding of nicotine nicotine  $\Delta^{1(5)}$  iminium ion to liver microsomes and sulfhydryl-containing polyamino acids. *Biochem. Pharmac.* 37: 4601-4604.
- Okatani, Y., Wakatsuki, A., Reiter, R.J., Miyahara, Y., 2003.** Acutely administered melatonin restores hepatic mitochondrial physiology in old mice. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35: 367-375.
- Okey, A. B., 1990.** Enzyme induction in the cytochrome P-450 system. *Pharmac. Ther.* 45: 241-278.

- Pailer, M., 1964.** Chemistry of nicotine and related alkaloids (including biosynthetic aspects). In von Euler, U.S. ed. *Tobacco Alkaloids and Related Compounds*. The Macmillan Co.: New York. pp 15-36.
- Pantuck, E. J., Pantuck, C. B., Kappas, A., Conney, A. H., Anderson, K. E. 1991.** Effect of protein and carbohydrate content of diet on drug conjugation. *Clin. Pharmac. Ther.* 50: 254-258.
- Parker, L., 1991.** Protective role of vitamin E in biological systems. *Am. J. Clin. Nutr.* 53:1050-1055.
- Parlakpınar, H., Ozer, M.K., Sahna, E., Vardi, N., Cigremis, Y. And Acet, A., 2003.** Amicacin-induced acute renal injury in rats: protective role of melatonin. *J. Pineal Res.* 35: 85-90.
- Petersen, D. R., Norris, K. J., Thompson, J. A. 1984.** A comparative study of the disposition of nicotine and its metabolites in three inbred strains of mice. *Drug Metab. Disp.* 12: 725-731.
- Pierce, J. P., Fiore, M. C., Novotny, T. E., Hatziandreu, E. J., Davis, R. M. 1989.** Trends in cigarette smoking in the United States: Projections to the year 2000. *J. Am. Med. Ass.* 261:61-65.
- Pirei C., Marra, M., Morino, F. et al. 1994.** A peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci.* 55:271-276
- Pieri, C., Morino, M., Marcheselli, F. et al. 1995.** Melatonin is an efficient antioxidant. 22:159-165
- Poeggeler, B., Saarela, S., Reiter, R.J. et al. 1974.** Melatonin-a high potent endogenous scavenger and electron donor: New aspects of the oxidation chemistry of this indole assessed *in vitro*. *Ann. NY Acad. Sci.* 738:419-420.
- Pryor, W.A., 1994.** Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung. *Free Radic. Biol Med.* 17:451-465.
- Reiter, R.J., 1980.** The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocrine Rev.*, 1: 109-131.
- Reiter, R.J., 1991.** Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Rev.* 12: 151-180.
- Reiter, R.J., 1992.** The aging pineal gland and its physiological consequences. *Bio. Essays* 14: 169-175.
- Reiter, R.J., 1997a.** Aging and oxygen toxicity. *Age* 20: 201-213.
- Reiter, R.J., 1997b.** Antioxidant actions of melatonin. *Adv. Pharmacol.* 38: 103-117.

- Reiter, R.J., 1999.** Oxidative damage to nuclear DNA: amelioration by melatonin. *Neuroendocrinol. Lett.* 20: 145-150.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Acuna-Castroviejo, D., 2000.** Melatonin: mechanisms and actions as an antioxidant. *Curr. Topics Biophys.* 24: 171-183.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Burkhardt, S., Manchester, L.C., 2001.** Melatonin in plants. *Nutr. Rev.* 59: 127-128.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Rosa, M.S., Juan, C.M., Silvia, L.B., 2002.** Melatonin: reducing the toxicity and increasing efficacy of drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.*
- Rikans, L. E., Notley, B. A. 1981.** Substrate specificity of age-related changes in the inducibility of hepatic microsomal monooxygenases in middle-aged rats. *Mech. Aging Dev.* 16:371-378
- Rikans, L. E., Notley, B. A. 1982a.** Age- related changes in hepatic microsomal drug metabolism are substrate selective. *J. Pharmac. exp. Ther.* 220: 574-578.
- Rikans, L. E., Notley, B. A. 1982b.** Differential effects of aging on hepatic microsomal monooxygenase induction by phenobarbital and  $\beta$ -naphthoflavone. *Biochem. Pharmacol.* 31: 2339-2343.
- Roberts, J.E., Hu D.N., Martinez, L. 2000.** Photo physical studies on melatonin and its receptor agonists. *J. Pineal Res.* 24:94-99
- Rusteimer, K., Demetriou, D., Schepers, G., Voncken, P. 1993.** High performance liquid chromatographic determination of nicotine and its urinary metabolites via their 1,3-diethyl-2-thiobarbituric acid derivatives. *J. Chromatogr.* 613: 95-103.
- Saraste M., 1999.** Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science.* 283 1488-93.
- Sauer, L.A., Dauchy, R.T., Blask, D.E., 2001.** Polyunsaturated fatty acids, melatonin and cancer prevention. *Biochem. Pharmacol.* 61: 1455-1462.
- Scaiano, J.C., 1995.** Exploratory laser flash photolysis study of free radical reactions and magnetic field effects in melatonin chemistry. *J. Pineal. Res.* 19:189,195.
- Schmucker, D.L., Wang, R.K., 1980.** Age-related changes in liver drug metabolising enzymes. *Expl. Gerontol.* 15: 423-431.
- Seaton, M.J., Kyerematen, G.A., Morgan, M., Jeszenka, E.V., Vessel, E.S., 1991.** Nicotine metabolism in stump-tailed macaques. *Macaca arctoides*. *Drug Metab. Dispos.* 19:946-954.
- Seaton, M.J., Kyerematen, G.A., Vessel, E.S., 1993.** Rates of excretion of cotinine, nicotine-glucuronide and 3-hydroxycotinine glucuronide in rat bile. *Drug Metab. Dispos.* 21: 927-932.

- Sener-Muratoglu, G., Paskaloglu, K., Arbak, S., Hurdag, C., Ayanoglu-Dulger, G., 2001.** Protective effect of famotidine, omeprazole, and melatonin against acetylsalicylic acid-induced gastric damage in rats. *Dig. Dis. Sci.* 46(2): 318-30.
- Sheen, S.J., 1988.** Detection of nicotine in food and plant materials. *J. Food Sci.* 53: 1572-1573.
- Sheng, H.P., Yuen, S.T., So, H.L. and Cho, C.H., 2001.** Hepatotoxicity of prenatal and postnatal exposure to nicotine in rat pups. *Exp. Biol. Med.* Vol. 226(10): 934-939.
- Shida, C.S., Castrucci, A.M.L., Lamy-Freund, M.T., 1994.** High melatonin solubility in aqueous media. *J. Pineal Res.* 16: 198-201.
- Simic, G.M., 1997.** Oxygen radicals in biology and medicine, Plenum Press, Newyork and London.
- Smith, K.L., Hogan, J.S., Weiss, W.P., 1997.** Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. *J. Anim. Sci.* 75: 1659-1665.
- Snyder, M.J., Hsu, E.L., Feyereisen, R., 1993.** Induction of cytochrome P-450 activities by nicotine in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Chem. Ecol.* 19:2903–2916.
- Stalhandske, T., Slanina, P., Tjalve, H., Hansson, E., Schmitterlow, C.G., 1969.** Metabolism *in vitro* of <sup>14</sup>C-nicotine in livers of foetal, newborn and young mice. *Acta Pharmac. Toxic.* 27: 363-380.
- Stasica, P., Ulanski, P., Rosiak, J.M., 1998.** Melatonin as a hydroxyl radical scavenger. *J. Pineal. Res.* 25:65-66.
- Stefulj, J., Hörtner, M., Ghosh, M., Schauenstein, K., Rinner, I., Wölfer, A., Semmler, J., Liebmann, P.M., 2001.** Gene expression of key enzymes of melatonin synthesis in extra pineal tissues of the rat. *J. Pineal Res.* 30: 243-247.
- Sun, J., Lau, P.P., Strobel, H.W., 1986.** Aging modifies the expression of hepatic microsomal cytochromes P-450 after pretreatment of rats with  $\beta$ -naphthoflavone or phenobarbital. *Expl. Gerontol.* 21: 65-73.
- Suzuki, K., Horiguchi, T., Comas-Urrutia, A.C., Mueller-Heubach, E., Moishima, H.O., Adamsons, K., 1974.** Placental transfer and distribution of nicotine in the pregnant rhesus monkey. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 119: 253-262.
- Şener, G., Kaçmaz, A., User, Y., Ozkan, S., Tilki, M., Yeğen, B.Ç., 2003a.** Melatonin ameliorates oxidative organ damage induced by acute intra-abdominal compartment syndrome in rats. *J. Pineal Res.* 35: 163-168

- Şener, G., Şener, Şehirli, A.Ö., Ayanoglu-Dülger, G., 2003b.** Melatonin Protects Against Mercury(II)-Induced Oxidative Tissue Damage in Rats. *Pharmacology & Toxicology*. 93: 290–296.
- Tan, D.X., Chen, L.D., Poeggeler, B. et al., 1993a.** Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocri. J.* 1: 57-60.
- Tan, D.X., Poeggeler, B., Reiter, R.J., Chen, L.D., Chen, S., Manchester, L.C., Barlowwalden, L.R., 1993b.** The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole *in vivo*. *Cancer Letters*, 70: 65-71.
- Tan, D.X., Reiter, R.J., Chen, L.D., Poeggeler, B., Manchester, L.C., Barlowwalden, L.R., 1994.** Both physiological and pharmacological levels of melatonin reduce DNA adduct formation induced by the carcinogen safrole. *Carcinogenesis*, 15: 215-218.
- Tan, D.X., Manchester L.C., Reiter R.J. et al., 1998.** A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of *in vivo* hydroxyl radical generation. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 253:614-620.
- Tan, D.X., Manchester L.C., Reiter R.J. et al., 2000.** Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radical Biol. Med.* 29:1177-1185.
- Tan, D.X., Manchester L.C., Burkhardt, S., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Kohen, R., Shohami, E., Huo, Y.X., Hardeland, R., Reiter, R.J., 2001.** N<sup>1</sup>-acetyl-N<sup>2</sup>-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, function as a potent antioxidant. *FASEB J.* 15: 2294-2296.
- Tjalve, H., Hanson, E., Schmitterlow, C.G., 1968.** Passage of <sup>14</sup>C-nicotine and its metabolites into mice fetuses and placentae. *Acta Pharma. Toxic.* 26: 539-555.
- Topsakal, C., Kilic, N., Ozveren, F., Akdemir, I., Kaplan M., Tiftikci, M., Gursu, F., 2003.** Effects of prostaglandin E1, melatonin, and oxytetracycline on lipid peroxidation, antioxidant defense system, paraoxonase (PON1) activities, and homocysteine levels in an animal model of spinal cord injury. *Spine.* 1; 28(15): 1643-1652.
- Turjanski A.G., Rosenstein R.E., Estrin, D.A., 1998.** Reaction of melatonin and related indoles with free radicals: a computational study. *J. Med. Chem.* 41: 3684-3689.
- Uchida, K., Enomoto, N., Itakura, K., et al., 1990.** Formation of diastereoisomeric 3 $\alpha$ -hydroxypyrrroloindoles from a tryptophan residue analog mediated by iron (II)-EDTA and l-ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 279: 14-20.

- Van Tassel, D., Roberts, N., Lewy, A., O'Neill, S.D., 2001.** Melatonin in plant organs. *J. Pineal Res.* 31: 8-15.
- Vestal, R.E., McGuire, E.A., Tobin, J.D., Andres, R., Norris, A.H., Mezey, E., 1977.** Aging and ethanol metabolism. *Clin. Pharmac. Ther.* 21: 343-354.
- Weiss, S.J., 1989.** Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 7:320-365.
- Wetscher, G.J., Bagchi, M., Bagchi, D., Perdakis, G., Hinder, P.R., Glaser, K., Hinder, R.A., 1995.** Free radical production in nicotine treated pancreatic tissue. *Free Radic Biol Med.* 18(5):877-82.
- Yang, C.S., Brady, J.F., Hong, J.Y., 1992.** Dietary effects on cytochrome p-450, xenobiotic metabolism and toxicity. *FASEB J.* 6: 737-744.
- Yildiz, D., Ercal, N., Armstrong, D.W., 1998.** Nicotine Enantiomers and Oxidative Stress. *Toxicology*, 130 (2&3): 155-165.
- Yildiz, D., Liu, Y.S., Ercal N., Armstrong, D., 1999.** "Comparison of Pure Nicotine and Smokeless Tobacco Extract Induced Toxicity and Oxidative Stress," *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37: 434-439, 1999.
- Zang, L.Y., Cosma, G., Gardner, H. et. al. 1998.** Scavenging of reactive oxygen species by melatonin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1425: 467-477.
- Zbinden, G, Flury-Roversi, M., 1981.** Significance of the LD50-Test for the Toxicological Evaluation of Chemical Substances. *Arch. Toxicol.* 47: 77-99.
- Zigler, J.S. and Goosey, J.D., 1981.** *Photochem. Photobiol.* 33: 869-874.
- Zino, S., Skeaff, M., Williams, S., Mann, J., 1997.** Randomised controlled trial of effect of fruit and vegetable consumption on plasma concentration of lipids and antioxidants. *BMJ* 21; 314: 1787-1791.

## 7. ÖZGEÇMİŞ

07.11.1978 İstanbul doğumluyum. İlköğrenimime Beyoğlu Dr.Tevfik Sağlam İlköğretim okulunda başladım. İlköğretimimi ARTVİN/Arhavi Atatürk ilköğretim okulunda, lise öğrenimimi İstanbul Atatürk Lisesinde tamamladım. 1996 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazanarak yüksek öğrenimime başladım ve 2000 yılında mezun oldum. Aynı yıl Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünün açmış olduğu yüksek lisans sınavına girerek Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladım. Biyoloji Anabilim Dalına araştırma görevlisi olarak görev yapmaktayım.Yabancı dilim ingilizcedir.

