

T1214

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KÜMEN HİDROPEROKSİDLE PEROKSİDE EDİLMİŞ
LÖKOSİTLER ÜZERİNE BİLİRÜBİNİN ANTIOKSİDAN ETKİSİ

T1214/1-1

İHTİSAS TEZİ
Dr. Remel ALTINAYAK

TEZ YÖNETİCİSİ
Yrd. Doç. Dr. Akın YEŞİLKAYA

ANTALYA-1997

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

(Kaynak gösterilerek tezinden faydalanılabilir.)

TEŞEKKÜR

Tezimde kullanılmak üzere gerekli olan numunelerin temini aşamasında, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Kan Bankası'nda sağlıklı donörlerden kan eldesi hususunda yardımlarını esirgemeyen Kan Bankası Sorumlusu Prof. Dr. Levent Ündar'a , Kan Bankası çalışanlarına ve kanlarını vermeyi kabul eden donörlere, tezimin yapılışı esnasında bilgi ve tecrübe yönünden yardımcı olan değerli hocalarım, teknik yönden yardımcı olan uzman ve asistan arkadaşlarıma, ayrıca tezimin yazılması aşamasında bilgisayarını kullandırma nezaketini gösteren Uzm.Dr. Kadir Dalcı'ya teşekkür ediyorum.

26.12.1996
Dr. Resul ALTINAYAK

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
I- KISALTMALAR	1
II- GİRİŞ VE AMAÇ	2
III- GENEL BİLGİLER	4
A- LÖKOSİTLER	4
B- REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ	5
1- Süperoksid Anyon Radikali	6
2- Hidrojen Peroksid	8
3- Hidroksil Radikali	8
4- Singlet Oksijen	10
C- ARTMIŞ SERBEST RADİKALERİN ZARARLARI	10
D- LİPİD PEROKSİDASYONU MEKANİZMALARI	11
1- Başlangıç Aşaması	11
2- İlerleme Aşaması	12
3- Sonlanma Aşaması	13
E- MALONDİALDEHİD	13
F- ANTIOKSİDANLAR	14
1- Hücresele Antioksidanlar	15
2- Membran Antioksidanları	16
3- Ekstrasellüler Antioksidanlar	16
G- SÜPEROKSİD DİSMUTAZ (SOD)	17
H- KATALAZ	19
I- REDÜKTE GLUTATYON (GSH)	20
J- ANTIOKSİDAN OLARAK BİLİRÜBİN	22
IV- MATERYAL VE METODLAR	25
A- MATERYALLER	25
B- NUMUNE ELDESİ	25
C- METODLAR	26
1- Lökosit İzolasyonu	26
2- Protein Ölçümü (Lowry Metodu)	27
3- Lökositlerin Oksidan Ve Antioksidan Maddelerle İnkübasyonu	29
4- TBARS Ölçümü	30
5- Süperoksid Dismutaz (SOD) Ölçümü	32
6- Katalaz Aktivitesi Tayini	35
7- Redükte Glutatyon (GSH) Tayini	37
8- İstatistik Hesaplamaları	38
V- SONUÇLAR	39
1- TBARS ÖLÇÜMÜ	39
a- Spektrofotometrede	39
b- Florometrede	41
2- SÜPEROKSİD DİSMUTAZ ÖLÇÜMÜ	43
3- KATALAZ AKTİVİTESİ ÖLÇÜMÜ	45
4- GSH ÖLÇÜMÜ	46
VI- TARTIŞMA	50
VII- ÖZET	60
VIII- SUMMARY	61
IX- KAYNAKLAR	62

I. KISALTMALAR

BR :	Bilirubin
CuOOH:	Kümen Hidroperoksid
DLPC :	Dilinoleoil Fosfotidil Kolin
EDTA :	Etilen Diamin Tetra Asetik Asid
FADH ₂ :	Redükte Flavin Adenin Dinükleotid
GSH :	Redükte Glutatyon
GSH-Px :	Glutatyon Peroksidaz
GSSG :	Okside Glutatyon
G6PD :	Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz
HOCl :	Hipoklorik Asid
HMP :	Heksoz Mono Fosfat
HO ₂ · :	Hidroperoksil Radikali
H ₂ O ₂ :	Hidrojen Peroksid
LPO :	Lipid Peroksidasyonu
MDA :	Malondialdehid
MPO :	Miyeloperoksid
NADH :	Redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADPH :	Redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
*OH :	Hidroksil Radikali
¹ O ₂ :	Singlet Oksijen
O ₂ ⁻ :	Süperoksid Anyonu
PMA :	Forbol Miristat Asetat
PMN :	Polimorfonükleer
PUFA:	Poli Unsature Yağ Asidi
R· :	Serbest Radikal
RO· :	Alkoksil Radikali
ROO· :	Peroksil Radikali
ROOH :	Lipid Hidroperoksid
RS· :	Tiyol Radikali
SOD :	Süperoksid Dismutaz
TBA :	Tiyobarbitürik Asid
TBARS :	Tiyobarbitürik Asid Reaktif Maddeler
t-BHP :	t- Bütül Hidroperoksid

II. GİRİŞ VE AMAÇ

Katı ve sıvı yağların korunması ve saklanması eski zamanlardan beri insanlığın ilgisini uyandırmıştır. Katı ve sıvı yağlar, yapısında, renginde, tadında ve kokusunda karakteristik değişikliklerle okside edilir. Kokuşmuşluk olarak bilinen bu işlem kimyasal olarak 1940'larda oksidatif serbest radikal zincir reaksiyonu olarak tanımlanmıştır. Biyolojik sistemlerde; poliunsature yağ asitleri'nin (PUFA) serbest radikal oksidasyonu, lipid peroksidasyonu (LPO) olarak bilinir (5).

Lipidlerin peroksidasyonu ve fagositoz olayı biyolojik sistemlerde meydana gelen son derece önemli reaksiyonlardır. Glikolizis, yağ asidi oksidasyonu ve sitrik asid siklusu esnasında meydana gelen NADH ve FADH₂, mitokondride oksidatif fosforilasyona uğramakta ve redüksiyon aşamaları sonucunda su oluşmaktadır. Ancak bu redüksiyon sırasında reaksiyonun kısmen cereyan etmesi, süperoksid anyonu (O₂⁻), hidroksil radikali ([•]OH), singlet oksijen (¹O₂) ve hidrojen peroksid (H₂O₂) gibi toksik oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (25).

Fagositoz olayı esnasında polimorfonükleer (PMN) lökositlerde meydana gelen solunum patlaması da bu toksik oksijen radikallerinin üretiminden sorumlu olan diğer bir mekanizmadır. Bu nedenle normal metabolizma sırasındaki oksido-redüksiyon işlemlerinin ürünleri olan serbest oksijen radikallerinin oluşması biyolojik bir bozukluk olarak nitelendirilmemelidir (25).

Ancak hiperoksi durumunda, inflamasyonda ve radyasyon gibi çevresel faktörlerin etkisiyle bu radikallerin üretimi son derece artmakta ve membranlar, enzimler, nükleik asitler ve polisakkaritler üzerinde toksik etkiler yaparak çeşitli doku hasarlarına neden olmaktadır.

Vücudun, farklı hücrel kompartmanları içinde, serbest oksijen radikallerinin oluşturacağı oksidatif stresle uğraşacak bir müdafaa hiyerarşisi vardır (5). Bu amaçla organizmalar biyolojik bütünlüklerini, hasardan korumak için endojen koruma sistemlerine sahiptirler. A, C ve E vitaminleri; glutatyon ve sistein gibi sülfidril grubu ihtiva eden bileşikler; Zn, Mn, Cu gibi eser elementler; süperoksid dismutaz (SOD) ve katalaz gibi antioksidan enzimler oksijen

sitotoksitesine karşı hücrel savunma mekanizmasında yer alan başlıca bileşiklerdir (25).

Süperoksid, H_2O_2 , hipoklorik asid (HOCl), hidroksil, alkoksil ve peroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin üretimi ile onlara karşı oluşan antioksidan müdafalar arasındaki dengenin bozulması, doku hasarını amplifiye eden oksidatif stresi oluşturur (5).

Bilirubin'in (BR), fizyolojik önemi olan bir antioksidan olduğunu ifade eden çeşitli çalışmalar mevcuttur (12,13,22). Buna göre şimdiye kadar yapılan çalışmalarda BR'in antioksidan sistemde, aşağıda ifade edilen rolleri üstlendiği gözlenmiştir:

Konjuge edilmemiş BR, albümine bağlı BR ve konjuge edilmiş BR kimyasal olarak oluşturulmuş peroksil radikallerini etkili bir şekilde yakalamaktadırlar (12,13,22,23).

BR'in in vitro olarak linoleik asid gibi doymamış yağ asidlerinin hava veya UV ışıkla oluşmuş otooksidasyonunu engellemektedir. BR, doymamış yağ asidlerinin (linoleik asid) radikal zincir reaksiyonu şeklindeki oksidasyonunu inhibe etmekte ve işlem sırasında kendisini yıkmaktadır (12).

BR, liposomlarda küçük kısmi oksijen basıncı altında oksidasyonu ve serbest radikal zincir reaksiyonlarını süprese etmektedir (12,13,23). Konjuge olmamış BR, biyolojik membranların içine ve aralarına kolayca diffüze olmakta (12) ve bununla birlikte membrana bağlı α -tokoferolle LPO'nu önlemede sinerjetik etki oluşturabilmektedir (13).

Konjuge edilmemiş BR, H_2O_2 veya organik hidroperoksidlerin varlığında peroksidazlar için bir indirgeyici substrat olarak davranmaktadırlar. BR, radikal olmayan bir başka oksijen formunu da (1O_2) deaktive ve detoksifiye etmektedir (12,22).

Bu çalışmalar, BR'in in vivo olarak bir biyokimyasal fonksiyonunun olduğunu ve endojen organik serbest radikallerle oluşmuş hücrel hasarı engellemeyi sağlayan düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar grubuna ait olduğunu önermektedirler (12). Veriler ayrıca BR'in bir fizyolojik zincir kırıcı antioksidan olarak faydalı bir rolünün olduğu fikrini de desteklemektedir. Gerçekten BR uzun, konjuge edilmiş çift bağlar sisteminin yanında reaktif bir hidrojen atomu içerir ki, antioksidan özelliği de onun bu hidrojen atomunu verme yeteneğinden ileri geldiği bilinmektedir (22,23).

BR'in engelleyici fonksiyonunun yakın bir keşif olduğu bilinmektedir. Ancak şu anda konjuge BR'in potansiyel antioksidan aktivitesi hakkında pek az bilgi mevcuttur (22).

Çalışmamızda BR'in yukarıda sayılan ve daha önce araştırılmış antioksidan özelliklerine ilaveten konjuge BR'in ortamda farklı konsantrasyonlarda bulunduğu zaman LPO'nu ne şekilde etkileyeceğini araştırdık. Bunun için, lipid peroksidasyon göstergesi olarak bilinen malondialdehid (MDA veya diğer adı ile TBARS) oluşumunu seçtik. Bunun yanında BR'in hücre içi antioksidanlarıyla (SOD, katalaz ve GSH) olan ilişkisini araştırdık. Literatürde buna benzer araştırmaların eritrositlerde yapılmış olmasından dolayı biz hücre modeli olarak lökositleri seçtik. Bu çalışma, BR'in antioksidan özelliklerini ve diğer antioksidan maddelerle olan ilişkisini anlamada yardımcı olacağı düşünülmektedir.

III. GENEL BİLGİLER

A. LÖKOSİTLER :

Lökosit; Hemoglobin içermediği için, beyaz kan hücresi de denen, çekirdekli kan hücresidir. Nötrofilleri, lenfositleri, monositleri, eosinofilleri, bazofilleri ve makrofajları içeren bu hücreler vücut savunma sisteminde ve immun cevapta önemli rol oynarlar. Lökositler polimorfonükleer (PMN) ve mononükleer lökositler olmak üzere ikiye ayrılırlar. PMN lökositler arasında nötrofiller, bazofiller ve eozinofiller yer alırken, mononükleer lökositler arasında lenfositler ve monositler yer alır (3).

Mononükleer hücreler antijen işleme ve takdim olaylarında rol oynayarak konakçı immun cevabında görev alırlar. Bu olay özellikle infeksiyöz ajanlara karşı ve tümör hücre sitotoksisinde vücut savunması için önemli bir yer tutar (3).

İnflamatuar olayda rol alan PMN lökositler ve makrofajlar (doku seviyesindeki monositler) damar duvarına yapışma, damar dışına geçme, iltihap odağında toplanma, yabancı hücre sindirimi gibi özelliklerin yanında bakterisidal ve sitotoksik aktivite için de respiratuvar patlama yapabilme ve bu patlama sonucunda O_2^- ve H_2O_2 salgılama yeteneğine sahiptirler (35)

İnflamatuar hücrelerin çoğu; polimorfonükleer hücreler (Babior ve ark. 1973), monositler (Johnston ve ark. 1976), makrofajlar (Johnston ve ark. 1978) ve eosinofiller (De Chatelet ve ark. 1977) (6) belirli uyarılarla temas halinde buldukları zaman granül içerikli enzimler salgılayarak O_2^- ve H_2O_2 gibi oksijen radikalleri oluştururlar. Bu oksidatif cevap, solunumsal patlama (respiratuvar burst) olarak bilinir ve membran bağlı NADPH Oksidaz'ın aktivasyonu ile ilgilidir. Kronik granüloamatöz hastalığındaki hasarlı oksidaz aktivitesine bağlı olarak ortaya çıkan ciddi enfeksiyonlar nötrofiller tarafından salınan toksik oksijen metabolitlerinin üretimini önemini açıkça göstermektedir (11, 31).

Bundan başka PMN lökositler in vitro ortamda fagositik aktivitenin ölçümü için kullanılan forbol miristat asetat (PMA) ile stimule edildikleri zaman da respiratuvar patlama

yapabildikleri gibi, opsonize olmuş bakterilerden başka, viruslar, immünglobulinler, immun kompleksler de respiratuvar patlamaya neden olabilirler (31).

Herhangi bir inflamasyon esnasında, PMN lökositler ve makrofajlar aktive edilerek dokulara infiltre olması ve bakterilerle karşılaşmaları sağlanır. Bu hücreler bakterileri ve virüsleri fagositik vakuol içine alırlar ve büyük miktarda oksijeni hızlı bir şekilde tüketerek O_2^- , H_2O_2 , HOCl ve N-kloraminler (RNHCl) gibi reaktif oksijen metabolitleri oluştururlar. (Light ve ark. 1981) (28,31,35). Bu hayli toksik oksijen radikal türleri içeri alınmış bakterilerin ve virüslerin öldürülmesinde önemli rol oynarlar (2,6,31). Bu bileşikler sadece mikroorganizmalara karşı saldırmanın yanında, DNA'nın yıkımına ve mikrotübüllerin disfonksiyonunu içeren doku hasarına da neden olurlar (28).

Zhao ve ark. (1989) respiratuvar patlama sırasında oksijen tüketiminin esas olarak intersellüler aralıkta bulunduğunu, diğer bir deyişle, O_2^- üretici enzimlerin hücre membranında olduğunu ve PMN membranlarının dış tabakasına yakın olabileceğine dikkat çekmişlerdir (31).

Bu hücrelerin O_2^- ve H_2O_2 üretme yetenekleri, ayrıca inflamasyonun olduğu dokunun hasarında da önemli olduğu tesbit edilmiştir. SOD ve katalazın ise bu tür hücre hasarını in vivo olarak engellediği gösterilmiştir (6).

Bununla birlikte ne O_2^- 'in ne de H_2O_2 'in, hücresel oluşumların oksidasyonunu doğrudan başlatacak kadar yeterli reaktivitede olmadığı hesaba katılmalıdır. Bundan dolayı O_2^- ve H_2O_2 'in zararlı etkilerinin $\cdot\text{OH}$ gibi daha reaktif radikallere bağlı olduğu düşünülür (28,35).

Oksiradikal başlatıcı türlerin kaynakları çok tartışma konusu olmuştur. Redoks döngüsü, otooksidasyon, mitokondriyal ve endoplazmik retikulum elektron transport zincirinde elektron akışı, peroksizomlar, prostoglandin sentezi ve ksantin oksidazın hepsi serbest oksijen radikallerinin kaynaklarıdır (35).

Aktive edilmiş PMN ile otoyarananma oluşumu, pekçok kritik hastalığın fizyopatolojisini hazırlayabilir. Adult respiratuvar distress sendromu, pulmoner oksijen toksisitesi, bronkopulmoner displazi, sepsis, septik şok ve miyokardiyal infarktüs, stroke, kardiyopulmoner bypass, organ transplantasyonu gibi değişik iskemi-reperfüzyon sendromları (35), kanser patolojisi, yaşlanma, tümör hızlanması, kronik iltihap ve parazitik infestasyonlar (23) gibi değişik kritik hastalıkların fizyopatolojisinde PMN ile oluşturulmuş inflamasyon yaralanmalarının önemli rolleri vardır.

B. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ

Oksijen havada dioksijen veya moleküler oksijen olarak bilinen bir molekül (O_2) halinde bulunur. Kuru havada % 78'lik nitrojenden sonra atmosferde en çok bulunan ikinci element oksijendir (\approx % 21) (5).

Oksijen, hayat için esas olan kimyasal ve ısı enerjisini elde etmek için, karbon ve hidrojen zengin maddelerin (yiyecekler) okside edilmesinde kullanılır (5).

Normal şartlar altında oksijen stabil, kokusuz, tatsız, renksiz ve suda sınırlı çözünen bir

gazdır. 100 volüm suda, 3 volüm gaz çözünür. Bu sınırlı çözünürlük sudaki hayat için çok önemlidir ve insanlarda normal solunum fonksiyonları için esastır. Suda çözünen hava yüksek oranda O_2 içerirken (%34), nitrojenin suda çözünürlüğünün düşük olması (100 volüm suda \approx 2 volüm) nedeniyle, kuru havadakine göre daha azdır. Diğer elementlerle karşılaştırıldığı zaman oksijen, en yüksek 3. elektron afinitesine sahiptir ve beklenenden daha reaktiftir (5).

Moleküler oksijen temel enerji düzeyinde spinleri aynı yönde olan ortaklanmamış iki elektron çifti taşımaktadır. Bu nedenle oksijenin reaktivliği maskelenir ve sadece bu spin kısıtlamasının üstesinden geldiği zaman oksijenin gerçek reaktivliği izah edilebilir (5, 25).

Aerobik eukaryotik hücrelerde ve organizmalardaki moleküler oksijenin çoğu, solunum zinciri yoluyla suya indirgenmesine rağmen, oksijenin hem ünivalan, hem de bivalan indirgenmesi, normal ara metabolizma esnasında O_2^- ve H_2O_2 oluşturmaktadır (23). Bu reaktif oksijen türlerinin $\cdot OH$ gibi diğer reaktif oksijen türlerini oluşturma potansiyeli vardır. Oluşan bu $\cdot OH$ de yoğun bir lipid hidroperoksid oluşumuna yol açan radikal zincir reaksiyonunu başlatabilir. Reaktif oksijen türlerinin çoğu hücrel fonksiyonlar için temel teşkil eder. Bakteri sindirimi ve fagositlerce öldürülmesi buna bir örnektir (2,23).

Serbest oksijen radikalleri, doymamış bağlarla ve sülfür ihtiva eden moleküllerle kolaylıkla reaksiyona girerler. Bu nedenle triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin ve sistein gibi amino asitleri ihtiva eden proteinler serbest radikal hasarı sonucunda denatüre olmaktadır (25).

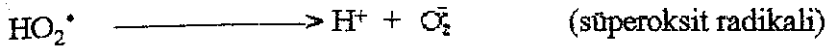
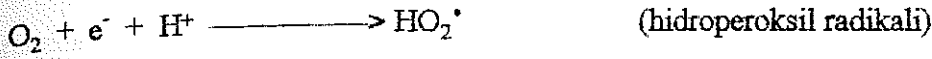
Serbest radikaller hücre metabolizması sırasında cereyan eden biyokimyasal redoks reaksiyonları ile ortaya çıkan çiftleşmemiş elektrona sahip moleküllerdir. Diğer bir ifadeyle serbest radikal; bir veya birden fazla eşleşmemiş elektron içeren ve bağımsız bir şekilde bulunma kabiliyetine sahip olan herhangi bir kimyasal maddedir. Bu tanımlama, geçiş metal iyonlarının çoğunun, serbest radikaller olarak sınıflandırılmasına imkan tanınması nedeniyle tercih edilir ve bundan dolayı da oksijen ve reaktif metal iyonları arasındaki yakın ilişkinin daha iyi anlaşılmasını sağlar. Gamma radyasyonu, UV ışını, çevre kirleticileri ve sigara dumanına maruz kalma ile serbest radikal oluşumu görülmüştür (5).

Bir yanda yüksek düzeydeki reaktif oksijen türlerinin aerobik yaşam için gerekli olması, diğer yandan da bu tür toksik oksijen türlerinin organizmaya oldukça zarara yol açması birbirine zıt gibi görünen iki husustur. Gerçekten serbest radikal reaksiyonlarının dejeneratif olaylara büyük oranda sebebiyet verdikleri ve sonunda hücrel yıkılıma ve yaşlanmaya neden olduklarına dair pek çok delil vardır (2).

Bilinen başlıca oksijen radikalleri; süperoksid anyon radikali (O_2^-), H_2O_2 , $\cdot OH$ ve 1O_2 'dir.

1. Süperoksid Anyon Radikali (O_2^-) :

Süperoksit anyonu, oksijenle yaşayan bütün canlılarda kaçınılmaz bir şekilde meydana gelir. O_2^- , oksijenin Π^*2p orbitallerinden birine bir elektron girdiği zaman oluşur (5,25).

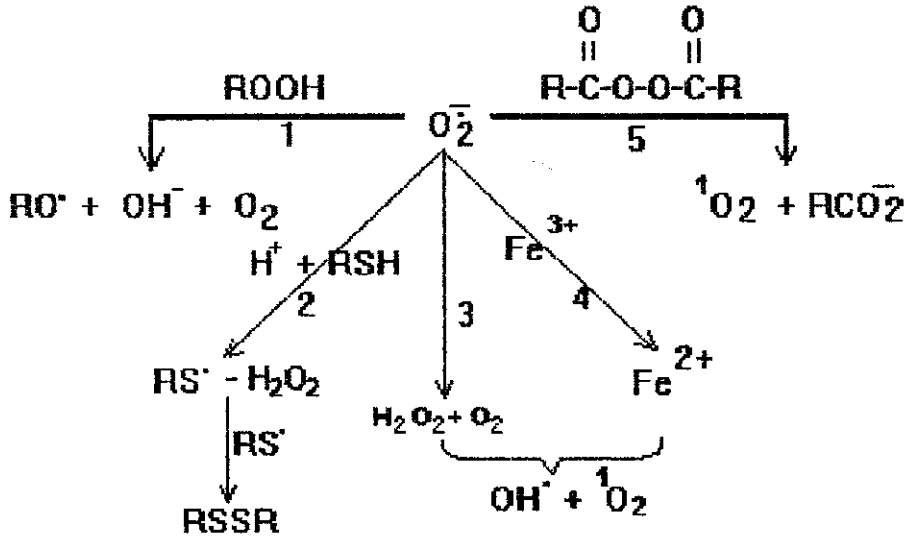


pH = 7.4'de, 4.8'lik bir pKa değerine sahip hidroperoksil radikali (HO_2^\bullet), süperoksit anyon radikalini vermek üzere dissosiyeye olur. Burada dissosiyasyondaki pK değeri hesaplamalarında, asid olarak HO_2^\bullet ve baz olarak da $^\bullet\text{OH}$ kullanılmıştır (5).

Süperoksit kimyası çözünme ortamına bağlı olarak farklılık göstermektedir. O_2^- sıvı solüsyonlarda askorbik asid ve tiyol gibi molekülleri okside edebilen zayıf bir okside edici ajanken, sitokrom-C ve ferric-Etilen Diamin Tetra Asetik Asid (EDTA) gibi çeşitli demir komplekslerini indirgeyebilen daha güçlü bir redüktandır (5).

O_2^- , başka organik radikallerin oluşumuna neden olarak toksik etki gösterebilmektedir. Biyolojik sistemlerde O_2^- nin neden olduğu tepkimeleri şekil 1'de özetleyebiliriz (25):

1. Tepkime ; O_2^- , organik hidroperoksitlerle alkoksil radikallerinin oluşumu,
2. Tepkime ; süperoksit radikalleri, tiyol radikallerinin(RS^\bullet) oluşumuna neden olarak SH gruplarını disülfidlere oksitlenmesi,
3. Tepkime ; spontan dismutasyon reaksiyonu,
4. Tepkime ; oksijen radikallerinin redüktan özelliğinden dolayı Fe^{3+} ün Fe^{2+} ye dönüşümü,
5. Tepkime ; diaçil peroksitlerle $^1\text{O}_2$ üretimi.



Şekil 1: Süperoksit radikalinden farklı reaksiyonlarla değişik radikallerin oluşumu.

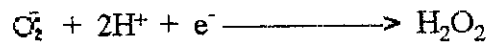
Oluşan reaktif ürünlerin hepsi biyolojik yaşam için tehlikelidir. Vücut koruma mekanizması olarak sürekli bir şekilde SOD, süperoksit anyonunu dismutasyon reaksiyonuyla

ortamdan hızla uzaklaştırarak O_2^- 'nin neden olduğu diğer organik radikallerinin oluşumunu engellemektedir. SOD'nin katalizlediği reaksiyon sonucu H_2O_2 ve O_2 oluşur (5,25).

O_2^- , biyolojik membranları kolayca geçebilme özelliğine sahiptir (28). Süperoksidin protonlanmış hali olan HO_2^* , süperoksidden hem daha güçlü bir oksidan, hem de daha güçlü bir redüktandır. Ancak asit ortamda aktivite gösterdiğinden pH: 7.4'de çok az miktarda bulunur (5).

2. Hidrojen Peroksid (H_2O_2):

Süperoksid oluşturan herhangi bir sistem, dismutasyon reaksiyonu sonucu olarak H_2O_2 'de oluşturacaktır.



Aerobik dehidrogenazlar ve O_2^- 'nin dismutasyonu sonucu H_2O_2 oluşturulduğu gibi, ürat oksidaz, glukoz oksidaz ve D-aminoasid oksidaz gibi pek çok enzim de, oksijene iki elektron transfer ederek H_2O_2 oluşturabilir (5,25).

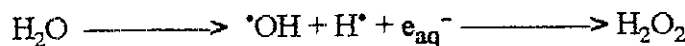
H_2O_2 , zayıf bir oksidan ve geçiş metal iyonlarının yokluğunda kısmen stabil olan zayıf bir redüktandır. Molekülün yüklü olmayan kovalent bir yapısı vardır. Suyla kolayca karışır ve vücut tarafından, bir su molekülü gibi muamele görür. H_2O_2 , her ne kadar biyolojik membranlardan, fosfolipidlerden, karbohidratlardan, metaloproteinlerden ve DNA'dan geçme yeteneğine sahip olsa da, kendi başına bir serbest radikal değildir. Fakat *OH radikali oluşumunda en büyük rolü üstlenmektedir (5).

H_2O_2 'in redoks özellikleri, geçiş metal iyonlarının varlığında, oldukça reaktif serbest radikalleri oluşturma yeteneğine sahiptir. Hücrelerde istenmeyen H_2O_2 , katalazın, glutatyon peroksidazın (GSH-Px) (selenyum içeren) ve diğer bazı peroksidazların etkisi yanında, doymamış yağ asidlerinin, proteinlerin, DNA ve karbohidratların etkisiyle de ortadan kaldırılabılır (Şekil:2). Katalaz ve GSH-Px ; H_2O_2 'i, H_2O 'ya indirgeyerek, *OH oluşumunu azaltırlar (5).

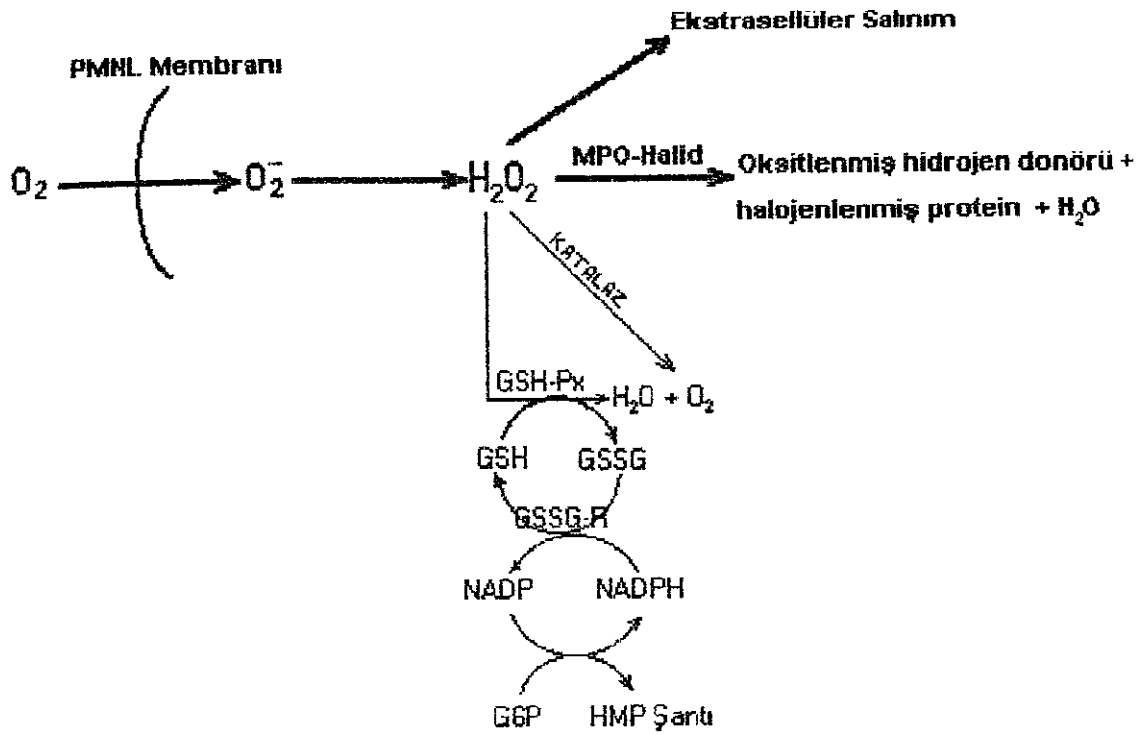
H_2O_2 'in ekstrasellüler salınımı yanında, miyeloperoksid (MPO)-halid etkileşmesiyle oksidlenmiş hidrojen donörü, halojenlenmiş protein ve su oluşturabilir (Şekil 2) (25).

3. Hidroksil Radikali (*OH) :

Hidroksil radikali (*OH), suyun yüksek enerjili iyonizasyonundan (radyolizis) oluşan önemli bir üründür (5).

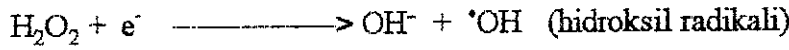


aq = sulu, sıvı



Şekil 2: H₂O₂ 'in katabolizma yolları (25)

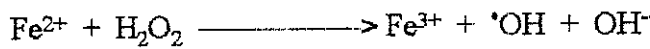
İlk olarak radyasyon kimyacıları tarafından yapılan çalışmalarda elde edilen bir radikaldir (5). Yüksek derecede reaktif ve kısa ömürlü olan [•]OH biyolojik sistemlerde de meydana gelmekte ve aktif bir ajan olarak fizyolojik olaylara iştirak etmektedir (25).



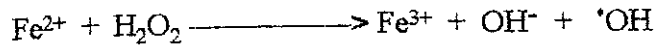
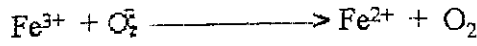
Hidroksil radikalindeki hidrojen atomunda eşleşmemiş bir elektronun olduğundan bahsedilerek, OH[•] şeklinde gösterilmesine rağmen, eşleşmemiş atomun hidrojende değil de oksijende ([•]OH) olması nedeniyle bu ifade doğru değildir (5).

In vivo sistemlerde [•]OH oluşturan en önemli iki reaksiyon, Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonudur (5,25).

Fenton reaksiyonu; H₂O₂'in intrasellüler konsantrasyonu yeterli olduğu zaman meydana gelebilir (25).



Haber-Weiss reaksiyonu ; metal iyonları ile katalizlenmektedir ve önemli miktarda [•]OH üretilir (25).



*OH'leri; biyolojik sistemlerde oluşmuş çok güçlü oksidanlar olup membranlar, enzimler, nükleik asitler ve polisakkaritler gibi biyolojik moleküller üzerine etkili reaktif bileşiklerdir. *OH'leri LPO'nu başlatmak için PUFA'lerine saldırabilirler. Bunun sonucunda çeşitli doku hasarlarına neden olurlar. Büyük orandaki hasarlar hücrenin ölümü ile sonuçlanır veya bazı genetik değişikliklerden dolayı kansere neden olabilir. Bunlara rağmen fagositoz olayı sırasında fizyolojik olarak *OH meydana gelir ve bakteriyolojik aktivite için gereklidir (5,25).

4. Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$):

Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$); eşleşmemiş bir elektrona sahip olmadığından serbest radikal değildir. $^1\text{O}_2$, normal bazal enerji seviyesinin üstünde yayılabilen uyarılmış durumdaki enerji seviyesine yükselmiş alelade bir dioksijendir. Paralel spinli eşleşmemiş iki elektron (spin kısıtlaması) ortadan kaldırıldığı için okside edici yeteneği artar. Bununla birlikte oksijenin oldukça reaktif bir formudur ve çok toksiktir. Fotokimyasal reaksiyonlarda $^1\text{O}_2$ oluşumu oldukça önemlidir (5,25).

Moleküler oksijenden, delta singlet oksijen ($\Delta^1\text{O}_2$) ve sigma singlet oksijen ($\Sigma^1\text{O}_2$) olmak üzere iki farklı tipte singlet oksijen oluşmaktadır. Sigma singlet oksijen ($\Sigma^1\text{O}_2$) oldukça enerjiktir ve biyolojik sistemlerde $\Delta^1\text{O}_2$ formuna hızlıca dönüşür. İn vivo şartlarda O_2^- 'nin spontan dismutasyonu ile birlikte Haber-Weiss reaksiyonu ve MPO- H_2O_2 -Halojen antimikrobiyal sistemi tarafından da $^1\text{O}_2$ üretilebilmektedir (5,25).

C. ARTMIŞ SERBEST RADİKALLERİN ZARARLARI:

Serbest radikaller hücre membranında veya hücre içinde bir takım zararlara neden olabilmektedirler. Bu zararları şu şekilde sıralayabiliriz:

a- Bu radikaller, sülfidril enzim inaktivasyonunun yanında, hassas proteinlerden olan kompleman fragmanının (C5a), α -1-antiproteazın ve kemotaksin formil-metiyonil-lösil-fenilalaninin inaktivasyonunu sağlarlar (2,23,25,35).

b- Hücre dışı kollajen doku komponentlerini, savunma enzimlerini ve transmitterleri yıkarlar.

c- Proteaz, elastaz, fosfolipaz, lipooksijenaz, siklooksijenaz, triptofan deoksijenaz, galaktaz

ve oksidaz gibi litik enzimleri aktive ederler.

d- Nükleik asidlerin ve DNA'nın yapısında değişikliklere neden olarak, çeşitli toksik etkiler göstermenin yanında, kanserojenik ve mutajenik potansiyel taşırlar (2,25,28,35).

e- Ökaryotik hücre organellerindeki ve hücre membranlarındaki fosfolipid çift tabakasının yapısını bozarak membran LPO'na neden olurlar (23,35).

f- LPO sonucunda ise, membran akışkanlığında, azalmaya veya kayıba neden olurlar (31),

g- Hücre membranındaki fosfolipid çift tabakanın rijiditesini artırarak hücre membran dayanıklılığını azaltırlar (2,23)

h- Membrandan H⁺ ve diğer iyonlara olan permeabilityyi artırarak, (özellikle K⁺ kaybını artırarak) iyon gradientlerini sürdürme kabiliyetinde bozulmaya neden olurlar (2,23,32).

i- Membran potansiyelinin düşmesi sonucu oluşan rüptür, hücre ve organel içeriklerinin salınımına neden olur, dolayısıyla eritrositlerde hemolize neden olurlar (2,5,23,25).

j- Hormonları okside ederler (2)

k- Mitokondrideki aerobik solunumu bozarlar.

l- Platelet agregasyonunu artırırlar.

m- Kapiller permeabilityyi bozarlar.

n- Dokularda fagosit artışına sebep olurlar.

o- Çeşitli hücre tiplerinin ölümüne neden olurlar (2).

Lipid oksidasyon olaylarının tamamı zararlı değildir ve peroksidasyon türünleri araşidonik asid kaskadında ve bitki dokularının yara cevabında faydalı roller oynayabilir (5).

D. LİPİD PEROKSİDASYONU MEKANİZMALARI:

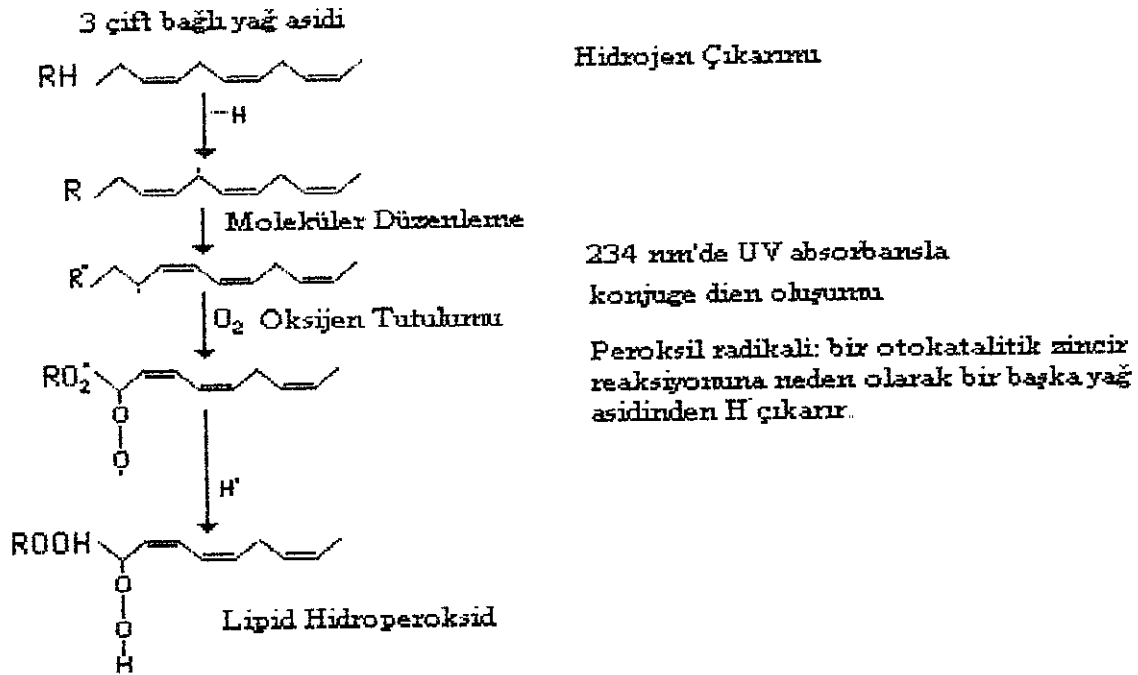
Serbest radikallerle olan LPO reaksiyonlarının üç evresi vardır: 1- başlangıç, 2- ilerleme ve 3- sonlanma (2, 5).

1. Başlangıç Aşaması:

Başlangıç terimi, hidrojen atom çıkarımı anlamına gelir (Şekil 3). Genellikle enerji transferini içeren bir işlem olan başlangıç aşaması bir serbest radikal oluşumunu sağlar. Bunun için yüksek enerji gereksinmesine rağmen bir katalizörün varlığı bu enerjiyi oldukça (% 20 sine kadar) düşürür. Örnek olarak eritrositler LPO'nu başlatan güçlü bir katalizör olan hemoglobinle paketlenmiştir. İlk hidrojen atomunu çıkarabilen türler arasında *OH, alkoksil radikali (RO*), peroksil radikali (ROO*) ve muhtemelen HO₂* yer almasına rağmen H₂O₂ veya O₂* yer almaz. (2).

Bir doymamış yağ asidinin (LH) metilen karbonundan bir hidrojen atomu çıkarılmasına

yetecek seviyede yüksek enerjili herhangi bir serbest radikal (R^*) açık bir lipidde bir zincir reaksiyonu başlatabilir (Şekil 3) (21). Bir hidrojen atomunun sadece bir elektron içermesi nedeniyle hidrojen çıkarımı geride karbon üzerinde eşleşmemiş bir elektron bırakır ($-CH_2-$). Yağ asitlerinde bir çift bağın varlığı, çift bağa komşu karbon atomundaki C-H bağlarını zayıflatır bu da H^* çıkarımını kolaylaştırır. Bu durum PUFA'lerinin LPO'na neden kısmen daha hassas olduklarını açıklamaktadır (2,5).

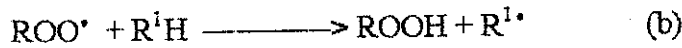
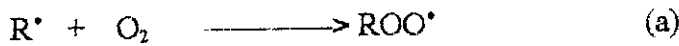


Şekil 3: Lipid peroksidasyonu aşamalarının gösterilmesi.

2. İlerleme Aşaması:

Bir radikal oluştuğu zaman, uygun şartlar altında değişik radikal türleri üretmek için çok sayıda reaksiyon başlatabilir. Bu serbest radikal reaksiyonları, ilerleme aşaması olarak bilinir

(2). Örnek:



Havada ve değişik dokularda oksijenin parsiyel basınç sınırları içinde (a)'daki reaksiyon, (b)'deki reaksiyondan daha hızlı ilerler. Özellikle oksijenlenmiş kanda olmak üzere dokulardaki oksijen konsantrasyonu, LPO'nun ilerleme reaksiyonlarını sağlamak için gerekli olduğu bildirilmektedir (2).

Karbon merkezli radikal, konjuge dien oluşturmak için moleküler bir düzenlemeye uğrar (Şekil 3) ve sonra bir peroksil radikali oluşturmak için oksijenle kombine edilir. Ayrıca lipid hidroperoksid'inin (ROOH) hemoproteinlerle homolitik olarak kesilmesi alkoksil ve peroksil

radikallerini oluşturmaktadır (21).

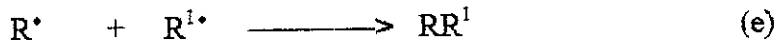
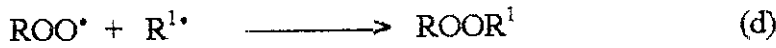
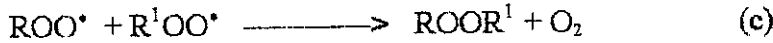
Fosfolipidlerdeki PUFA ve esterifiye kolesterol, ROOH'lerin oluşumuna yol açan oksidasyona aşırı derecede hassastır. Nonenzimik LPO'nda, ROO*, bir başka yağ asidinden bir hidrojen atomu çıkarıp, kendisi ROOH'e dönüşür. Böylece bir reaktif oksijen türüyle "başlama"dan sonra LPO otokatalitik olarak bir zincir reaksiyonunu başlatmış olur (32,35).

Bunun sonucunda; ROOH'leri ve değişik aldehid ve ketonlardan oluşan, onların sekonder oksidasyon ürünleri oluşturulur. Çoğu ROOH'leri dayanıksızdır ve MDA gibi sekonder LPO ürünlerine yıkılırlar (2). Yine ROOH'ler, sonradan membran protein oksidasyonunu da başlatabilirler. Ayrıca bu ROOH'leri kısmen demir gibi metal iyon varlığında, yıkım olarak bilinen bir olayla serbest radikal (R*) oluşturmak üzere hızlı bir şekilde parçalanabilirler. Oluşan R*ler, PUFA içeren diğer moleküllerle reaksiyona girebilirler (32,35).

LPO'nun R* zincir reaksiyonu, iki R* in, birbirlerinin zincir reaksiyonlarını sonlandırana kadar devam eder. Radikaller, kimyasal olarak farklı antioksidanlardan birisiyle kolayca yakalanabilir veya önlenirler (2,5,21).

3. Sonlanma Aşaması:

R* reaksiyonlarında son aşama terminasyon aşaması olarak bilinir. Aşağıda gösterilen 'c', 'd' ve 'e' reaksiyonlarında iki çiftleşmemiş elektron, çiftleşmiş elektronları oluşturmak üzere bir araya gelirler.



Eritrositlerdeki yüksek oksijen basıncına bağlı olarak en önemli sonlanma aşaması 'c'deki reaksiyondur. (2).

Zincir reaksiyonlarının son ürünleri, hidroperekisidler ve siklik peroksidlerdir. Ortaya çıkan ROOH'ler, GSH-Px tarafından detoksifiye edilebilir (21).

E. MALONİLDİALDEHİD (MDA):

MDA okside edilmiş poliunsature yağ asidlerinin yıkım ürünüdür (2,26). Bu üç karbonlu dialdehidin, değişik mekanizmalarla ROOH'lerden oluştuğu önerilmektedir (2).

MDA, amino grupları içeren membran komponentleriyle çapraz bağlanma yapabilir. Bu faktör membran proteinlerindeki konformasyonel değişikliklerle sonuçlanarak membran proteinleri etrafındaki mikroviskoziteyi artırabilir (31). Bununla birlikte MDA, membran rijiditesini artırıp, eritrosit dayanıklılığını azaltabilir. Mikromolar konsantrasyonlarda bile MDA, hücre dayanıklılığını önemli ölçüde azaltabilir (2).

Ohkawa ve arkadaşları MDA ölçümünde ROOH'lerinin TBA ile reaktifliğini etkileyen en önemli faktörün pH olduğunu ve optimum pH'nın da 3,5 olması gerektiğini tesbit etmişlerdir (1979) (15).

TBA reaksiyonu ile ölçülen MDA seviyeleri, canlı dokulardaki oksidatif hasarın en yaygın kullanılan göstergesidir. Bunun yanında MDA ölçümü, biyolojik sistemlerdeki R' üretimini belirlemede veya lipidce zengin gıdaların tazeliğini belirlemede kullanılabilir (15, 26).

Bununla birlikte daha önceki makalelerde enzimatik peroksidasyonla elde edilmiş linoleik asid hidroperoksidin de TBA ile, MDA da olduğu gibi aynı kırmızı pigmenti verdiği tesbit edilmiştir (15). Bundan dolayı reaksiyonun ürünü olan maddeye MDA yerine tiobarbitürik asid reaktif substans (TBARS) denilmesi uygun bulunmuştur. TBARS, 532 nm'de maksimum absorbans veren renkli bir maddedir. Hassasiyeti ve basitliği yüzünden TBA testi, son 30 yıldır LPO'nu göstermek için sıkça tercih edilmiş bir metoddur (2,15).

MDA in vitro olarak belirlenemeyen yıkım ürünlerini oluşturmak üzere H_2O_2 'le reaksiyon yapabilir. Mottley ve arkadaşlarının gösterdiği gibi MDA ayrıca peroksidazlar için iyi bir substrattır. Tourel ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmada katalaz varlığında MDA'nın % 18'i ve SOD varlığında ise % 15'inin kaybolduğu ifade edilmiştir. Bu durumda canlı sistemlerde reaktif oksijen türlerinin varlığında MDA üretim ölçümlerinin tahmin edilenin altında olduğu iddia edilmektedir (26).

Peroksidasyon sonucu üretilen MDA, membran komponentlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmalara sebep olarak deformabilite, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzeyindeki determinantların agregasyonu gibi iç membranın bazı özelliklerini değiştirebilmektedir. Bütün bu etkilerden dolayı yağ asidlerinin peroksidasyonu sonucu meydana gelen MDA, mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşiktir (25).

F. ANTIOKSIDANLAR:

Oksidanların oluşumunu engellemenin yanında dokuları ve makromolekülleri oksidatif hasardan korumak için tüm aerobik yaşayan organizmalar enzimatik ve nonenzimatik antioksidan savunmaların kompleks mekanizmalarını içerir (23).

Organizmaların biyolojik bütünlüğünü serbest radikallerin harabiyetinden korunmak için endojen korunma sistemleri mevcuttur (25). Antioksidan; ortamda düşük konsantrasyonlarda bulunduğu ve okside edilebilen bir substratla karşılaştığında substratın okside olmasını belirgin bir şekilde geciktiren veya inhibe eden madde anlamına gelir (5).

Reaktif oksijen türleri normal aerobik metabolizma esnasında sürekli olarak üretilir ve

değişik biyolojik antioksidanlar tarafından emniyetli bir şekilde ortadan kaldırırlar. Antioksidan koruması hiçbir zaman % 100 etkili değildir. Bundan dolayı tamir mekanizmaları hayat için çok önemlidirler. Prooksidanlar arttığı ya da antioksidanlar azaldığı zaman, aşırı moleküler hasara ve doku yaralanmasına yol açan oksidatif stress durumu hasıl olur (5).

Antioksidanlar oksidatif peroksidasyonun farklı aşamalarında işlev görürler. Antioksidanlar;

- a- Oksijeni alarak veya lokal oksijen konsantrasyonlarını azaltarak,
- b- Katalitik metal iyonlarını ortadan kaldırarak,
- c- Süperoksid ve H_2O_2 gibi önemli reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırarak,
- d- Hidroksil, alkoksil ve peroksil türleri gibi başlatıcı serbest radikalleri yakalayarak,
- e- Başlamış bir zincir reaksiyonunu kırarak,
- f- Singlet oksijeni söndürerek veya yakalayarak etki edebilirler.

a,b,d ve fde belirtilen antioksidanlar önleyici antioksidanlar olarak adlandırılır. (c) mekanizmasıyla etki edenlerde önleyicidirler ancak, onlar enzim olmaları nedeniyle (katalaz , SOD ve GSH-Px gibi) reaksiyon tarafından tüketilmezler. Zincir kırıcı antioksidanlar, 1O_2 söndürücüleri ve metal şelatörleri, engelleyici fonksiyonlarını yaparlarken tüketilirler. Çoğu antioksidanlar birden fazla etki mekanizmalarına sahiptirler. Mesela; propyl gallate, kısmi olarak suda çözünen fenolik bir bileşiktir ve zincir kırıcı molekül, hidroksil radikalleri yakalayıcısı ve demir bağlama gibi özelliklere sahiptir (5).

1. Hücresel Antioksidanlar:

Serbest radikallere sıklıkla maruz kalmalarından dolayı eritrositler, bu toksik türlere karşı korunma mekanizmalarıyla donanmışlardır (2). Hücreler, oksidatif hasara karşı müthiş bir savunmaya sahiptirler. Hücre içinde, antioksidan koruması farklı şekillerde gerçekleşebilir:

- a- Radikal oluşumunun engellenmesi,
- b- Oluşmuş radikallerin önlenmesi,
- c- Radikaller tarafından oluşturulan oksidatif hasarın tamiri,
- d- Hasarlı moleküllerin eliminasyonunun artırılması.

Oksijen hücrelerin içinde metabolize edilir. Burada antioksidanlar indirgenmiş oksijen ara ürünleriyle enzimatik olarak hızlı ve spesifik bir şekilde etkileşirler (Tablo 1) (5,25).

Normal oksijen metabolizması esnasında bu enzimler, hücre içinde oksijenin toksik redüksiyon ara metabolitlerini ortadan kaldırırlar. Hücreler içindeki radikal oluşumunun önlenmesi oksijen toksisitesini kısıtlamaktadır. Matür eritrositte lipid tamir olayları mevcutken okside proteinlerin tamir veya yer değiştirilmesi kabiliyeti sınırlıdır (2,5).

SOD, katalaz ve GSH-Px enzimleri toksik oksijen moleküllerine karşı primer enzimatik savunma sistemlerini oluştururlar (9,16).

Tablo 1: Hücre içi antioksidan maddeler ve onların fonksiyonları (2,5,23)

Antioksidan Madde	Fonksiyonlar
SOD	Katalitik olarak O_2^- 'i ortadan kaldırır.
Katalaz	Yüksek konsantrasyonlardaki H_2O_2 'i ortamdan uzaklaştırır.
GSH-Px	Düşük kararlı konsantrasyonlardaki H_2O_2 'i ortadan kaldırır, bunun yanında organik hidroperoksidleri de ortadan kaldırabilir.
Sitokrom oksidaz	O_2 'in H_2O 'ya indirgenmesi esnasında aktif oksijenlerin salınmamasını sağlar. Cu^{++} tarafından oluşturulan O_2^- , H_2O_2 ve *OH 'nin önlenmesine neden olur.
G6PD	NADPH teminiyle GSSG'nin GSH'ya dönüşümünü sağlar.
Proteolitik Enzim	Okside edilmiş proteinleri ortadan kaldırır.

2. Membran Antioksidanları :

Membranların hidrofobik lipid iç kısımlarında, lipofilik radikaller oluşur. Bunlar hücre içi ortamda görülenlerden farklıdır. Lipofilik radikallerin ortadan kaldırılması için farklı tip antioksidanlar gerekir (Tablo 2) (5,25).

Tablo 2: Membran Antioksidanları ve fonksiyonları (2,5,23,27)

Antioksidan Madde	Fonksiyonları
Vitamin E.	Lipid-solübl, zincir kırıcı bir antioksidandır, hücrelerdeki membran lipid tabakalarının stabilizasyonunu da sağlar.
β -Caroten	Lipid-solübl, radikal yakalayıcıdır ve 1O_2 söndürücüsü olarak işlev görür.
Koenzim-Q	Enerji metabolizmasındaki esas rolüne ilaveten bir antioksidan olarak da hareket eder.
Membran yapı organizasyonu	Fosfolipid : Kolesterol oranı, fosfolipidlerin ve yağ asitlerinin tipleri membran yapısal bütünlüğü için önemlidir.
Eritrosit membranı	H_2O_2 'i hücre içine geçirmenin yanında O_2^- 'i de anyon kanalı içinden geçirir.

3. Ekstrasellüler Antioksidanlar :

Vücut ekstrasellüler sıvıları, intrasellüler antioksidanlar olarak tarif edilen enzimleri içermezler. Bununla birlikte GSH-Px ve SOD'ler ayrı glikozile ekstrasellüler proteinler olarak tanımlanmıştır. Bu enzimler ekstrasellüler sıvılarda, O_2^- ve H_2O_2 gibi reaktif oksijen türlerinin sınırlı yaşam sürelerinin sağlanmasında rol oynarlar (Tablo 3).

Plazma, birçok redoks aktiviteli düşük moleküllü kütleler içerir ki, bunların çoğu primer

Tablo 3: Ekstrasellüler antioksidanlar ve fonksiyonları (2,5,23).

Antioksidan Madde	Fonksiyonu
Transferrin	Proteinin her molü iki tane ferric iyon bağlar
Laktoferrin	Proteinin her molü düşük pH'da iki adet ferric iyon bağlar.
Haptoglobulin	Hemoglobini bağlar
Hemopeksin	Hem'i bağlar.
Albümin	Bakırı ve hem'i bağlar, HOCl'yi yakalar.
Seruloplazmin	Ferooksidaz aktivitesiyle O_2^- yakalayıcısıdır, nonspesifik bakır iyonlarını bağlar, bakırların reoksidasyonu için H_2O_2 'i kullanır.
Hüc.dışı SOD	O_2^- 'i katalitik olarak ortamdan uzaklaştırır.
Ekstrasellüler GSH-Px	Katalitik olarak H_2O_2 'i ve hidroperoksidleri ortadan kaldırır. Plazmada az miktarda GSH mevcuttur.
BR	Peroksil radikallerini yakalar (<0,09mmol/L).
Mukus	*OH radikallerini yakalar.
Ürik Asid	Radikal yakalayıcı ve metal bağlayıcısıdır (0,08mmol/L).
Glukoz	*OH radikal yakalayıcısıdır (4-6 mmol/L)
Askorbik Asid	*OH radikal yakalayıcısı (65 mmol/L)

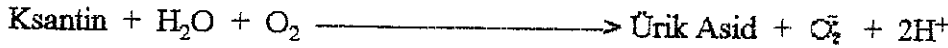
antioksidan olarak bilinir (5).

G. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD):

Süperoksid dismutaz (SOD, EC:1,15,1,1 süperoksid, süperoksid oksido redüktaz) aerobik hücrelerde yaygın bir şekilde bulunan ve süperoksid radikallerinin dismutasyonunu sağlayarak hücreyi bu radikallerin zararlarından koruyan bir enzimdir (24,25).

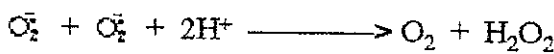
Biyolojik sistemlerde; süperoksid radikallerinin oluşmasına neden olan sistemlerden biri de, ksantin, ksantin oksidaz tarafından aerobik oksidasyonudur. Bu radikaller ferrisitokrom-C ve nitroblue tetrazolium gibi bileşikleri redüklemektedirler (25).

Ksantin Oksidaz



SOD aşağıdaki reaksiyonu katalizleyip, O_2^- nin dismutasyonunu sağlayarak H_2O_2 ve moleküler oksijen oluşturmaktadır. Bu enzim McCord ve Fridovich tarafından (1968) aşağıdaki reaksiyonu oldukça hızlandırması nedeniyle keşfedilmiştir (6,7,25).

SOD



Bu reaksiyon belli bir hızda nonenzimatik olarak oluşabilir, ancak enzimatik katalizle, reaksiyonun hızı oldukça fazladır. Üretilmiş oksijen triplet normal seviye durumundadır. Reaksiyon sonunda enzim, aktif oksijen radikallerinin önemli bir üyesi olan O_2^- i yakalamış ve

oksijen toksisitesine karşı in vivo olarak koruyucu bir rol oynamış olur (5,6,25).

Enzimin birkaç değişik formunun bitki, mikroorganizma ve memeli hücrelerinde mevcut olduğu bilinmektedir. Yapı bakımından ve aktif merkezlerindeki geçiş metal iyonları yönünden farklılık gösterirler ancak aynı reaksiyonu kataliz ederler (7). Hücre içinde SOD'nin iki esas formu vardır (6,24).

A) Cu ve Zn İçeren SOD: Ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında primer olarak bulunmasının yanında mitokondride de bulunur (6,24,25) 32000 D (Dalton) molekül ağırlığında bir enzimdir. Enzim, disülfid köprüsü ile bağlanmış, birbirinin aynı olan iki alt üniteden oluşmuştur ve her alt ünite birer atom Cu^{2+} ve Zn^{2+} içermektedir. Bu elementler enzim aktivitesi için mutlaka gereklidir, fakat Zn^{2+} yerine Co^{2+} , Hg^{2+} veya Cd^{2+} geçebilir ve herhangi bir aktivite kaybı olmaz. O_2^- 'in dismutasyonu Cu^{2+} ile sağlanır (25). Eritrositler sadece CuZnSOD içerirler (6). CuZnSOD, insan nötrofillerinde (sitoplazmik SOD adıyla), total SOD'nin % 85'i oranında bulunur ve düşük molekül ağırlıklıdır (Rest ve ark. 1977) (25).

Cu-Zn SOD, KCN'e hassas bir enzimdir, siyanid tarafından tersinir olarak inhibe edilir. Siyanidin C atomu, enzimin Cu^{2+} 'na bağlanarak enzimi inhibe eder. H_2O_2 , enzimin Cu^{2+} 'nı redükleyebilir, fakat 10 mmol'ün üzerinde H_2O_2 konsantrasyonunda enzim irreversible olarak inhibe olur (25).

B) Mn İçeren SOD: Prostetik metal olarak Mn içerir, bakterilerde ve/veya ağırlıklı olarak hücre mitokondri matriksinde bulunan bir enzimdir (Weisiger & Fridovich 1973). Bakteriyel enzim, eşit büyüklükte iki alt üniteden oluşur ve her alt ünite bir Mn^{2+} atomu ihtiva etmektedir. Molekül ağırlığı 40000 D civarındadır. Mitokondriyal enzim ise dört alt ünite içeren ve molekül ağırlığı 80000 D olan bir tetramerdir (6,24,25).

Mn-SOD, KCN'e dayanıklı bir enzimdir ve siyanür tarafından inhibe edilmez, kloroform ve etanol Mn-SOD'ı inhibe ederler. Nötrofillerde, (mitokondriyal SOD adıyla) total SOD'nin % 15 ini oluşturmaktadır (25).

SOD aktivitelerinin klinikte değişik hastalıklarla ilgisinin olduğu görünmektedir. CuZnSOD'nin spesifik aktivitesi Down sendromlu hastaların eritrositlerinde, üremide ve böbrek yetmezlikli hastaların serumlarında artmıştır. Diğer yandan CuZnSOD aktivitesi Fankoni anemili, orak hücre anemili, Duchen musküler distrofi veya idiopatik pulmoner hemosiderozisli hastaların eritrositlerinde düşük bulunmuştur. Alkolün karaciğeri hasara uğrattığı hastaların plazmasında MnSOD artmışken, CuZnSOD azalmıştır. Ankilozan spondilitli ve romatoid artritli hastalarda PMN lökositlerin MnSOD ve total SOD aktiviteleri azalmış ancak CuZnSOD seviyeleri ankilozan spondilitte belirgin bir şekilde artmıştır (24).

Katalaz ve hidroksil yakalayıcılarının yanında, SOD'nin de in vitro olarak alloksana karşı pankreas β -hücrelerini koruduğu tesbit edilmiştir (Grankvist ve ark. 1979). SOD parenteral olarak farelere verildiğinde; alloksanın diabetojenik aktivitesine karşı in vivo bir engelleme oluşturduğu gösterilmiştir (6).

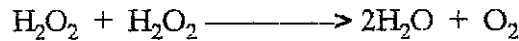
Bu enzimin özellikleri yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Bununla birlikte hala SOD'nin hücre LPO'nu engelleme hususunda önemli bir katkı sağlayıp sağlamadığı hakkında belirgin şüpheler vardır. Bu enzimin, membranlarında PUFA bulunmayan bakterilerle yapılan birçok çalışmada LPO'nun oluşmadığı gösterilmiştir. Böylece eğer süperoksit bu durumda toksik ise başka nedenlerin varlığı söz konusudur (7).

Zimmerman ve ark. yaptıkları çalışmada aktive edilmiş PMN lökositlerle, dilinoleoil fosfotidil kolin (DLPC) lipozomlarında peroksidasyon oluşturmuşlar. SOD bu peroksidasyonu değişik oranlarda inhibe etmesine rağmen tamamen ortadan kaldırmamıştır (35).

H. KATALAZ :

Katalaz (Hidrojen Peroksit: hidrojen peroksit oksido redüktaz EC:1.11.1.6): toksik oksijen metabolitlerine karşı primer enzimatik savunma sistemini oluşturan enzimlerden birisidir (9). Solunum yapan tüm organizmalarda bulunur ve hem ihtiva eder. Enzim, yüksek konsantrasyonlardaki H_2O_2 'in, su ve moleküler oksijene, dönüşümünü katalizleyerek, ortamdan uzaklaştırır (1,7,25).

Katalaz



H_2O_2 , urat oksidaz, glukoz oksidaz ve D-aminoasid oksidaz gibi pek çok enzimle, oksijene iki elektron transfer ederek oluşturabilir (5,25). Fagositoz sırasında monositler ve nötrofiller, fagozomların içine ve ekstrasellüler ortama fazla miktarda H_2O_2 salgırlar. H_2O_2 LPO'na neden olarak hücre membranının hasarında önemli rol almaktadır. Katalaz, fagositlerdeki peroksidasyona karşı koruyucu potansiyele sahip bir enzimdir. Endojen katalaz, H_2O_2 'i parçalamak suretiyle ekstrasellüler üretilen H_2O_2 tarafından oluşturulacak hasara karşı, insan kan fagositlerini korumaktadır (25).

Katalaz, O_2^- ile inhibe olmaktadır (25). Eritrositlerde katalaz miktarı oldukça yüksektir. Enzim, eritrositleri oksidatif hasara karşı korumakta ve hemoglobin ve diğer proteinlerin peroksidatif denatürasyonunu azaltmaktadır. Eritrositler, H_2O_2 'i su ve O_2 'e çeviren yüksek GSH-Px aktivitesine de sahiptir. Gerçekten katalaz veya GSH-Px'in herbiri, diğerinin eksikliğini kompanse ettiğinden dolayı eritrositler için ciddi bir netice teşkil etmezler (1,25).

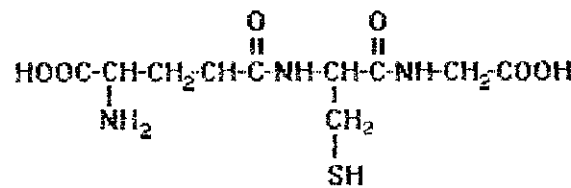
Enzim, mol başına 4 atom gram demir ihtiva eden bir tetramerdir. Protohem grubu aktif bölgenin majör komponentidir. Fe^{2+} ihtiva eden her subünit, protoportfirin IX bulundurmaktadır (25). Bundan başka insan eritrosit katalazının, salınabilen ve tekrar bağlanan 4 NADPH molekülü içerdiği tesbit edilmiştir (4,7). Katalaza bağlı NADPH, katalazın inaktive formlarının birikimini önler. Katalaz, peroksidasyon fonksiyonunda metanol-etanol ve bir hidrojen donörü olan SH bileşiklerini bağlayabilir (4).

Serum katalaz aktivitesi, hemolitik hastalıklarda ve akut pankreatitte fazlaca artmaktadır (4). Takahara hastalığı veya oral gangren olarak da bilinen akatalazia, dokularda ve eritrositlerde katalaz konsantrasyonunda belirgin bir eksiklikle karakterize bir durumdur. H_2O_2 'i yıkan bir enzim olan katalazın eksikliği, H_2O_2 'in birikmesine yol açar. Bu durum çoğu kez asemptomatiktir ve sadece oral sepsisli bazı hastalarda klinik öneme sahiptir. Çünkü bu hastaların ağız boşluklarında bakteriler tarafından oluşturulmuş peroksidler birikir ve gangrene yol açar. Hadise, dişin kaybedilmesinden sonra kaybolur ve kendi kendini sınırlayıcı bir durum arzeder (17).

I. REDÜKTE GLUTATYON (GSH) :

GSH canlı sistemlerde çok önemli ve yaygın bir şekilde oluşan nonprotein bir tiyoldür ve SH grubu içerir (7,8, 20). Protein tiyollerinin indirgenmiş durumunun sağlanmasını desteklemek şeklindeki doğrudan antioksidan etkisinden başka membranlar boyunca aminoasid transportunda muhtemel rolü vardır ve çeşitli detoksifikasyon olaylarına iştirak eder. Bunlar elektrofilik bileşiklerin konjugasyonunu ve H_2O_2 ile ROOH'lerin indirgenmesini sağlarlar (20).

Glutatyon, eritrosit korumasında merkezi bir rol oynar. GSH hemoglobin ve diğer kritik eritrosit proteinlerinin peroksidatif hasarına engel olur. Glutatyon eritrositte sürekli olarak sentez edilmektedir. Bu, iki enzimi gerektirir; Bunlardan biri γ -glutamil-sistein sentetaz, glutamik asid ve sisteinden bir dipeptid oluşturur. Glutatyon sentetaz (GSH-S) ise bir tripeptid olan γ -glutamil-sisteinil-glisin'i veya diğer adıyla glutatyonu oluşturur (1,30).



GSH (L- γ -glutamil-L-sisteinil glisin) (7)

Bu tripeptidin hemen hemen tamamı hücre içinde yerleşmiştir ve serumda ihmal edilebilir

düzyededir. Normal şartlar altında hücrelerdeki glutatyonun çoğu serbest GSH olarak bulunur. Karaciğer lobüllerinin değişik bölgelerinde fazlaca değişmesine ve çoğu hücre tiplerinde 1-5 mM civarında bulunmasına rağmen, rat karaciğerinde sitozolik GSH konsantrasyonu 5 mM civarında bulunmuştur. Sitozoldeki GSSG miktarı çok azdır ve genellikle GSH miktarının % 1-3 ü kadardır (7,8).

Glutatyon, ayrıca hücre içi protein SH gruplarına disülfid köprüleriyle bağlıdır. Rat karaciğerinde total hücre içi glutatyonun % 30'unun karışık disülfid formunda bulunduğu rapor edilmiştir. Karaciğer özellikle GSH miktarındaki diurnal ve diyete bağlı dalgalanmalara hassastır (7).

Mitokondri, sitozolik GSH'dan tamamıyla bağımsız olan kendi GSH havuzunu içerir. Rat karaciğeri sitozolik GSH'ındaki değişiklikler, çok yavaş dengeye gelen intramitokondriyal havuza yansımaz. (7)

GSH'ın hücre içinde oksidatif strese karşı müdafada önemli bir rolü vardır (7,8). GSH-Px aktivitesi için substrat olan t-bütül hidroperoksid (t-BHP) gibi organik hidroperoksidler, intrasellüler GSH'ın okside hale gelmesiyle zararsız hale getirilirler (7). GSH-Px ayrıca serbest, perokside olmuş yağ asidlerinin ve H_2O_2 'in yıkımında görevlidir ve bu itibarla glutatyon, fosfolipidlerde lokalize olmuş ROOH'lerinin yıkımını da sağlayabilir (8,21).

Organik hidroperoksidlerin uygulandığı rat hepatositleri, intrasellüler NADPH temini tükenene kadar hidroperoksidleri, metabolize eder. Okside glutatyon (GSSG) NADPH tarafından glutatyon redüktaz enzimine bağlı olarak GSH'a indirgenir. Pentoz fosfat şantında oluşmuş NADPH, sadece hücre için önemli olan GSH'ın total miktarı için değil hücrenin oluşan GSSG'yi indirgeme kapasitesi için de önemlidir (8).

Sitozolik GSH seviyelerini azaltan ve sonuçta LPO'na neden olan çok sayıda bileşik (azoester, diamid vb..) vardır (7).

Eritrositlerde, glutatyon yolunu heksoz mono fosfat (HMP) yoluna bağlayan glutatyon redüktazda veya NADPH sağlayan Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz'da (G6PD) genetik bir yetmezlik olması düşük GSH seviyelerine neden olur. GSH eksikliği ise membran frajilitesine ve ilaca bağımlı hemolize yol açar, bu da kliniğe konjenital hemolitik anemi olarak yansımaktadır (1,7,20) GSSG'nun pekçok intrasellüler olay üzerine inhibitör veya geciktirici etkisi vardır. Normal şartlar altında GSSG'nin konsantrasyonu düşük seviyede seyrederek ve hücre dışına transport mekanizmaları, karaciğer ve eritrositte mevcuttur (7).

J. ANTIOKSIDAN OLARAK BİLİRÜBİN :

Hem yıkımının son ürünü olan bilirubin (BR) yüksek konsantrasyonlarda biriktiği zaman insanlarda toksik olmakla birlikte atılması gereken bir atık ürün olarak bilinir (12,13,23). Yetişkinlerde protohemini yıkılımı günde ~ 300 mg BR oluşumuyla sonuçlanır. Konjuge edilmemiş BR'in çoğu (5-17 mM seviyelerinde), dolaşımında transport edilmesi için albümine sıkı bir şekilde bağlanır (13,22) ve hepatositler yardımıyla dolaşımdan alınır. Karaciğerde BR, propiyonil gruplarından biri veya ikisinin glukuronik asid, glukoz veya ksilozla konjugasyonu ile, suda çözünür hale getirilir. Fizyolojik şartlar altında insanlarda safra BR'inin konsantrasyonları 0,35 ile 4 mM arasında değişir. Pratik olarak hepsi konjuge formdadır. Konjuge BR sonra ürobilinojen ve ürobiline transforme edilmek üzere barsağa ulaşır. Bu da son olarak gaita ile atılır. Safrada ve barsaktaki konjuge BR, normal insan vücudunda en büyük pigment havuzunu oluşturur (22).

BR'in, prekürsörü olan biliverdinden oluşumu değişik izoformlarda bulunan ancak başka bir fonksiyonu bilinmeyen biliverdin redüktaz vasıtasıyla katalizlenir. Kuşlarda ve sürüngenlerde biliverdin redüktazın bulunmaması toksik olmayan biliverdinin direkt olarak atılmasına sebep olur. Bu bahsedilen ve enerji gerektiren ilavenin neden mevcut olduğu sorusu akla gelmektedir (13).

Bu soruya cevap bulmak için yapılan araştırmalarda; BR'in fizyolojik önemi olan bir antioksidan olduğu sonucuna varılmıştır (12,13,22). BR'in mikromolar konsantrasyonlarda (<0,09mmol/L) (5) in vitro olarak homojen solüsyonlarda, homojen organik çözücülerde yada multilameller lipozomlarda kimyasal olarak oluşturulmuş peroksil radikallerini etkili bir şekilde yakaladığı gösterilmiştir (12,23).

Albümine bağlı BR, albümine bağlı yağ asitlerini in vitro peroksil radikal kaynaklı oksidasyonlardan etkin bir şekilde koruduğu belirtilmiştir (13,22). Bernhard ve arkadaşları BR'in in vitro olarak linoleik asid gibi doymamış yağ asitlerinin hava veya UV ışıkla oluşmuş otooksidasyonunu engellediğini ve hatta bu etkinin α -tokoferolden (vitamin-E) daha etkili olduğunu gözlemişlerdir (12).

Stocker ve arkadaşları (1987) tarafından, BR'in insan serum albüminine bağlandığı durumda ve fizyolojik konsantrasyonlarda (20 mmol) bile, linoleik asidi in vitro olarak peroksil radikaliyle oluşturulmuş oksidasyondan koruduğu gösterilmiştir. BR'in bu antioksidan korumayı, peroksil radikallerini etkili bir şekilde yakalayarak ve doymamış yağ asitlerinin yıkımına yol açan radikal zincir reaksiyonunu engelleyerek yaptığı ileri sürülmüştür (23). Daha sonraki çalışmalarda ise BR'in, doymamış yağ asitlerinin (linoleik asid)

oksidasyonunu inhibe ettiğini ve işlem sırasında kendisini yaktığı, Onishi ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (12).

Benzer şekilde konjuge BR de etkili bir peroksil yakalayıcısıdır (13). Stocker ve arkadaşları (1987) BR ditaurin'in (BR-DT) (ticari olarak mevcut bir konjuge BR bileşiği) ROO[•]lerini etkin bir şekilde yakaladığını ve bundan dolayı da LPO'nu engellediğini ve BR'in antioksidan aktivitesinin de, onun hidrojen verme yeteneğinden ileri geldiğini göstermişlerdir (22).

Bundan başka BR, lipozomlarda kısmi oksijen basıncı altında (% 2'lik) oksidasyonu ve serbest radikal zincir reaksiyonlarını, plazmada LPO'na karşı esas savunmayı yapan önemli ve etkili bir antioksidan olarak bilinen, α -tokoferolden daha çok baskıladığı gösterilmiştir (12,13,23). BR, membrana bağlı α -tokoferolle LPO'yu önlemede sinerjetik etki oluşturabilir (13). Konjuge olmamış BR'in, biyolojik membranlar içine ve aralarına kolayca diffüze olabildiği bildirilmiştir ve kandaki BR'in fizyolojik konsantrasyonlarda karaciğer plazma membranlarındaki pigmentin konsantrasyonunun yaklaşık % 0,25 mol (mol/100 mol fosfolipid) olduğu tahmin edilmektedir. İnsan yenidoğanında dolaşımdaki BR konsantrasyonu yüksek olduğundan dolayı muhtemelen membran konsantrasyonu daha fazla olmaktadır. Bundan dolayı, in vitro delillerden yola çıkarak, en azından BR'in in vivo oksidatif membran hasarını önlemede bir rol oynayabileceğini önermek makul görünmektedir. Özellikle erken yenidoğan döneminde, postpartum oksidatif stresin olduğu ve antioksidan enzim sistemlerinin ve endojen vitamin-E seviyelerinin baskılandığı bir dönemde BR'in antioksidan etkisinin daha belirgin olacağı ifade edilmiştir (12).

Bir antioksidan olarak fonksiyon görürken BR kısmen biliverdine dönüştürülür, ki o da bir antioksidandır (12).

Konjuge edilmemiş BR, H₂O₂ veya organik hidroperoksidlerin varlığında peroksidazlar için bir indirgeyici substrat olarak davranırlar (22).

Safra pigmentleri; (BR ve biliverdin) vitamin-A ve linoleik asidin, intestinal kanaldaki oksidatif yıkımını engelledikleri ve barsakta bir antioksidan olarak görev aldıkları gösterilmiştir (12,23). Neuzil ve arkadaşları (1993) (13), BSA'nın ve diğer proteinlerin [•]OH kaynaklı oksidasyonunun bir zincir reaksiyonu yoluyla ilerlediğini ve amino asid birimlerinin kaybına neden olduğunu ve bu zincir reaksiyonunun önemli bir şekilde BR veya Trolox (E vitamini preparat adı) tarafından inhibe edildiğini göstermişlerdir. Neuzil'in bir başka çalışmasında ise (1993) BR, BSA ya bağlandığı zaman [•]OH, HO[•]₂ ve O₂^{-•} anyon radikalleri tarafından okside edildiği ve çoğu tesbit edilemeyen türünler oluşturulduğu gözlenmiştir. BSA-bağımlı BR'in başlangıç oksidasyon hızları sırasıyla [•]OH > HO[•]₂ > O₂^{-•} şeklinde azaldığı ifade

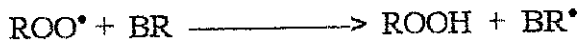
edilmiştir. BR'in taşıyıcı proteinini, *OH radikalleriyle oluşturulacak oksidatif hasardan koruduğu da gösterilmiştir (13).

Konjuge edilmemiş BR sadece lipide çözünen güçlü bir zincir kırıcı antioksidan değil, bunun yanında radikal olmayan bir başka oksijen formu olan 1O_2 'i de deaktive ve detoksifiye etmektedir (12,22). Bu iki yolla yapılır; a)-BR, 1O_2 'le reaksiyona girerek, b)-BR bir yakalayıcı olarak davranıp, 1O_2 'in enerjisini absorbe ederek. Yakalama (quenching) işlemi sonucunda 1O_2 normal, uyarılmamış bazal formuna geri dönüştürülür. BR'in, 1O_2 'in en etkili deaktivatörlerinden ve yakalayıcılarından biri olduğu iddia edilmektedir (12).

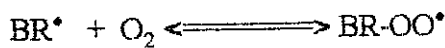
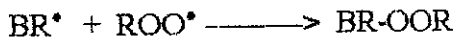
BR'in antioksidan etkisi, oksijenin deneysel konsantrasyonu % 20'den (normal havadaki gibi) % 2'ye (fizyolojik olarak uygun konsantrasyon) düşükçe artar.

Veriler BR'in bir fizyolojik zincir kırıcı antioksidan olarak faydalı bir rolünün olduğu fikrini desteklemektedir. Gerçekten BR konjuge edilmiş çift bağların uzamış bir sisteminin yanında reaktif bir hidrojen atomu içerir ve böylece antioksidan özellik gösterir (23).

BR mikromolar konsantrasyonlarda ROO*lerini muhtemelen bir karbon merkezli radikal (BR*) oluşturmak maksadıyla, tetrapirel molekülünün 10 numaralı 'C' köprüsüne bağlı bir hidrojen atomunu vererek yakalayabilir (23).



BR* daha sonra ya radikal olmayan bir ürüne dönüşmek üzere diğer bir peroksil radikaliyle birleşir ya da oksijenle reaksiyon yapar (23)



Sonunda BR muhtemelen tam olarak renksiz düşük molekül ağırlıklı suda çözünen propentidyopent'ler ve imid'ler gibi bileşiklere yıkılabilir (12).

Bu çalışmalar BR'in in vivo olarak bir biyokimyasal fonksiyonunun olduğunu ve endojen organik serbest radikallerle oluşmuş hücresel hasarı engellemeyi sağlayan düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar grubunda yer alması gerektiği önerilmiştir. BR'in engelleyici bir fonksiyonunun yakın bir keşif olması ve BR'in oluşumundan sorumlu enzimlerden biri olan hem oksijenazın bir ısı-şok proteini olması ve bu proteinin de organizmaları oksidasyondan ve biyokimyasal stresin diğer formlarından koruyan bir grup proteinlerden biri olduğu bildirilmektedir. Son ürünün en uygun seviyeleri muhtemelen fizyolojik olarak faydalı olabilir (12).

IV. MATERYAL VE METOD

A. MATERYALLER

Deneylerde; otomatik pipetler 5-50 mL, 50-200 mL, 200-1000 mL (Biohit-proline), santrifüj cihazları, (Nüve NF 815) ve (Heraeus-Christ-Minifüje 2), ultrasantrifüj (Beckman), homojenizatör, hassas terazi (Sartorius), aspiratör cihazı (Beckman- Vakum-Control), pH metre cihazı (Jenway 3010 pHmeter), su banyosu (Nüve BM-100), derin dondurucu (Karteknik), ışık mikroskobu, (Zeiss-Germany), fotometre (photometer 4010-Boehringer Mannheim), spektrofotometre (Beckman UV-Visible), florometre (Shimadzu), cam pipetler, cam tüpler, balon jojeler vb. cam malzemeler kullanıldı.

Enzim deneylerinde kullanılan cam malzemenin hepsi, (tüp, pipet, balon joje, beher) deiyonize su ile yıkandı, 3 saat % 20 HNO₃ içinde bekletildikten sonra 3 defa deiyonize su ile yıkanarak demineralize edildi (25). Diğer deneylerde ise kullanılan cam malzeme fiziksel temizliğinden sonra (H₂SO₄- potasyum bikromat) solüsyonu içinde 1 gece bekletildi. Bundan sonra 3 kez deiyonize su ile yıkandı etüvde kurutuldu.

B. NUMUNE ELDESİ:

MDA düzeyi ile SOD ve katalaz aktivite tayinleri için heparinli kan ve GSH ölçümleri için ACD'li kan kullanıldı. Bu numuneler Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Kan Bankasına müracaat edip, kan bağıışı yapan sağlıklı 104 kişiden elde edildi. Kan alımı ve toplanmasında lökositlerin tüp duvarlarına yapışmasını engellemek amacıyla, cam tüpler yerine plastik tüpler tercih edildi.

C. METODLAR

1. LOKOSİT İZOLASYONU: (14)

a) PrensiP:

Tam kan oda ısısında 30-60 dakika bekletildiği zaman, eritrositler çöker. Lökositlerin dansitesi eritrositlere göre daha düşük olmasından dolayı lökosit sedimenti daha yavaş meydana gelir. Eritrositler ve süpernatant plazma arasında bir beyaz tabaka (lökosit tabakası) oluşur. Sedimentasyonun oluştuğu ortamın dansitesi dextran ilavesiyle artırılırsa lökositler süspansiyon halinde kalır. Süpernatantın alınması ve düşük devirde santrifüj yapılması lökositçe zengin bir pellet oluşturur. Ortama eritrositlerin kontaminasyon ihtimali ise, bu hücrelerin hipotonik solüsyonlarda parçalanmaya karşı lökositlere göre daha az dirençli olmasından dolayı, şok uygulamasıyla elimine edilir.

b) Reaktifler:

1- Dextran Solüsyonu (5 g/dL) : 10 x 125 mm'lik, içinde heparin bulunan plastik tüplere 0,1 g ağırlığında HH grade'inde ve MA 254.000 olan dextran, tartılarak konuldu. Kullanılmadan hemen önce 2 mL 0,7 g/dL'lik NaCl ilave edildi.

2- NaCl 0,7 g/dL: 100 mL'lik balon jöje içinde 0,7 g NaCl konuldu, distile suyla çözülerek hacim 100 mL'ye tamamlandı.

3- NaCl 0,9 g/dL: 100 mL'lik balon jöje içinde 0,9 g NaCl konuldu distile suyla çözülerek hacim 100 mL'ye tamamlandı.

4- NaCl 1,8 g/dL: 100 mL'lik balon jöje içinde 1,8 g NaCl konuldu, distile suyla çözülerek hacim 100 mL'ye tamamlandı.

(2,3 ve 4 numaralı solüsyonlar +8 °C'de iki ay stabildir.)

c) Yöntem:

Enjektörle alınan 8 mL'lik venöz kan derhal, içinde antikoagülan madde (heparin veya ACD) ve 2 mL % 5 dextran bulunan plastik tüplere boşaltıldı ve hemen birkaç kez alt-üst edildi. Donörün adı, soyadı, yaşı ve alınış saati kaydedildi. Hücrelerin sedimentasyonu için 45 dakika +4 °C'de bekletildi. Bu süre sonunda üstte kalan lökositçe zengin plazma kısmı disposable bir plastik pipet ucuyla bir başka plastik tüpe aktarıldı ve bunlar diğer kanların alınıp ayırılmasına kadar +4 °C 'de buzdolabında bekletildiler. Diğer donörlerden alınan kanlardan elde edilen lökositçe zengin plazmalarla birleştirildikten sonra toplanan lökositçe zengin plazmalar soğuk ortamda Kan Bankasından Biyokimya Laboratuvarına taşındı.

Plastik tüplerde 10'ar mL olarak biriktirilmiş lökositçe zengin süpernatantlar 500 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar çekilip atıldı.

Ortamda bulunan eritrositlerin uzaklaştırılması için şok uygulaması yapıldı: Dipteki beyaz küre hücreleri 1 mL soğuk 0,9 g/dL'lik NaCl içinde süspanse edildi. 3 mL soğuk-buzlu distile su ilave edildi, nazikçe 45 saniye süreyle karıştırıldı. Süre bitiminde derhal 3 mL 1,8 g/dL soğuk NaCl ilave edilerek, karıştırıldı ve 500 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant çekilip atıldı. Tarif edilen şok uygulaması ortamdan eritrositleri tamamen uzaklaştırmak için üç defa yapıldı.

Bu aşamadan sonra lökositlerin hepsi toparlanıp havuz haline getirildi ve ölçüm gününe kadar -20 °C 'de derin dondurucuda saklandı. Lökositlerin derin dondurucuda saklanması gerektiği için, hücreler derin dondurucuda parçalanacağından dolayı, lökositlerle ilgili hesaplamaları yaparken de lökosit sayısı / mL şeklinde kullanmak yerine, böyle bir durumda tercih edilmekte olan mg protein / mL şeklindeki hesaplama kullanıldı (14).

2. PROTEİN ÖLÇÜMÜ - LOWRY METODU (10)

a) Prensip:

Proteinler, alkali ortamda ilave edilen Cu^{++} iyonları ile, kompleks yaparlar. Cu^{++} - Protein kompleksi bir elektron donörü olarak hareket edebilir ve ilave edilen folin-Ciocalteu reaktifini (Polifosfomolibdik ve Polifosfotungustik asid) yoğun renkli molibdeum ve tungsten mavisine indirger. Oluşan renk şiddetinin optik dansitesi 750 nm'de ölçülür ve standart eğri ile karşılaştırılarak değerlendirilir.

b) Reaktifler :

1- A Reaktifi : % 2 Na_2CO_3 solüsyonu + 0,1 N NaOH olacak şekilde hazırlandı. Solüsyonu hazırlamak için, 1 g Na_2CO_3 (Sigma) ve 0,2 g NaOH tartıldı ve bir miktar distile suda çözüldükten sonra 50 mL'ye tamamlandı.

2- B Reaktifi: % 1 CuSO_4 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ [Sigma], MA=249.68) den 0,0156 g alındı ve distile suyla 1 mL'ye tamamlandı. % 2 Na-K Tartarat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [Sigma], MA= 282 23) den 0,0268 g tartıldı ve distile suyla çözüldükten sonra 1 mL'ye tamamlandı. Bu iki solüsyon eşit hacimde karıştırıldı.

3- C Reaktifi - Alkalin Bakır Solüsyonu (Protein Solüsyonu) Bu solüsyon aşağıdaki şekilde ve günlük olarak hazırlandı.

A Reaktifi	50 kısım
B Reaktifi	1 kısım

4- Folin - Ciocalteu - Fenol Reaktifi (FCF) (Sigmadan hazır olarak temin edildi)

Hazır olan reaktif, asid cinsinden 2 N olduğu için aşağıdaki şekilde sulandırılarak kullanıldı.

Hazır FCF reaktifi	1 kısım
Distile Su	1,5 kısım

5- Protein standardı: 25 mg bovin serum albümin (BSA) tartıldı ve distile suda çözüldükten sonra hacim 10 mL'ye tamamlandı (2,5 mg/mL). Bu stok solüsyondan aşağıdaki şekilde çalışma standartları hazırlandı.

Protein Çalışma Standartları

Stok Standart - (mL)	Distile Su (mL)	µg protein /0,3 mL.
0,1	4,9	15
0,2	4,8	30
0,3	4,7	45
0,4	4,6	60
0,5	4,5	75

c) Yöntem:

Elde edilen lökositler 1/20 oranında phosphate-buffered-saline (PBS) ile aşağıdaki şekilde dilüe edildi.

0,1 mL	Süpernatant
1,9 mL	FBS

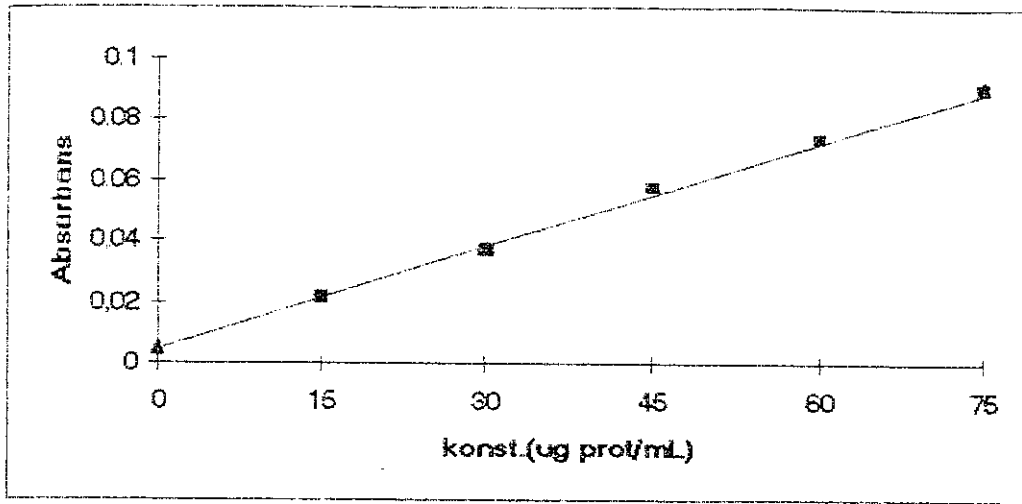
Daha sonra aşağıdaki reaktifler tabloda gösterildiği gibi pipetlendi.

	Kör (mL)	Standart (mL)	Numune (mL)
Distile Su	0,3	---	---
Çalışma Standardı	---	0,3	---
Dilüe numune	---	---	0,3
Protein Solüsyonu	3,0	3,0	3,0

15 dakika oda ısısında inkübasyondan sonra

Dilüe folin Reaktifi	0,3	0,3	0,3
----------------------	-----	-----	-----

ilave edilip derhal karıştırıldı. Tekrar 30 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 750 nm'de köre karşı okundu. Sonuçlar grafikten değerlendirildi (Şekil 4).



Şekil 4: Protein Standart Grafiği, $y = 0,001144 x + 0,0048$, $r = 0,9995$

Grafikten elde edilen sonuçlar dilüsyon katsayısı olan 20 ile çarpıldıktan sonra, deney ortamına numune 0,3 mL ilave edildiği için;

$$\frac{A \text{ } \mu\text{g protein} \quad 0,3 \text{ mL 'de}}{x \text{ } \mu\text{g protein} \quad 1 \text{ mL 'de}} = \frac{x \text{ } \mu\text{g protein/mL olarak sonuç bulundu.}}{x \text{ } \mu\text{g protein/mL olarak sonuç bulundu.}}$$

3. LÖKOSİTLERİN OKSİDAN VE ANTIOKSİDAN MADDELERLE İNKÜBASYONU

a) Reaktifler:

1- BR'in Hazırlanışı: BR 20 mg/dL olacak şekilde hazırlandı. Bunun için 0,002 g BR tartıldı. 10 mL distile suyla çözüldü. BR'in distile suda çözünmesi için ortama 0,02 g NaOH (50 mM olacak şekilde) ilave edildi (13). Bu solüsyondan deney tüplerine son konsantrasyonları tablo 4'de belirtilen miktarlarda olacak şekilde dilüsyonlar yapıldı.

2- Kümen Hidroperoksid (CuOOH) : (50 mmol/L), 91 μ L CuOOH (MA:152,2 g, d = 1,05 g/mL, konsantrasyon yüzdesi \approx % 30, 1 M CuOOH = 181,2 mL/L [Sigma]) pipetlendi ve hacim 10 mL'ye tamamlandı. Bu stok solüsyondan, deney tüplerine tablo 4'de belirtildiği gibi son konsantrasyonları; 10 mmol/L olacak şekilde pipetlendi.

3- Phosphat Buffered Saline (PBS) : pH: 7,4, 8,1 g NaCl, 2,302 g Na_2HPO_4 , 0,194 g NaH_2PO_4 tartılıp distile suyla çözüldü. pH: 7,4'e ayarlandıktan sonra hacim 1000 mL'ye tamamlandı.

4- Sodyum dodesil sülfat (SDS) % 8,1: 0,81 g SDS tartılarak distile suda çözüldükten sonra 10 mL'ye tamamlandı.

b) Yöntem:

Oksidan maddenin (CuOOH) belirli miktarının (10 mM) ve antioksidan maddenin (BR) farklı miktarlarının lökosit membran lipidleri üzerindeki peroksidasyona etkisini araştırmak üzere aşağıdaki şekilde bir deney düzeneği kuruldu. Buna göre 10 tane deney tüpü hazırlandı. Tüplere; lökosit çözünürlüğünü artırması için (sadece MDA ölçümünden önceki inkübasyon için) 50 µL SDS % 8,1 kondu ve son hacim 250 µL olacak şekilde (bir ölçüm için) diğer reaktifler pipetlendi. Hacim tamamlamaları PBS ile yapıldı.

Tablo 4: Yapılan tüm deneylerde kullanılan ve Lökosit, Lökosit + CuOOH ve lökosit + CuOOH + BR'den oluşan inkübasyon ortamlarının hazırlanışı.

Tüp No:	Tüpler	Lökosit (µg prot/mL)	CuOOH (mM)	BR (mg/dL)
1	L	300	---	---
2	L+C	300	10	---
3	L+C+0,001	300	10	0,001
4	L+C+0,005	300	10	0,005
5	L+C+0,01	300	10	0,01
6	L+C+0,05	300	10	0,05
7	L+C+0,1	300	10	0,1
8	L+C+0,5	300	10	0,5
9	L+C+1	300	10	1
10	L+C+2	300	10	2

Tüplere pipetleme yapıldıktan sonra dikkatlice karıştırıldı ve 37 °C'de 60 dakikalığına inkübe edildiler. Bu inkübasyon ortamı MDA ölçümü için kullanıldı. SOD, katalaz ve GSH ölçümleri için kullanılan inkübasyonlarda, bir ölçüm için gerekli hacim dikkate alınarak gerekli ayarlamalar yapıldı.

4. TBARS ÖLÇÜMÜ :

(Spektrofotometrik ve Florometrik Yöntem) (Ohkawa Yöntemi) (15)

a) Prensib:

TBARS ölçümü; lipid hidroperoksidlerin MDA ya asid hidrolizini ve sonradan da TBA ile reaksiyon yaparak spektrofotometrik ölçüme duyarlı olan MDA-TBA ürünleri oluşumunu içermektedir. pH: 3,5 da, % 20 asetik asid solüsyonu içinde, 60 dakika süreyle 95 °C 'ye kadar yükselen bir ısıda, maksimum reaksiyon ürünleri oluşumu sağlanmıştır (15). LPO'nun TBA

aktif ürünlerinin butanol içine ekstraksiyonundan sonra absorbanları spektrofotometrede 532 nm'de ölçülmektedir. Deneyde antioksidan olarak kullanılan BR'in, TBA ile interaksyonu ihtimalini ortadan kaldırmak için ölçümler hem spektrofotometrik hem de florometrik olarak yapıldı. Florometrik okumalar eksitasyon: 515 nm, emisyon: 553 nm de olacak şekilde ayarlanarak gerçekleştirildi (15). 1,1,3,3,-tetramethoxypropane'ın standart olarak kullanıldığı deneyde elde edilen değerler nmol TBARS / mg protein olarak ifade edildi.

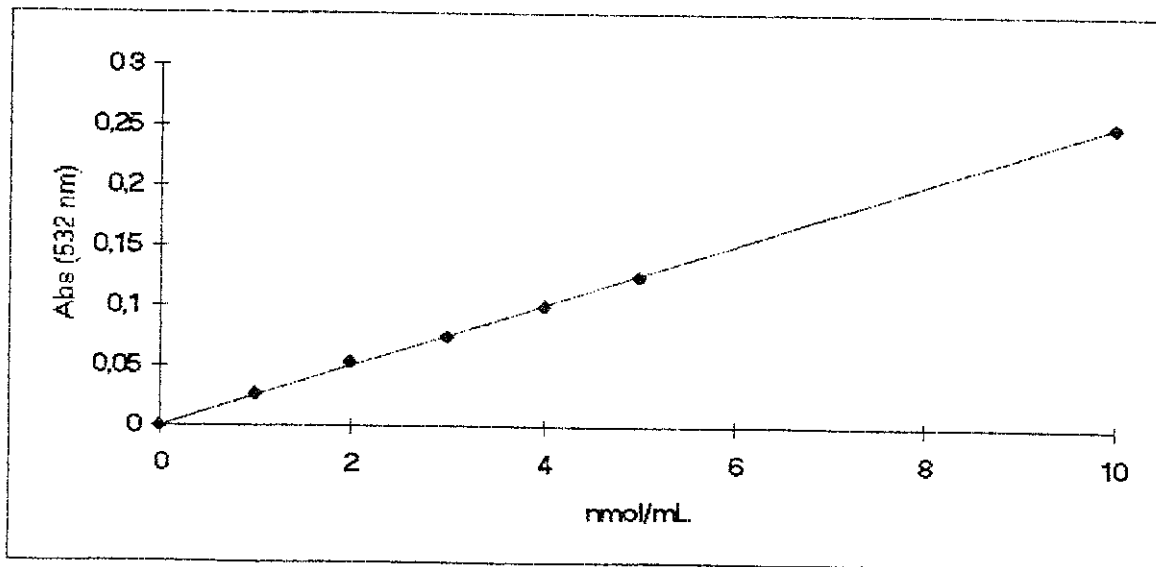
b) Reaktifler:

1- % 20 Asetik Asid (w/v) + % 7,5 NaOH solüsyonu: 19,24 mL glasiyal asetik asid (MA:60,05 g, d = 1,05 g/mL, konsantrasyon yüzdesi \approx % 99) pipetlendi. Buna 7,5 g NaOH tartularak ilave edildi ve bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim 100 mL olacak şekilde distile suyla tamamlanarak pH'sı 3,5 'a ayarlandı.

2- % 0,8 Tiyobarbitürik asid (TBA) solüsyonu: 0,8 g tiyobarbitürik asid (Sigma) tartıldı ve çözüldükten sonra 100 mL' distile su ile tamamlandı.

3- n-Bütanol

4- MDA standartları: (1,1,3,3,-tetramethoxypropane MA:164.2 g/L, dansite:0,997 konsantrasyon yüzdesi : % 95) 1,1,3,3,-tetramethoxypropane'dan 17,3 μ L alındı ve 100 mL distile suya ilave edildi (1000 nmol/mL). Bundan da 1 mL alınıp distile suyla 100 mL' ye tamamlandı (10 nmol/mL). Bundan başka 1, 2, 3, 4 ve 5 nmol/mL'lik MDA standartları 10 nmol / mL 'lik solüsyondan dilüsyonla hazırlandı. Hazırlanan standart solüsyonlar yöntemle göre uygun çalışılarak şekil 5'de görülen standart grafik elde edildi (Şekil 5).



Şekil 5: MDA standart grafiği, $y = 39,87x - 0,022$, $r = 0,999$

c) **Yöntem:**

MDA ölçümü için Ohkawa ve arkadaşlarının (15) MDA-tiyobarbitürik asid (TBA) reaksiyonundan ibaret olan ölçüm yöntemi modifiye edilerek uygulandı. Deney ortamı aşağıdaki şekilde hazırlandı. Numune olarak tablo 4'de inkübasyon ortamı tarif edilen lökosit + CuOOH + BR karışımı kullanıldı.

	Kör (µL)	Standart (µL)	Numune (µL)
Numune	---	---	250
Standart	---	250	---
Distile su	250	---	---
%20Asetik A+%7,5 NaOH	375	375	375
TBA % 0,8	375	375	375

95 °C 'de 60 dakika kaynatıldıktan sonra tüpler masluk suyu altında soğutuldu.

Distile su	250	250	250
n-Bütanol	1250	1250	1250

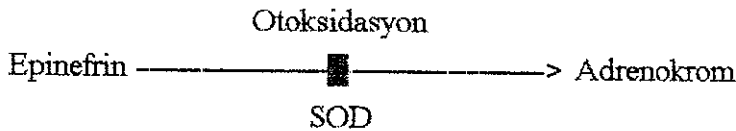
n-Bütanol ilavesinden sonra tüpler kuvvetlice karıştırıldı ve 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjden sonra üst tabaka 532 nm'de spektrofotometrede okundu. Ayrıca aynı deney ortamı florometrede exitasyon: 515 nm ve emisyon: 553 nm olacak şekilde okundu

Spektrofotometrik ölçümlerin değişme katsayısı (C.V.) = % 7,85 bulunurken florometrik ölçümlerin C.V 'si = % 9,58 bulunmuştur.

5. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ: (25)

a) **Prensib:**

Epinefrinin otooksidasyonu ile adrenokrom oluşumunun , süperoksit dismutaz tarafından inhibisyonu esasına dayanır ve bu inhibisyonun yüzdesine göre enzim miktarı hesaplanır



Epinefrinden adrenokrom oluşumu peroksidazlar tarafından katalizlenmektedir. Peroksidazın bu katalitik etkisi nedeniyle MPOaz ihtiva eden PMN lökositlerin SOD tayininde kullanılmaları mümkün değildir. Bu amaçla lökosit süspansiyonu 27000 x g'de 15 dakika santrifüjlenerek MPOaz taşıyan granüller çöktürülmekte ve üstteki süpernata, SOD tayininde kullanılmaktadır.

Laboratuvarımızda yüksek devirli santrifüj olmadığından dolayı santrifüjlerimiz 20000 x g'de yapılmıştır. Süpernatanda kalan az miktardaki MPOaz ise peroksidaz inhibitörü olan fakat SOD aktivitesini hiç bir surette etkilemeyen NaN_3 eklenmesi ile bertaraf edilmiştir.

SOD ölçümünde bu yöntemin değişme katsayısı (C. V.) = % 8,24 olarak bulunmuştur.

b) Reaktifler:

1- 0,3 M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ Tamponu (pH= 10,2) Na_2CO_3 (MA:105,99 g), 7,95 g Na_2CO_3 tartıldı ve 250 mL distile suda çözüldü. 6,3 g NaHCO_3 (MA: 84,01 g) tartılarak, bir başka balon jojeye kondu ve distile suyla 250 mL'ye tamamlandıktan sonra pH'ları 10,2'ye ayarlandı.

2- 0,75 mM EDTA: 21,92 g EDTA (MA: 292,25 g) tartıldı ve distile suda çözüldükten sonra hacim 100 mL ye tamamlandı.

3- 1,8 mM Epinefrin (0,01 M HCl içinde, pH=2), 4 mg epinefrin (MA: 219,7 g) tartıldı, 1 M HCl'den 100 μL ilave edildi ve hacim distile suyla 10 mL'ye tamamlandı. Bu solüsyon taze olarak kullanıldı.

4- 60 mM NaN_3 : 195 mg NaN_3 (MA: 65,01 g) tartıldı ve distile suyla çözüldükten sonra hacim 50 mL' ye tamamlandı.

c) Standart serinin hazırlanması :

0,2-0,4-0,6-0,8 ve 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonlarındaki SOD (Bovine eritrosit SOD, Sigma) standartları 20 mM fosfat tamponu (pH=7,4) içinde hazırlanarak numune gibi çalışıldı. Tüm standartlar çift çalışılarak ortalama değerler alındı.

d) Yöntem:

Süspansiyon halinde $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de dondurulmuş olan lökosit preparatı 5 defa aniden dondurulup çözülerek granüllerin parçalanması sağlandı. Lökosit preparatına % 0,1 Triton X-100 eklendikten sonra buz banyosu içerisinde teflon uçlu homojenizatör ile 2 dakika homojenize edildi ve 20000 x g'de 15 dakika santrifüjlendi. Üstteki süpernatant kısmından protein tayini yapılarak, numuneler önce 1,5 mg protein / mL olacak şekilde PBS (pH=7,4) ile dilüe edildi.

Tablo 4'de tarif edilen ve ölçüm önceleri yapılan, lökosit + $\text{CuOOH} + \text{BR}$ 'in inkübasyonları, SOD ölçümü için aynı şartlarda ancak miktarları artırılmış olarak hazırlandı. Deney ortamı aşağıdaki şekilde çalışıldı.

Reaktifler	Kör (mL)	Numune (mL)	Kontrol (mL)
0,75 mM EDTA	0,4	0,4	0,4
0,3 M Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ pH:10,2	0,5	0,5	0,5
Numune* (0,3 mg protein/mL)	---	1,5	---
60 mM NaN ₃	0,1	0,1	0,1
Kaynatılmış süpernatant (0,3 mg prot. / mL)	---	---	1,5
PBS	1,5	---	---
0,01 M HCl (pH = 2)	0,5	---	---
1,8 mM epinefrin	---	0,5	0,5

* : Numune yerine SOD ölçümü öncesinde yapılan ve tablo 4'de tarif edilen Lök + CuOOH + BR karışımları kullanıldı.

Ortama en son 0,5 mL 1,8 mM epinefrin eklenerek derhal karıştırıldı ve 480 nm dalga boyunda spektrofotometrede köre karşı numune ve kontrol tüplerindeki absorban değişimi 3 dakika boyunca izlendi.

e) Hesaplar:

Kontrol tüpünde inaktif enzim kullanıldığından dolayı epinefrin, kolaylıkla nonenzimatik olarak adrenokroma oksitlenir. Bundan dolayı kontrol tüpünde epinefrinin adrenokroma otooksidasyonunun inhibisyon %'si SOD konsantrasyonuna bağlı olarak değişir.

$$\frac{\text{Kontrol tüpünün } \Delta\text{OD} / \text{dk}}{\text{Standartın } \Delta\text{OD} / \text{dk}} = \frac{100 \text{ aktif birim}}{X}$$

$$X = \frac{\Delta\text{OD Standart} / \text{dk}}{\Delta\text{OD Kontrol} / \text{dk}} \times 100$$

$$\text{Standartın \% inhibisyon değeri} = 100 - X$$

$$\frac{\text{Kontrol tüpünün } \Delta\text{OD} / \text{dk}}{\text{Numunenin } \Delta\text{OD} / \text{dk}} = \frac{100 \text{ aktif birim}}{Y}$$

$$Y = \frac{\Delta\text{OD Numune} / \text{dk}}{\Delta\text{OD Kontrol} / \text{dk}} \times 100$$

$$\text{Numunenin inhibisyon değeri} = 100 - Y$$

$$0,3 \text{ mg / mL SOD} \quad \% \text{ inhibisyon (std)}$$

$$Z \quad \% \text{ inhibisyon (numune)}$$

$$Z = \frac{\% \text{ inhibisyon (numune)}}{\% \text{ inhibisyon (std)}} \times 0,3 \mu\text{g} / \text{mL} \text{ (standardın konsantrasyonu)}$$

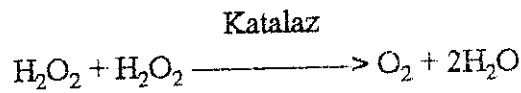
olarak sonuç elde edilir ve $\mu\text{g}/\text{mL}$ SOD şeklinde gösterilir. Numunedeki SOD değeri 3,2 faktörüyle çarpılarak U/mL 'ye, 3,33 ile çarpılarak da U/mg proteine dönüştürülür.

Standartlar ile yapılan deneylerde elde edilen regresyon analizi sonuçları $y=35,11+30,18x$, $r=0,986$ olarak bulunmuştur.

6. KATALAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ (25)

a) Prensip:

H_2O_2 'in katalaz tarafından O_2 ve H_2O 'ya parçalanması esnasında reaksiyon karışımındaki absorban değişiminin ölçülmesi esasına dayanmaktadır.



b) Reaktifler :

1- 0,05 M Fosfat Tamponu (PB) (pH = 7,0) : 1,065 g Na_2HPO_4 (MA=141,96 g) tartıldı ve çözüldükten sonra distile suyla 150 mL'ye tamamlandı. 1,021 g KH_2PO_4 (MA=136,09 g) tartıldı ve çözüldükten sonra distile suyla hacim 150 mL ye tamamlandı. pH 7,0'ye ayarlandı.

2- % 0,18 H_2O_2 (pH = 7,0 PB içinde) : 0,18 mL H_2O_2 alındı ve 100 mL'lik fosfat tamponu (pH: 7,0) içine pipetlendi.

c) Yöntem:

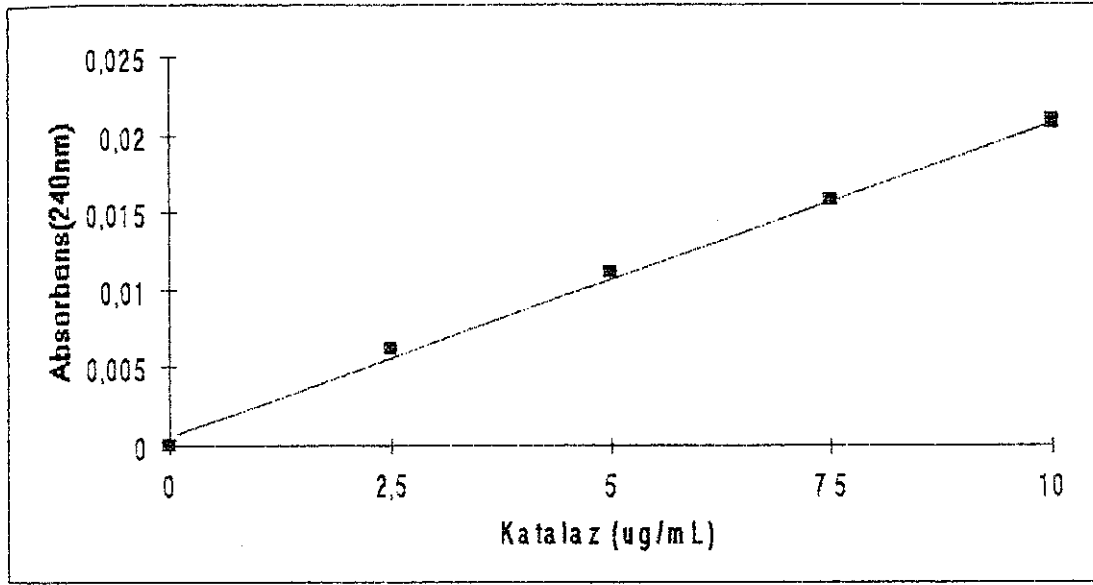
Tablo 4'de belirtilen, lökosit + CuOOH + BR inkübasyonu SOD ölçümündeki gibi kullanıldı ancak katalaz deneyinde bir ölçüm için 200 μL 'lik numune gerektiğinden hacim aynı oranda azaltıldı. Katalaz tayini için deney tüplerine reaktifler aşağıdaki şekilde pipetlendi.

Reaktifler	Kör (mL)	Standart (mL)	Numune (mL)
% 0,18 H_2O_2	1,0	1,0	1,0
0,05 M Fosfat Tmp, pH:7,0	2,0	2,0	2,0
Distile su	0,2	---	---
Standart	---	0,2	---
Numune*	---	---	0,2

* = Lökosit (lok + CuOOH + BR homojenatı)

Numune ortama en son eklenerek 25 °C'de 240 nm dalga boyunda deiyonize su körtüne karşı, spektrofotometrede 3 dakika boyunca absorbans değışimi ölçüldü.

Standart olarak (Bovine Liver Catalase, Sigma) saf katalaz kullanıldı ve 2,5 - 5,0 - 7,5 ve 10 µg/mL'lik çalışma standartları 0,05 M, pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlandı. Standartlar da numune gibi çalışıldı. Numunedeki katalaz miktarı standart eğriye göre değerlendirildi (Şekil 6). Lökosit homojenatında Lowry yöntemine göre protein tayini yapılarak sonuçlar spesifik aktivite olarak verildi.



Şekil 6: Katalaz Standart Grafiği, $y = 492,1 X - 0,541$, $r = 0,999$

d) Hesaplar:

10 mg / mL standart	Standart Δ OD / dk
X mg / mL	Numune Δ OD / dk

$$X = \frac{\text{Numune } \Delta\text{OD} / \text{dk} \times 10}{\text{Standart } \Delta\text{OD} / \text{dk}} \times \text{dilüsyon faktörü}$$

X = A mg katalaz / mL numunedeki katalaz miktarıdır.

Numunenin mg protein	A mg katalaz
1000 mg protein	Y

$$Y = \frac{A \times 1000}{\text{Numunenin protein miktarı(mg/mL)}}$$

$Y = B \text{ mg katalaz / mg protein. (B mg katalaz / mg protein) x 2,8 (Faktör) = Ü/mg protein}$

Katalaz aktivitesi tayininde kullanılan bu yöntemin C.V. değeri % 5,22 olarak bulundu.

7. REDÜKTE GLUTATYON (GSH) (1)

a) Prensib:

Eritrositlerdeki nonprotein sülfidril gruplarının hepsi redükte glutatyon formundadır. 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid), veya DTNB bir disülfid kromojendir ve sülfidril bileşikleriyle yoğun sarı bir renk vermek üzere kolayca indirgenebilir. Redükte kromojenin absorbanası 412 nm'de ölçülür.

b) Reaktifler :

1- Presipite edici solüsyon :1,67 g glasiyal metafosforik asid, 0,20 g disodyum veya dipotasyum EDTA ve 30,0 g NaCl tartıldı, distile suda çözüldükten sonra hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Bu solüsyon +4 °C'de 3 hafta dayanıklıdır. İnce presipitat EDTA'ya bağlıdır, bu durum ölçümleri interfere etmemektedir.

2- 0,3 M Fosfat Solüsyonu: 10,65 g Na₂HPO₄ (MA:142,0) tartıldı ve distile suyla hacim 250 mL'ye tamamlandı. Solüsyon +4 °C'de saklandı ve kristal oluşumu gözleendiğinde ısıtıldı.

3- DTNB Solüsyonu: 40 mg. 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic asid - Sigma), 1 g/dL'lik sodyum sitrat solüsyonuyla çözüldükten sonra hacim 100 mL'ye tamamlandı. Bu solüsyon +4 °C'de 13 hafta dayanıklıdır.

4- GSH Standartları: 10 mg GSH tartıldı ve distile su ile 10 mL'ye tamamlandı. (100 mg/dL) homojen hale gelene kadar çevrildi. Bu standarttan 2,5- 5- 7,5 ve 10 mg/dL olacak şekilde dilüsyonlar yapıldı. Standart solüsyonlar günlük taze olarak hazırlandı.

c) Numune :

ACD'li kan kullanıldı. Ölçümler aynı gün içerisinde yapıldı (1)

d) Yöntem:

Tablo 4'de şartları tarif edilen ve ölçüm önceleri yapılan, lökosit + CuOOH + BR inkübasyonu katalaz ölçümündeki gibi kullanıldı. Tüplerde son hacim 2 mL olacak şekilde ayarlandı. GSH tayini için aşağıdaki sıra takip edildi.

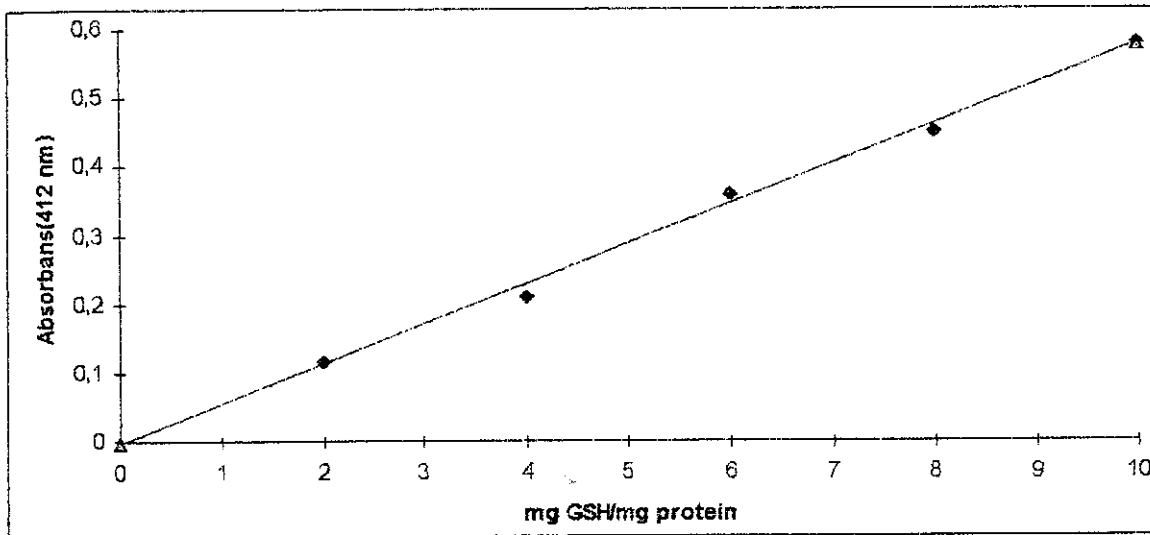
0,2 mL lökosit homojenatı + 1,8 mL Fosfat solüsyonu ile karıştırıldı. Karışım üzerine 3 mL

presipite edici solüsyon ilave edildi ve karıştırıldı. Oda ısısında 5 dakika bekledikten sonra filtre kağıdından süzüldü.

Bundan sonra her tüpten elde edilen filtrat aynı numaralı başka tüplere aktarılarak GSH ölçümü aşağıdaki şekilde yapıldı.

Reaktifler	Kör (mL)	Numune (mL)
Filtrate	---	0,5
Presipite edici	0,3	---
H ₂ O	0,2	---
Fosfat Solüsyonu	2,0	2,0
DTNB solüsyonu	0,25	0,25

Küvet kapatılarak, 3 kez ters çevrilip absorbansları 412 nm'de 4 dakika içinde ölçüldü. Filtrasyon aşaması ihmal edilerek, GSH standartları aynı şekilde çalışıldı ve standart grafiği çizildi (Şekil 7).



Şekil 7: GSH Standart Grafiği, $y = 17,24x - 0,04$, $r = 0,989$

Lökosit GSH konsantrasyonları grafikten hesaplanarak mg GSH /mg protein olarak ifade edildi.

$$\text{GSH mg/mg protein} = \frac{\text{GSH konst (mg)}}{\text{protein miktarı (mg protein/mL)}}$$

GSH ölçümünde bu yöntemin C. V. değeri = % 6,88 olarak bulunmuştur

8. İSTATİSTİK HESAPLAMALARI:

İstatistik değerlendirmeleri; PC bilgisayarda Excel programı içinde yer alan istatistiklerden faydalanıldı. Çalışmaları değerlendirmek için varyans analizleri, bağımsız iki grup ortalamaları arasındaki farkın anlamlılık testleri ve regresyon analizi yapıldı.

V. SONUÇLAR

104 sağlıklı donörün kanlarından elde edilen lökositler, oksidan (CuOOH) ve antioksidan (BR) maddelerin etkisine maruz bırakıldı. Lökosit membran lipidlerinin peroksidasyondan ne derece etkilendiğini göstermek amacıyla LPO göstergelerinden olan TBARS seviyeleri ölçüldü.

Bunun için ilk önce sadece lökosit TBARS'ları analiz edildi. Sonra CuOOH'in farklı konsantrasyonlarının lökosit TBARS oluşumuna olan etkisi araştırıldı. 10 mM CuOOH'in maksimum TBARS oluşumu sağladığı tesbit edilmesi üzerine bu molaritedeki CuOOH konsantrasyonu tüm deneyler boyunca kullanıldı.

Antioksidan bir madde olarak bilinen BR'in ise 0,001 - 2 mg/dL arasında değişen konsantrasyonlarının hücre LPO'na engel olup olmadığı, ya da ne derece engellediği araştırıldı.

Tüm ölçümlerde olduğu gibi TBARS ölçümü öncesi de lökositin oksidan maddesiz, oksidan maddeyle birlikte ve oksidan madde + antioksidan maddenin farklı konsantrasyonlarıyla 60 dakika süreyle 37 °C de inkübasyona tabi tutuldular. Inkübasyon sonucunda her bir tüpten Ohkawa yöntemiyle hem spektrofotometrik hem de florometrik olarak TBARS ölçümleri yapıldı.

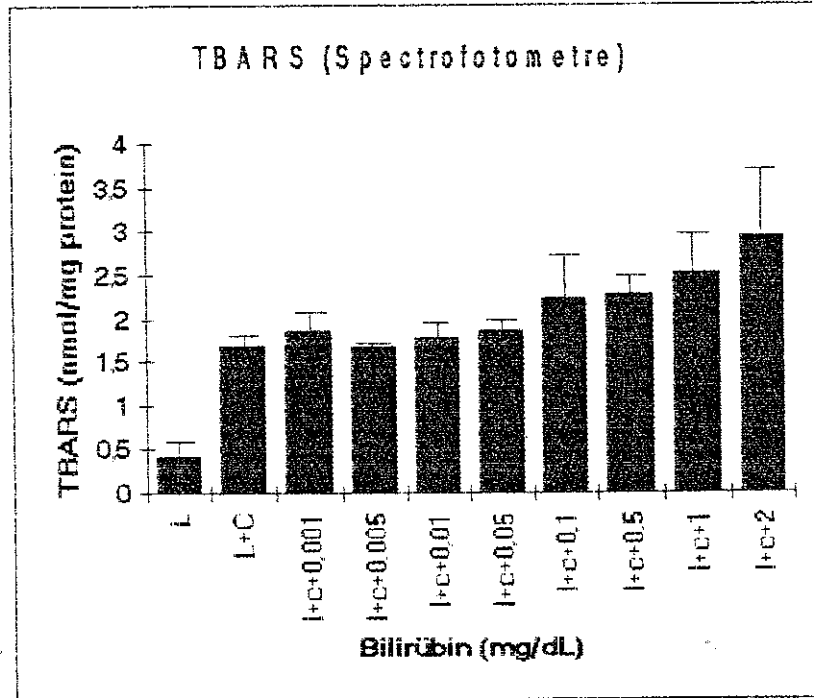
1. TBARS ÖLÇÜMÜ

a) Spektrofotometrik Sonuçlar :

Inkübasyon sonucunda TBARS ölçüm deneyleri yapıldı. Deney okuma aşamasına geldiğinde değerler önce spektrofotometrede sonra da florometrede okundu. Spektrofotometreden elde edilen değerler tablo 5 ve şekil 8'da gösterildi.

Tablo 5: Spektrofotometrede yapılan ölçüm sonucu elde edilen TBARS sonuçları.
(L:Lökosit 300 µg prot/mL, C: CuOOH 10 mM, * : mg/dL BR)

	n	TBARS nmol/mg prot.	
		$\bar{x} \pm SE$	SD
L	10	0,394 ± 0,021	0,039
L+C	10	1,662 ± 0,048	0,152
L+C+0,001*	10	1,829 ± 0,07	0,222
L+C+0,005*	10	1,63 ± 0,025	0,077
L+C+0,01*	10	1,766 ± 0,058	0,183
L+C+0,05*	10	1,829 ± 0,046	0,146
L+C+0,1*	10	2,204 ± 0,153	0,484
L+C+0,5*	10	2,244 ± 0,073	0,231
L+C+1*	10	2,507 ± 0,142	0,45
L+C+2*	10	2,922 ± 0,24	0,758



Şekil 8: Spektrofotometrede yapılan TBARS ölçüm sonuçlarının grafik halinde gösterilmesi.
(L:Lökosit 300 µg prot/mL, C: CuOOH 10 mM, Rakamlar : mg/dL BR)

TBARS ölçümü sonucu tüm gruplar arasında yapılan varyans analizinde, grup ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,001$). Bu farkın hangi gruplar arasında oluştuğunu araştırmak için gruplar arasında t-testi yapıldı. Sonuçları tablo 6'da sunuldu.

Buna göre sadece lökosit bulunan tüpte TBARS düzeyi çok düşük bulunmasına ($0,394 \pm 0,021$ [$\bar{x} \pm SE$] nmol / mg protein) rağmen CuOOH varlığında belirgin bir TBARS artışı gözlemlendi ($1,662 \pm 0,048$ nmol / mg protein) ($p < 0,001$).

Bu durumda lökosit + CuOOH bulunan ortama, BR'in düşük dozlarının ilavesi (0,001-0,01mg/dL arası) oluşan TBARS düzeylerinde istatistiksel bir farklılığa yol açmazken, normal

Tablo 6: Spektrofotometrede gruplara ait TBARS ölçümü sonucunda yapılan bağımsız iki grup ortalamaları arasındaki farkın anlamlılık testi (t-testi) değerlendirmeleri. (L:Lökosit 300 µg prot/mL, C: CuOOH, 10 mM * : mg/dL BR, * : >0,05, fark anlamlı değil.)

	L+C+2	L+C+1	L+C+0.5	L+C+0.1	L+C+0.05	L+C+0.01	L+C+0.005	L+C+0.001	L+C
L	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
L+C	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,05	*	*	*	
L+C+0.001 [▼]	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	*	*	<0,05		
L+C+0.005 [▼]	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,01	<0,05			
L+C+0.01 [▼]	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	*				
L+C+0.05 [▼]	<0,01	<0,01	<0,001	<0,05					
L+C+0.1 [▼]	<0,05	*	*						
L+C+0.5 [▼]	<0,05	*							
L+C+1 [▼]	*								

ve yüksek dozlarda (0,05-2 mg/dL arası) oluşan TBARS düzeyleri arasında istatistiksel bir fark ortaya çıktı. Ancak bu fark beklenenin tersine azalma yerine artma şeklinde gözlemlendi (Şekil : 8).

b) Florometrik Sonuçlar:

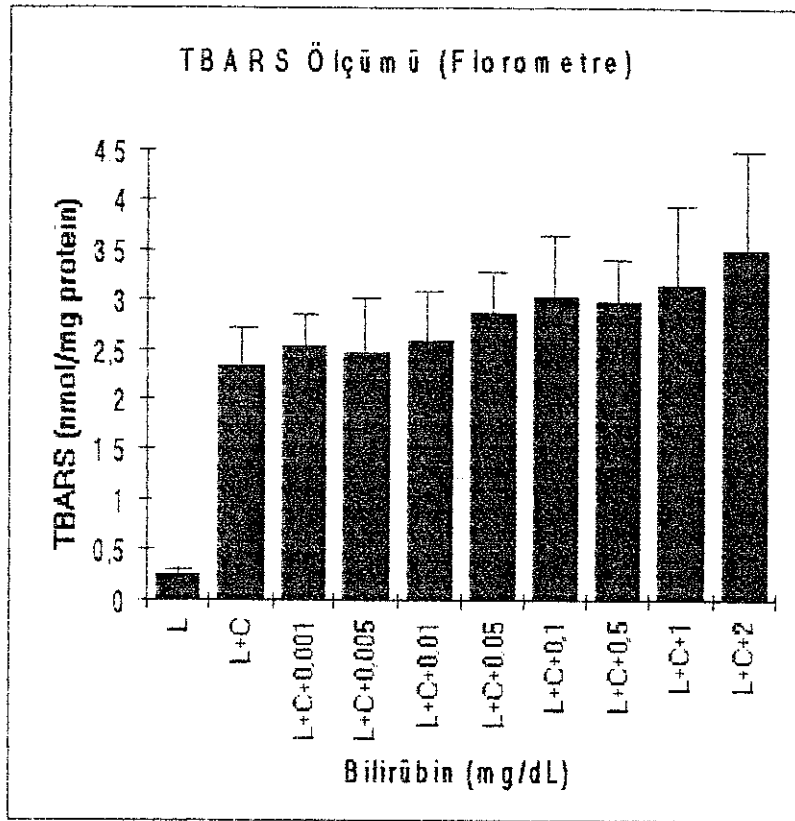
Spektrofotometrede TBARS ölçümü yapıldıktan sonra aynı numuneler aynı şartlar altında florometrede de okundu. Florometreden elde edilen sonuçlar spektrofotometreden elde edilen sonuçlara uyum gösterdi (Tablo 7, Şekil 9).

Tablo 7: Florometrede yapılan TBARS ölçüm sonuçları. (L:Lökosit 300 µg prot/mL C: CuOOH 10 mM. * : mg/dL BR)

	n	TBARS nmol/mg protein	
		$\bar{x} \pm SE$	SD
L	10	0,243 \pm 0,019	0,06
L+C	10	2,308 \pm 0,126	0,398
L+C+0.001 [▼]	10	2,517 \pm 1,108	0,342
L+C+0.005 [▼]	10	2,454 \pm 0,181	0,572
L+C+0.01 [▼]	10	2,578 \pm 0,152	0,482
L+C+0.05 [▼]	10	2,855 \pm 0,133	0,42
L+C+0.1 [▼]	10	3,02 \pm 0,199	0,628
L+C+0.5 [▼]	10	2,958 \pm 0,143	0,451
L+C+1 [▼]	10	3,14 \pm 0,252	0,861
L+C+2 [▼]	10	3,47 \pm 0,320	1,012

Sonuçlar elde edildikten sonra gruplar arasında farkın olup olmadığını araştırmak için yapılan varyans analizi sonucu, grup ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p < 0,001$).

Ancak bu fark ya da farkların, hangi gruplar arasında oluştuğunu ise bağımsız iki grup arasındaki farkın anlamlılık testi (t-testi) yapılarak ortaya konuldu (tablo 8).



Şekil 9: Florometrede TBARS ölçümü sonuçlarının grafikte gösterilmesi. (L:Lökosit 300 µg prot/mL C: CuOOH 10 mM, Rakamlar : mg/dL BR)

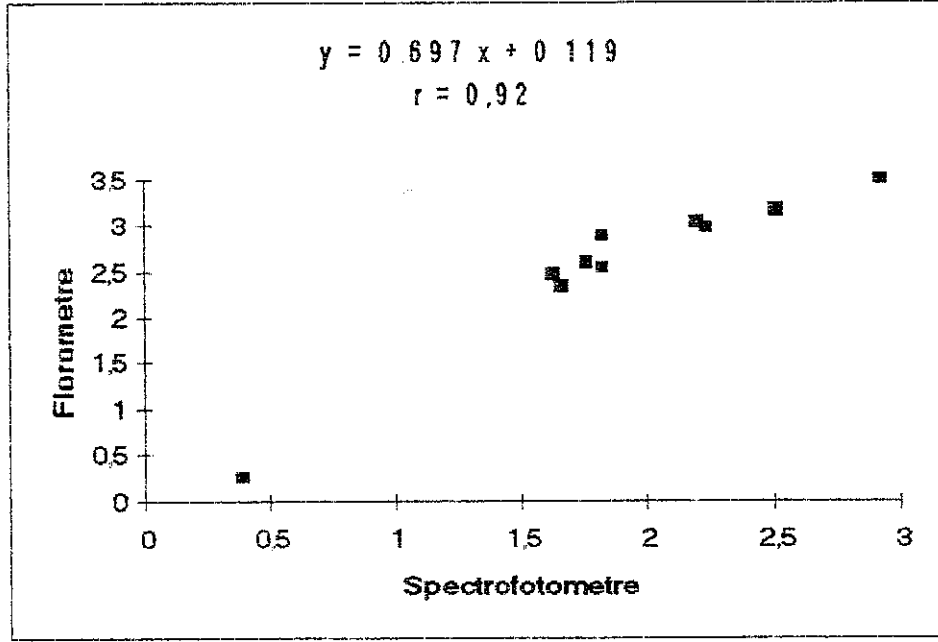
Sadece lökositin bulunduğu numuneden yapılan TBARS ölçümü ($0,243 \pm 0,019$ nmol / mg protein) düşük çıkarken, CuOOH'in bulunduğu ortamdan yapılan TBARS ölçümünde yine belirgin bir TBARS artışı vardı ($2,308 \pm 0,126$ nmol / mg protein) (tablo 7 ve şekil 9)

Lökosit ve CuOOH bulunan ortamın ölçülen TBARS sonucuyla, aynı ortama BR'in düşük konsantrasyonlarının (0,001 - 0,01 mg/dL) ilavesinden sonraki TBARS sonuçları arasında istatistiksel bir fark tesbit edilemezken, 0,05 - 2 mg /dL arasında BR ilavesiyle oluşturulan TBARS düzeyleri arasında belirgin farklar vardı (tablo 8). Ancak bu fark artma şeklindeydi.

Tablo 8: Florometrede gruplara ait TBARS ölçümü sonucunda yapılan bağımsız iki grup ortalamaları arasındaki farkın anlamlılık testi (t-testi) sonuçları. (L:Lökosit 300 µg prot/mL C: CuOOH 10 mM. * : BR mg/dL * : >0,05, fark anlamlı değil)

	L+C+2	L+C+1	L+C+0,5	L+C+0,1	L+C+0,05	L+C+0,01	L+C+0,005	L+C+0,001	L+C
L	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
L+C	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05	*	*	*	
L+C+0,001*	<0,05	*	<0,05	<0,05	*	*	*		
L+C+0,005*	<0,05	*	<0,05	<0,05	*	*			
L+C+0,01*	<0,05	*	*	*	*				
L+C+0,05*	*	*	*	*					
L+C+0,1*	*	*	*						
L+C+0,5*	*	*							
L+C+1*	*								

Aynı deney ortamının spektrofotometrede ve florometrede elde edilen sonuçları birbiriyle karşılaştırıldığında sonuçlar aynı olmamasına rağmen benzer şekildeydi ve aralarında bir korelasyon vardı. Her iki yöntemin sonuçlarını birbirleriyle kıyaslayıp aralarında regresyon analizi yaptığımızda $y = 0,697 x + 0,119$ denklemi elde edilmiştir. (y : spektrofotometre sonucu, x : florometre sonucu) ($r = 0,92$) (şekil :10)



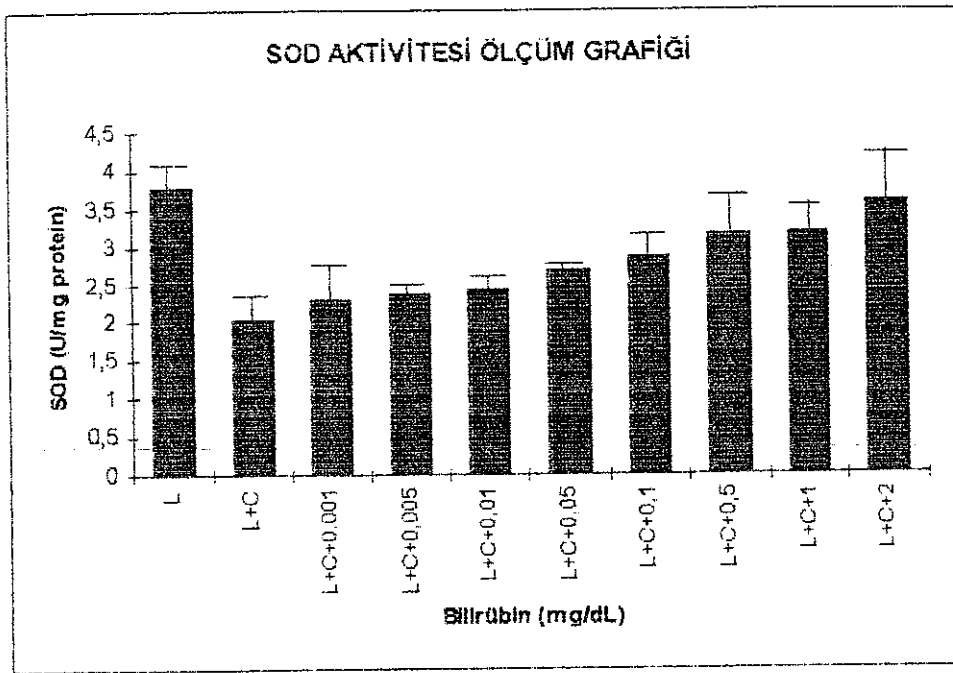
Şekil 10: Spektrofotometre ve florometrede ölçülen TBARS düzeylerinin karşılaştırılması.

2. SOD ÖLÇÜMÜ:

Lökosit, lökosit + CuOOH ve lökosit + CuOOH + BR'in farklı konsantrasyonlarında ilavesiyle yapılan inkübasyonlardan sonra gruplardan SOD ölçümleri yapıldı. Ölçümler sonucunda kendi grupları arasında ortalamaları ve standart hataları hesaplandı (tablo 9) ve bunlar şekil 11'de bir grafik halinde gösterildi.

Tablo 9 : SOD aktivitesi ölçüm sonuçları. (L:Lökosit 300 µg prot/mL, C: CuOOH 10 mM, BR mg/dL)

	n	SOD (U/mg protein)	
		$\bar{x} \pm SE$	SD
L	10	3,766 ± 0,098	0,31
L+C	10	2,022 ± 0,118	0,373
L+C+0,001*	10	2,266 ± 0,159	0,502
L+C+0,005*	10	2,348 ± 0,042	0,133
L+C+0,01*	10	2,413 ± 0,066	0,21
L+C+0,05*	10	2,657 ± 0,034	0,107
L+C+0,1*	10	2,845 ± 0,096	0,304
L+C+0,5*	10	3,122 ± 0,174	0,551
L+C+1*	10	3,155 ± 0,128	0,406
L+C+2*	10	3,546 ± 0,207	0,654



Şekil 11: SOD ölçüm sonuçlarının grafik halinde gösterilmesi. (L:Lökosit 300 µg prot/mL, C: CuOOH 10 mM. Rakamlar : BR mg/dL.)

Tüm gruplar arasında yapılan varyans analizi testi sonucu grup ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,001$). Gruplar arasındaki anlamlı farkı hangi grupların oluşturdukları araştırıldığında ise şu sonuçlar elde edildi (Tablo 10).

Tablo 10: Gruplara ait SOD aktiviteleri ölçümü sonucunda yapılan bağımsız iki grup ortalamaları arasındaki farkın anlamlılık testi (t-testi) değerlendirmeleri. (L:Lökosit 300 µg prot/mL, C: CuOOH 10 mM. * : BR mg/dL, * : $>0,05$, fark anlamlı değil)

	L+C+2	L+C+1	L+C+0,5	L+C+0,1	L+C+0,05	L+C+0,01	L+C+0,005	L+C+0,001	L+C
L	*	<0,01	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
L+C	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	<0,05	*	
L+C+0,001*	<0,001	<0,001	<0,01	<0,01	<0,05	*	*		
L+C+0,005*	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	*			
L+C+0,01*	<0,001	<0,001	<0,01	<0,01	<0,01				
L+C+0,05*	<0,01	<0,01	<0,05	*					
L+C+0,1*	<0,05	*	*						
L+C+0,5*	*	*							
L+C+1*	*								

Sadece lökositin bulunduğu numuneden yapılan SOD aktivite ölçümü ($3,766 \pm 0,098$ U / mg protein) yüksek çıkarken, CuOOH'in bulunduğu ortamdan yapılan SOD aktivite ölçümünde belirgin bir düşme vardı ($2,022 \pm 0,118$ U / mg protein) (tablo 9 ve şekil 11)

Lökosit ve CuOOH bulunan ortamda ölçülen SOD aktivitesi sonucuyla aynı ortama BR'in

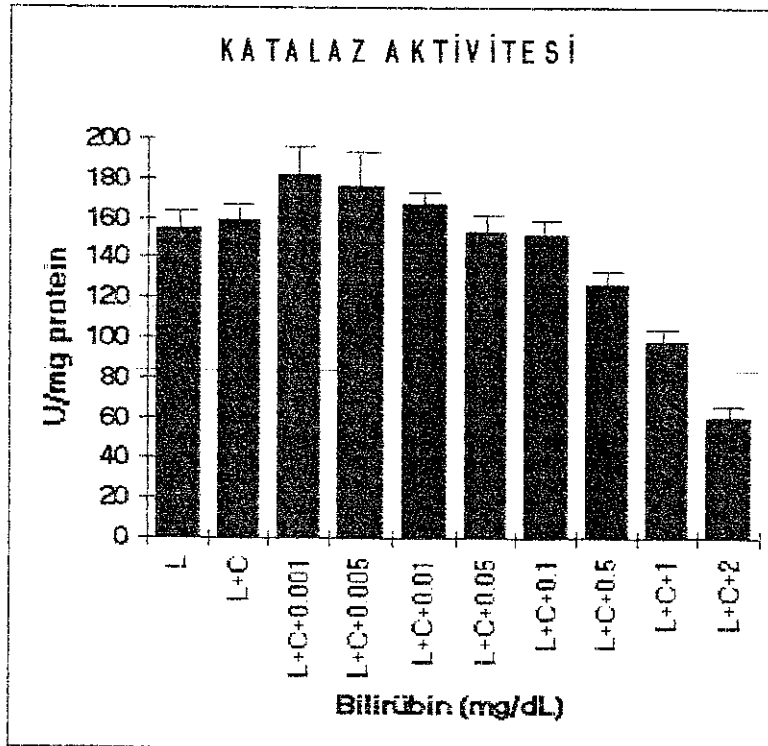
0,001 mg/dL'lik konsantrasyonu ilave edildikten sonraki SOD aktivitesi sonuçları arasında istatistiksel bir fark tesbit edilemezken 0,005 - 2 mg /dL arasında BR ilavesi sonucu ölçülen SOD aktivitesi düzeyleri arasında belirgin artma şeklinde farklar vardı (tablo 10).

3. KATALAZ AKTİVİTESİ ÖLÇÜMÜ :

Sadece lökosit ortamından, lökosite CuOOH ilavesi sonucu ve lökosite CuOOH ve BR'in farklı konsantrasyonlarının ilavesi sonucunda yapılan inkübasyonlardan sonra gruplardan katalaz ölçümleri yapıldı. Analizlerin neticesinde; kendi grupları arasında ortalamaları ve standart hataları hesaplandı (tablo 11) ve bunlar bir grafik halinde sunuldu (şekil 12).

Tablo 11 : Katalaz aktivitesi ölçüm sonuçları. (L:Lökosit 300 µg prot/mL, C: CuOOH 10 mM., * : BR mg/dL)

	n	Katalaz (U/mg protein)	
		$\bar{x} \pm SE$	SD
L	10	154,54 \pm 2,55	8,08
L+C	10	158,9 \pm 2,57	8,14
L+C+0.001*	10	181,55 \pm 4,57	14,4
L+C+0.005*	10	176,18 \pm 5,21	16,5
L+C+0.01*	10	166,74 \pm 1,95	6,15
L+C+0.05*	10	152,94 \pm 2,64	8,36
L+C+0.1*	10	151,05 \pm 2,5	7,9
L+C+0.5*	10	126,65 \pm 1,82	5,76
L+C+1*	10	97,894 \pm 1,48	4,7
L+C+2*	10	59,55 \pm 1,9	6,01



Şekil 12: Katalaz aktivitesi ölçüm sonuçlarının grafik halinde gösterilmesi. (L:Lökosit 300 µg prot/mL, C: CuOOH 10 mM, Rakamlar : BR mg/dL.)

Sonuçlar elde edildikten sonra tüm gruplar arasında varyans analizi yapıldı. Yapılan bu analizin sonucunda grup ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tesbit edildi ($p < 0,001$). Bu istatistiksel farkı ya da farkları hangi grupların oluşturduğunu araştırmak için bağımsız iki grup ortalamaları arasındaki farkın anlamlılık testi (t-testi) yapıldı ve neticeleri tablo 12'de sunuldu.

Katalaz ölçümünde; sadece lökosit bulunan grupta ($154,54 \pm 2,55 [\bar{x} \pm SE]$ U / mg protein), lökosit + CuOOH bulunan grup ($158,9 \pm 2,57$ U / mg protein) arasında istatistiksel anlamda bir fark tesbit edilemedi ($p > 0,05$) (tablo 11, şekil12).

Lökosit + CuOOH grubunun katalaz aktivitesi sonucuna göre lökosit + CuOOH + BR'in düşük konsantrasyonları (0,001 - 0,01 mg/dL) ilavesi sonucu elde edilen katalaz aktiviteleri artış gösterdi ve bu artış (fark) istatistiksel bakımdan anlamlıydı. 0,05 mg/dL 'lik BR ilavesi durumunda ölçülen katalaz aktivitesi sonucu, lökosit + CuOOH grubundan ölçülen katalaz aktivitesiyle benzerdi ve istatistiksel olarak fark yoktu ($p > 0,05$). BR'in 0,1 - 2 mg / dL konsantrasyonları ilavesi sonucu ölçülen katalaz aktivitesinde belirgin düşme görüldü ve bu düşüş istatistiksel olarak anlamlıydı (tablo 12).

Tablo 12: Katalaz ölçümü sonucu yapılan bağımsız iki grup ortalaması arasındaki farkın anlamlılık testi (t-testi) sonuçları. (L:Lökosit 300 μ g prot/mL, C: CuOOH 10 mM, * : BR mg/dL * : $> 0,05$, fark anlamlı değil)

	L+C+2	L+C+1	L+C+ 0,5	L+C+ 0,1	L+C+ 0,05	L+C+ 0,01	L+C+ 0,005	L+C+ 0,001	L+C
L	<0,001	<0,001	<0,001	*	*	<0,01	<0,01	<0,001	*
L+C	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	*	<0,05	<0,05	<0,001	
L+C+0,001*	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	*		
L+C+0,005*	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	*			
L+C+0,01*	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001				
L+C+0,05*	<0,001	<0,001	<0,001	*					
L+C+0,1*	<0,001	<0,001	<0,001						
L+C+0,5*	<0,001	<0,001							
L+C+1*	<0,001								

4 GSH ÖLÇÜMÜ:

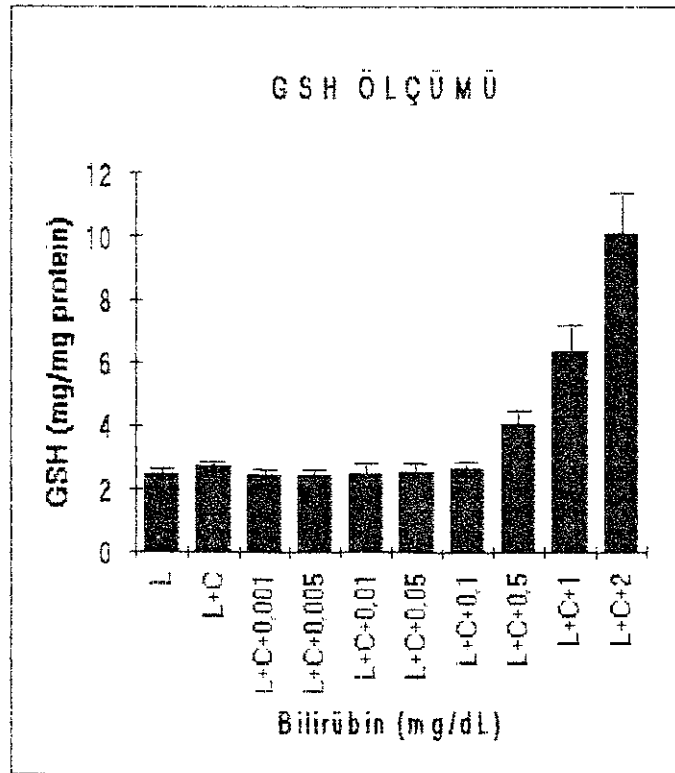
Yukarıdakilere benzer şekilde sadece lökosit grubundan, lökosit + CuOOH grubundan ve lökosit + CuOOH + BR'in farklı konsantrasyonlarının ilavesinden oluşan gruplara uygulanan inkübasyonlardan sonra her bir gruptan GSH ölçümleri yapıldı. Yapılan ölçümler sonucunda; kendi grup ortalamaları ve standart hataları hesaplandı (tablo 13) ve bunlar şekil 13'de bir grafik halinde gösterildi.

Tablo 13: Yapılan deneyler sonucunda elde edilen GSH ölçüm sonuçları
(L:Lökosit 300 µg prot/mL, C: CuOOH 10 mM., * : BR mg/dL)

	n	GSH (mg/mg protein)	
		$\bar{X} \pm SE$	SD
L	10	2,461 \pm 0,054	0,169
L+C	10	2,709 \pm 0,018	0,058
L+C+0,001*	10	2,404 \pm 0,049	0,156
L+C+0,005*	10	2,4 \pm 0,054	0,172
L+C+0,01*	10	2,463 \pm 0,092	0,291
L+C+0,05*	10	2,493 \pm 0,085	0,267
L+C+0,1*	10	2,62 \pm 0,085	0,267
L+C+0,5*	10	4,007 \pm 0,142	0,449
L+C+1*	10	6,34 \pm 0,267	0,844
L+C+2*	10	10,08 \pm 0,406	1,284

Deneye dahil edilen ve sonuçları elde edilen 10 grup arasında yapılan varyans analizi sonucu grup ortalamaları arasında bir farkın mevcut olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tesbit edildi ($p < 0,001$). Bu farkı oluşturan grup ya da grupları tesbit etmek için t-testi yapıldı ve elde edilen veriler tablo 14'de sunuldu.

Sadece lökositin bulunduğu numune grubundan yapılan GSH ölçümü ($2,461 \pm 0,054$ mg / mg protein) düşük çıkarken, CuOOH'in bulunduğu ortamdan yapılan GSH ölçümünde bir artış gözlemlendi ($2,709 \pm 0,018$ mg / mg protein) ($p < 0,001$) (tablo 13, şekil 13).



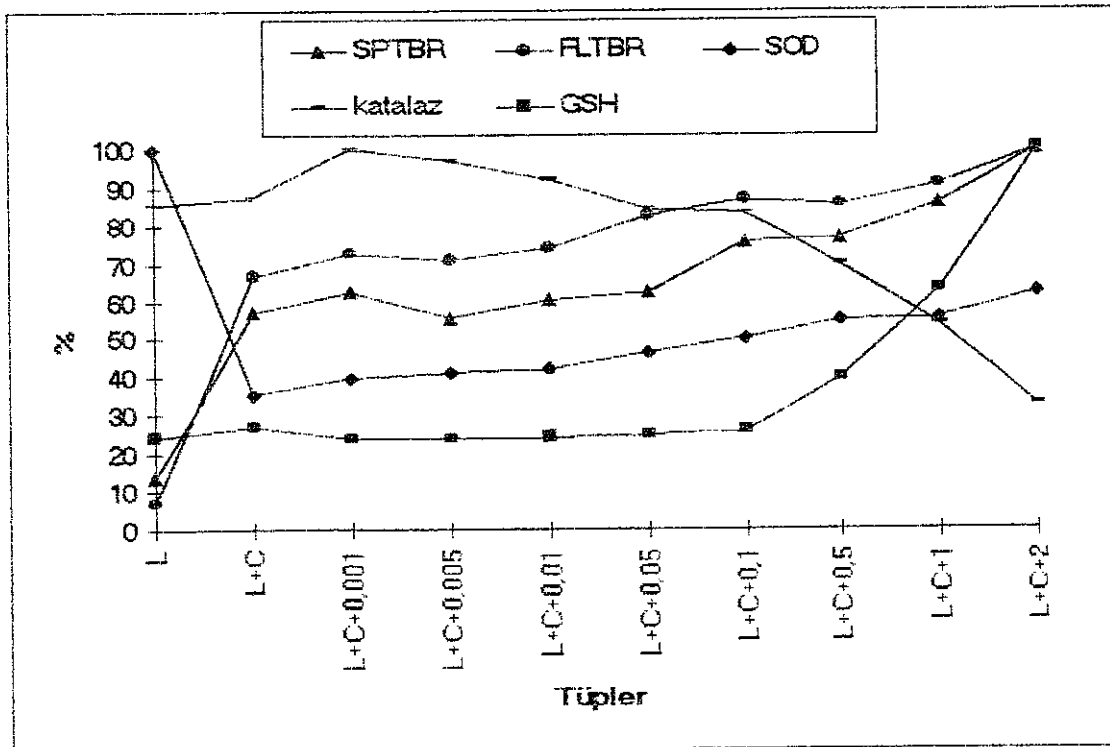
Şekil 13: GSH ölçüm sonuçlarının grafik halinde gösterilmesi. (L:Lökosit 300 µg prot/mL, C: CuOOH 10 mM., Rakamlar : BR mg/dL)

Tablo 14: GSH ölçümü yapılan grupların ortalamalarının anlamlı olup olmadığının göstermek için yapılan bağımsız iki grup ortalaması arasındaki farkın anlamlılık testi (t-testi) sonuçları. (L:Lökosit 300 µg prot/mL, C: CuOOH 10 mM. * : BR mg/dL * : >0,05, fark anlamlı değil)

	L+C+2	L+C+1	L+C+0,5	L+C+0,1	L+C+0,05	L+C+0,01	L+C+0,005	L+C+0,001	L+C
L	<0,001	<0,001	<0,001	*	*	*	*	*	<0,001
L+C	<0,001	<0,001	<0,001	*	<0,05	<0,05	<0,001	<0,001	
L+C+0,001*	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	*	*	*		
L+C+0,005*	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	*	*			
L+C+0,01*	<0,001	<0,001	<0,001	*	*				
L+C+0,05*	<0,001	<0,001	<0,001	*					
L+C+0,1*	<0,001	<0,001	<0,001						
L+C+0,5*	<0,001	<0,001							
L+C+1*	<0,001								

Lökosit ve CuOOH bulunan ortamda ölçülen GSH sonucuyla aynı ortama BR'in 0,1 mg/dL'lik konsantrasyonu ilave edildikten sonraki GSH sonucu arasında istatistiksel bir fark tesbit edilemezken BR'in diğer konsantrasyonlarda ilaveleri sonucu ölçülen GSH düzeyleri arasında farklar bulundu (tablo 14). Özellikle bu farklar 0,5-1 ve 2 mg/dL 'lik BR ilavelerinde elde edilen GSH sonuçlarında belirgin bir artış şeklindeydi (şekil 13).

Yapılan deneylerde elde edilen sonuçların tümünün toplu halde gösterilebilmesi (şekil 14)



Şekil 14 : Lökosit üzerine CuOOH ve değişik konsantrasyonlarda BR ilavelerinin, TBARS (spektrofotometrik ve florometrik ölçümler), SOD, katalaz ve GSH üzerine olan etkilerinin % olarak gösterilmesi. Parametreler içinde bulunan en yüksek değer % 100 kabul edilmiştir.

(L:Lökosit 300 µg prot/mL, C: CuOOH 10 mM, Rakamlar : BR mg/dL, SPTBR : Spektrofotometrik TBARS, FLTBR : Florometrik TBARS)

için her deneyin sonuçları kendi içinde % ifade halinde gösterildi. Deney sonucu bulunan en yüksek değer % 100 olarak kabul edildi. Oluşturulan grafik, şekil 14'de gösterildi. Buna göre spektrofotometrik ve florometrik sonuçlar birbiriyle uyumluydu. SOD, CuOOH ilavesiyle ani bir düşüş gösterdi fakat BR ilavesiyle giderek arttı. Katalaz CuOOH ilavesiyle değişmezken BR ilavesiyle önce arttı sonra azaldı. GSH düzeyleri ise CuOOH ilavesiyle arttı sonra BR ilavesiyle düştü. BR'nin yüksek konsantrasyonlarında ise tekrardan belirgin bir şekilde yükseldi.

VI. TARTIŞMA

Oksijen ile yaşayan tüm canlılarda normal metabolik işlemler sırasında kaçınılmaz bir şekilde üretilmekte olan serbest oksijen radikallerinin hücrenel komponentler üzerinde çeşitli hasarlara sebep olduğu bilinmektedir (5,7,25,33).

Lipid peroksidasyonu (LPO) serbest radikallerin neden olduğu en önemli hasarlardan birisidir. Membranlardaki doymamış yağ asitleri ve kolesterol, serbest radikallerle kolaylıkla reaksiyona girerek peroksidasyona maruz kalırlar. İki veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan ürünler arasında malondialdehit de yer almaktadır (25).

Zimmerman ve ark. yaptıkları çalışmada (35); hedef olarak eritrosit fosfolipidlerini veya beyin doku ekstraktlarını kullanarak, aktive edilmiş PMN lökositler vasıtasıyla fosfolipid peroksidasyonunu oluşturmuşlardır. Aynı çalışmada PMN lökositlerin, PMA ile spesifik olarak aktive edilmediği durumda da TBARS oluşumu görülmüştür. Bunun üzerine araştırmacılar; lipid miçellerinin de PMN solunum patlamasını direk olarak aktive edebildikleri şeklinde yorumlamışlardır.

Çalışmamızda, CuOOH ilave ettiğimiz lökositlerde peroksidasyon oluşumunu gözlememizin yanında, CuOOH ilave etmediğimiz lökositlerden de kısmen TBARS oluşumu gözledik (spektrofotometrik ölçümle $0,394 \pm 0,039$ nmol TBARS / mg protein). Elde ettiğimiz veriler, Zimmerman ve arkadaşlarının verileri ile uyumlu olup, herhangi bir oksidant uyarıma maruz kalmamış lökositlerle de TBARS oluşabileceğini göstermektedir.

Ohkawa ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada (15) karbon tetraklorür alımından 3 saat sonra karaciğer hücrelerinde TBARS miktarlarının belirgin bir şekilde arttığını göstermişlerdir.

Laboratuvarımızda yaptığımız bir çalışmada 0,15 mg Hb /dL ihtiva eden eritrositlerin 1 mM CuOOH ile inkübasyonunda, oluşan TBARS'ın belirgin bir şekilde yükseldiği gözlenmiştir (34)

Xiaocie ve arkadaşları (31) PMN lökositlerini, PMA ile uyarılmışlar ve bunlardan MDA düzeylerini ölçerek, lökositlerin kendileri tarafından üretilen oksijen radikalleriyle kendi membran lipidlerini peroksidede ettiklerini ve kontrole göre belirgin bir şekilde MDA seviyesinin arttığını gözlemişlerdir. Üretilen oksijen radikallerinin, PMN lökositlerin membranlarına, membran protein SH gruplarının etrafındaki mikroviskoziteyi ve membran yağ asidlerinin peroksidasyonunu artırarak, zarar verdiklerini ifade etmişlerdir.

Deney ortamımızda hedef hücre olarak lökositleri ve oksidan madde olarak da CuOOH'i kullandık. Çalışmamızda, ortamda bulunan lökosit membranları, 10 mM CuOOH ile inkübasyona tabi tutulduklarında TBARS oluşumu spektrofotometrik ölçümle $0,394 \pm 0,039$ nmol / mg proteinden ($\bar{x} \pm SD$), $1,662 \pm 0,152$ nmol / mg protein düzeyine ulaşmıştır ($p < 0,001$). (Tablo 5,7 ve Şekil :8,9). Diğer bir ifadeyle deney ortamımızdaki CuOOH, lökositlerde bir LPO'na neden olmuştur. Deney sonucumuz, diğer çalışma sonuçlarına uyum göstermiştir.

Xiaocie ve arkadaşlarının çalışmasında, (31) PMA uyarımı sonucu oluşacak olan MDA üzerine Çin bitkileri olarak bilinen schizandrin B (Sin B) ve quercetinin (Q) etkileri araştırılmış ve deney sonucunda oluşan MDA düzeylerinde, Sin B varlığında % 25, Q varlığında ise % 35,4'e varan bir düşme gözlenmiştir. Sonuç olarak iki Çin bitkisi olan Sin B ve Q'nün, PMA ile uyarılmış PMN lökositlerce üretilen oksijen radikallerini yakalayıcı etkisinin var olduğu ve PMN membran proteinlerinin SH gruplarını koruyabildiği ifade edilmiştir.

Topinka ve arkadaşlarının çalışmasında ise (10) sadece lenfositlerden, lenfosit + Na-askorbat + Fe²⁺ inkübasyonu sonucu ve lenfosit + Na-askorbat + Fe²⁺ + Tokoferol inkübasyonu sonucu MDA ölçümleri yapılmıştır. Lökositlere oksidan madde (Na-askorbat + Fe²⁺) ilavesi sonucu elde edilen MDA düzeyleri, sadece lenfositlerden elde edilen MDA düzeylerine göre belirgin şekilde artmış, ancak ortama tokoferol ilave edildiğinde ise MDA düzeyinde tekrardan bir düşme gözlenmiştir ($p < 0,01$). Aynı çalışmada tokoferol yerine pyritinol denendiğinde, tokoferoldeki gibi bir düşme tesbit edilememiştir ($p > 0,05$). Araştırmacılar, tokoferolün inhibe edici etkisini, tokoferol ve pyritinol arasındaki yapısal

farklılığa bağladıklarını ifade etmişlerdir.

Yukarıdaki çalışmalarda, benzer maksatlar için değişik hedef hücreler, oksidan ve antioksidan maddeler kullanılmakla birlikte, biz deney ortamımızda hedef hücre olarak lökositleri, oksidan madde olarak CuOOH'i (10 mM) ve antioksidan madde olarak BR'yi (0,001 - 2 mg/dL) kullandık. Bizim çalışmamızda TBARS düzeyleri; sadece lökositte spektrofotometrik olarak $0,394 \pm 0,039$ nmol / mg protein ($\bar{x} \pm SD$), florometrik olarak ise $0,243 \pm 0,06$ nmol / mg protein bulunurken 10 mmol/L CuOOH ilavesiyle spektrofotometrede $1,662 \pm 0,152$ nmol / mg protein, florometrede $2,308 \pm 0,398$ nmol / mg protein bulundu ($p < 0,001$). Ancak bu karışıma BR'in farklı dozları ilave edildiği zaman (0,001 - 2 mg / dL), TBARS oluşumunda bir azalma yerine artma gözlemlendi. Bu artış BR konsantrasyonu arttıkça belirginleşti. Bu sonuçlara göre BR, TBARS oluşumunu azaltmadığı gibi kendi konsantrasyon artışına bağlı olarak da TBARS artışına neden olmuştur. Bunu iki şekilde açıklamak mümkün olabilir:

1- J. van der Zee ve arkadaşlarının çalışmasında (29) t-BHP veya CuOOH, varlığında ve uygun bir katalist ilave edildiği zaman iki tip radikal oluşturulduğunu ifade etmişlerdir: Hematin (Fe^{3+}) varlığında peroksil radikalleri oluşturulurken, diğer yandan ferröz bipyridil ile UV radyasyonu esnasında ise alkoksil radikalleri meydana geldiğini ifade etmişlerdir. Araştırmacılar, radikalın özel bir tipinin oluşumunun ikinci bir reaksiyonla diğer bir radikalın oluşumuna yol açabileceğini belirtmişlerdir. Yazarlara göre sağlam eritrositlerin t-BHP'e veya CuOOH'e maruz bırakılmaları LPO'na ve K^+ sızıntısına neden olmuştur. Araştırmacılar bu sonuçların hangi radikallerle oluşabileceğini tesbit etmek için deneylerinde difenilamin, tiyoüre, bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) ve prometazin gibi antioksidanlar kullanmışlardır. Difenilamin güçlü bir alkoksil radikal yakalayıcısı olmasına rağmen, peroksil radikallerini yakalamadığı ileri sürülmüştür. Difenilamin LPO'nu güçlü bir şekilde inhibe ederken, K^+ kaybını inhibe etmediği ifade edilmiştir. Buna göre, t-BuO* ya da CuO*, LPO'nu başlattıkları, ancak K^+ sızıntısına karışmadıkları ifade edilmiştir. Tiyoüre ise bilinen bir peroksil radikal yakalayıcısı olduğu ve yapılan deneylerde aşikar bir şekilde K^+ sızıntısını inhibe etmesine rağmen LPO'nu inhibe etmediği ifade edilmiştir. Bunun yanında araştırmacılar, BHT ve prometazin gibi güçlü peroksil radikal yakalayıcılarının da K^+ sızıntısını güçlü bir şekilde inhibe ettiklerini ileri sürmüşlerdir. Buna göre peroksil radikallerinin K^+ sızıntısının oluşumuyla ilgili olduğunu ancak LPO'yla ilgili olmadıklarını belirtmişlerdir. Araştırma sonucunda yazarlar, LPO'nun, alkoksil radikali tarafından başlatılırken, peroksil radikaliyle başlatılamadığını ifade etmişlerdir.

Biz deney ortamımıza lökosit, alkoksil ve peroksil radikalleri oluşturabilen CuOOH ve bir peroksil radikal ve 1O_2 yakalayıcısı olarak bilinen BR ilave ettik. CuOOH, ortamda LPO oluşturmaya rağmen, BR'le TBARS konsantrasyonunun azalmadığını gözledik (Tablo 5,7 ve Şekil 8,9). CuOOH oluşturduğu alkoksil radikalleriyle ortamda LPO'na neden olmakta, ancak ortama koyduğumuz BR ise peroksil radikal yakalayıcısı olduğundan dolayı muhtemelen bu alkoksil radikallerini yakalayamamakta ve TBARS oluşumunu inhibe edemediğini düşündürmektedir.

2- MDA ölçümü için referans aldığımız Ohkawa ve arkadaşlarının (15) çalışmalarında, yöntemi interfere eden maddeler sayılmaktadır. Bu maddeler arasında yer alan glukozun, sukrozun ve N-asetilnöraminik asidin yanında, reaksiyon karışımındaki 1,0 mg (1,71 nmol) konsantrasyonundaki albümine bağlı BR'in, 532 nm'deki absorbandsa, interfere etmek üzere TBA ile reaksiyon yapabileceği ifade edilmiştir. Ancak yazarlar BR'in interferansının eksitasyon : 515 nm'de, emission : 553 nm'de olacak şekilde florometrik olarak ölçüm yapıldığı zaman interferansın ihmal edilebilecek düzeyde olduğunu ifade etmişler ve eğer numune bir miktar BR içeriyorsa florometrik yöntemle ölçülmeli diye tavsiye etmişlerdir.

Ancak yaptığımız deneylerde spektrofotometrik ve florometrik yöntemler arasında BR'in etkilemesi yönünde belirgin bir fark gözleyemedik ($y = 0,697 * x + 0,119$, $r = 0,92$) (Şekil : 7,9,10). Her ne kadar Ohkawa ve arkadaşları özellikle florometrik yöntemde BR'in interferansının gözlenmediğini ifade etseler de biz, hem spektrofotometrik, hem de florometrik yöntem sonucunda BR'in belirli konsantrasyonlarından itibaren (0,1 mg/dL) belirgin artışlar gözledik. Bu artışların, Ohkawa ve arkadaşları'nın ifadelerine rağmen, BR'in interferansı sonucu ortaya çıkmış olabileceği kanaatini taşımaktayız.

Tanrikulu'nun çalışmasında (25) PMN lökositlerde, H_2O_2 konsantrasyonunun artması, 1O_2 ve *OH gibi diğer reaktif oksijen radikallerinin oluşumuna ve doku harabiyetinin artmasına yol açacağı belirtilirken, Britgan ve arkadaşlarının "spin trapping" yöntemiyle yaptıkları çalışmada (28) PMA ile stimule edilmiş insan nötrofillerinin, demir mevcut olmadıkça *OH oluşturmadıklarını göstermişlerdir. Zimmerman ve arkadaşlarının çalışmasında (35) ise, deney ortamındaki O_2^- 'in, bir başka O_2^- 'le karşılaştırıldığında, daha güçlü bir oksidan olan HO_2^- (pKa : 4,8) ile denge haline geldiğini ve bu durumunda, asid ortamda peroksidasyonun kolaylaştığını ifade etmişlerdir.

Deney ortamımızda demir bulunmadığından dolayı Britgan ve ark.'nın (28) ifadelerine dayanarak *OH radikallerinin oluşturulmadığı söylenebilir. Bunun yanında deney ortamımızda Tanrikulu ve ark.'nın ifade ettikleri (25) gibi 1O_2 oluşmuş olsaydı, bunun da deney ortamımıza

artan şekillerde ilave edilen BR vasıtasıyla yakalanması (12,22) ve dolayısıyla LPO'nun engellenmiş olması gerekirdi. Ancak deneyimizde ilave ettiğimiz artan miktarlardaki BR'e rağmen TBARS oluşmaya devam etti.

Ayrıca çalışmamızda inkübasyon ortamımızın, fizyolojik pH'da (pH:7.4) olması nedeniyle Zimmerman ve ark'nın ifade ettikleri gibi asid ortamda HO_2^\cdot radikali oluşumu ihtimalinin de söz konusu olmadığı düşünülmektedir. Dolayısıyla çalışma ortamımızdaki TBARS oluşumunun, muhtemelen alkoksil (CuO^\cdot) radikaliyle oluşturulduğu kanaatindeyiz.

Miura ve ark. yaptıkları araştırma sonucunda (28), PMN plazma membranlarının oksijen radikalleri tarafından peroksidedilemediğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada, kullanılan PMN lökositlerdeki SOD miktarları $0,2 \text{ mg} / 10^7$ hücre olarak tayin edilmiştir. SOD'nin bu miktarı PMA ile uyarılmış PMN lökositlerin neden olduğu peroksidasyonu inhibe edecek yeterlikte bulunmuştur. Zimmerman ve arkadaşları ise yaptıkları araştırma sonucunda (35); SOD'nin, TBARS oluşumunu kısmen inhibe etmesine rağmen, tamamiyle inhibe etmediğini ifade etmişlerdir.

Çalışmamızda sadece lökositlerdeki SOD aktivite düzeylerini $3,766 \pm 0,098 \text{ U} / \text{mg}$ protein olarak, lökosite CuOOH ilavesi durumunda ise $2,022 \pm 0,118 \text{ U} / \text{mg}$ protein bulduk ($p < 0,001$). Lökositlerde bulduğumuz bu SOD aktivite değeri, Miura ve arkadaşlarının deneyinde (28) olduğu gibi lökosit membranlarının LPO'na engel olamamıştır. Ancak onların deneyinde kullanılan lökositlerin canlı olması nedeniyle böyle bir engellemeye neden olabildiği ya da değişik hesaplamalardan dolayı onların deneylerinde buldukları SOD aktivite değeri yeterli olurken bizim deneyimizde elde ettiğimiz SOD aktivite değerleri peroksidasyonu önlemede yetersiz kaldığı düşünülmektedir.

Deneyimizde, CuOOH 'in ilave edilmediği durumda SOD belirli bir aktivite göstermesine rağmen, CuOOH 'in ilavesi durumunda, ortamdaki SOD'm belirgin bir şekilde inhibe olduğunu gözledik. Ortama ilave edilen BR'in artan konsantrasyonları SOD üzerine olan inhibisyonu azaltmasına rağmen bu durum TBARS oluşumunda bir azalmaya neden olmadı. Dolayısıyla SOD'm TBARS oluşumunu tamamen engellememesi Zimmerman ve arkadaşlarının ifade ettikleriyle uyumluydu.

Pigeolet ve arkadaşlarının çalışmasında (16) SOD, GSH-Px ve katalazın kendi substratları tarafından ne şekilde inaktive edildiklerini ortaya çıkarmak amacıyla; H_2O_2 'in, CuOOH 'in, t-BHP'in, hidroksil ve süperoksit radikallerinin etkileri, GSH-Px, SOD ve katalaz üzerinde test edilmiştir. SOD; $4 \times 10^{-4} \text{ M}$ 'lık H_2O_2 ile (20 dakika ve 37°C ısıda) % 50 oranında inaktive edilirken organik peroksidler ve hidroksil radikallerinin bu enzim üzerine etkisi

bulunamamıştır.

Yaptığımız SOD ölçümüyle ilgili çalışmamızda; sadece lökosit grubundan elde ettiğimiz değer $3,766 \pm 0,098$ U / mg proteinken, oksidan madde ilavesiyle $2,022 \pm 0,118$ U / mg protein olarak bulduk. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,001$) (Tablo: 9). Ancak lökosit ve oksidan madde karışımına, BR'in artan miktarlardaki konsantrasyonları (0,001 - 2 mg/dL) ilave edildikçe bu değer $2,266 \pm 0,159$ dan, $3,546 \pm 0,207$ U / mg proteine kadar yükseldi (Tablo : 9, Şekil: 11) Bu veriler oksidan madde ilavesiyle ortamda yüksek düzeyde O_2^- ve H_2O_2 oluşmakta olduğunu düşündürmektedir. H_2O_2 'in fazla miktarda olduğu durumda ise Pigeolet ve ark.'nın çalışmasına göre SOD üzerinde inhibitör bir etki oluşturabilmektedir (16,25).

Çalışmamızda lökositlere oksidan madde ilavesi durumunda, SOD aktivitesini oldukça düşük bulmamıza rağmen, ortama BR'in artan miktarlardaki ilaveleri durumunda SOD aktivitesinin gittikçe arttığını gözledik. BR'in artan miktardaki ilavelerinin, H_2O_2 'in inhibitör etkisini giderek azaltmış olabileceğini düşündürmektedir. Bilindiği üzere BR, H_2O_2 veya organik hidroperoksidlerin varlığında peroksidazlar için bir indirgeyici substrat olarak davranmaktadır (22). Bu da bizim düşüncemizi desteklemektedir.

Katalaz ve GSH-Px lökositlerdeki peroksidasyona karşı koruyucu potansiyele sahip iki enzimdirler ve H_2O_2 ile diğer organik peroksidlerin neden olduğu LPO'nu önlemektedirler (25). Pigeolet ve ark.'nın çalışmalarında (16) katalaz, hidroksil radikalleri ve süperoksid anyonlarıyla inaktive edilirken, organik peroksidlerle inaktive edilememiştir. Yaptığımız çalışmada; sadece lökosit grubunun katalaz ölçüm sonuçlarıyla ($154,54 \pm 2,55$ U/mg protein), lökositte oksidan madde ilavesiyle elde edilen katalaz sonuçları ($158,9 \pm 2,57$ U/mg protein) arasında istatistiksel bir fark bulamadık ($p > 0,05$). Çalışma sonuçlarımız Pigeolet ve ark.'nın, katalazın organik hidroperoksidlerle inhibe edilemediği ifadesiyle uyum göstermesine rağmen, katalazın O_2^- anyon radikalleriyle inhibe olabileceği ifadesiyle uyumlu bulunmamıştır. Çünkü çalışmamızda oksidan madde ilavesi durumunda ortamda oluşması kuvvetle muhtemel olan O_2^- 'nin varlığında katalaz inhibe olmamıştır.

Kökoğlu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; (9) lökosit katalaz aktivitelerini Beers ve Sizer'in yöntemiyle ölçmüşler ve kontrol katalaz sonuçlarıyla, akut lenfoblastik lösemi ve akut nonlenfoblastik lösemi sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamamışlardır ($p > 0,05$). Aynı araştırmacılar, SOD enzimi aktivitesinin artması sonucu süperoksid radikallerinin hızlı bir şekilde dismutasyonundan dolayı, yüksek düzeylerde H_2O_2 oluşumunun kaçınılmaz olduğunu ifade etmişlerdir. Akut lösemilerde lökosit katalaz

aktivitesindeki artışın, SOD aktivitesindeki artışa göre daha az olması, H_2O_2 detoksifikasyonunun yeterince yapılmamasına neden olacağından, dolayısıyla H_2O_2 'den Haber-Weiss reaksiyonuyla bugüne kadar bilinen en sitotoksik radikal olan hidroksil radikallerinin oluşumunun artacağını ve bunun sonucunda hücre membranlarının bütünlüğünün bozulabileceğini belirtmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada ise lökositlerin oksidan maddeyle inkübasyonundan sonra SOD miktarlarında belirgin bir düşüş varken, katalaz miktarında istatistiksel olarak bir fark bulunamadı. Lökositlerin, fazla miktardaki oksidan maddeye maruz bırakılması sonucu aşırı miktarda O_2^- ve H_2O_2 oluşumuna yol açmakta ve oluşan H_2O_2 de, SOD'yi inhibe ederken, kendisi de normal aktivite gösterdiği farzedilen katalaz tarafından zararsız hale getirilmeye çalışılmaktadır. Ancak SOD'nin inhibe olması O_2^- 'in başka yollara sapıp LPO oluşturabileceğini göstermiştir. Kökoğlu ve ark.'nın çalışmasında $^{\bullet}OH$ oluştuğu ifade edilirken çalışmamızda muhtemelen alkoksil radikali de oluşmakta ve LPO da muhtemelen bu radikalle gerçekleşmektedir.

Tanrıkulu'nun çalışmasında (25) GSH-Px ve katalaz aktiviteleri Behçetli hastalarda kontrol grubuna göre önemli ölçüde düşük bulunmuştur. Antioksidan sistemin başlıca üyeleri olan bu enzimlerin aktivitelerindeki azalma, H_2O_2 'nin detoksifikasyonundaki azalma ile sonuçlanacağı ifade edilmiştir.

Katalaz ölçümüyle ilgili çalışmamızda; lökositlere oksidan madde ilave edildiğinde elde edilen katalaz sonuçları ile sadece lökosit bulunan ortamın katalaz aktivite sonuçları arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Ancak lökositler üzerine $CuOOH$ 'in tatbikinden sonra katalaz aktivitesini düşük bulmamıza rağmen bu ilavenin, Tanrıkulu ve arkadaşlarının çalışmasındaki gibi yüksek oranda H_2O_2 oluşmasına neden olduğu düşünülmektedir. Ancak çalışmamızda Pigeolet ve ark.'nın çalışmaları (16) sonucunda ifade ettikleri gibi katalaz üzerine ne H_2O_2 'in ne de organik peroksidlerin inhibitör etkisi gözlenmemiştir.

Bununla birlikte çalışmamızda aynı ortama BR'in düşük konsantrasyonları (0,001-0,01 mg/dL) ilave edildiğinde katalaz aktivitesinde artış gözlenmiştir (tablo :11, şekil :12) (sırasıyla: 181.55 ± 4.57 , 176.18 ± 5.21 ve 166.74 ± 1.95 U/mg protein) ($p<0.001$, $p<0.05$ ve $p<0.05$). Mevcut yayınlarda oksijen radikal türlerinin ya da peroksidasyon esnasında oluşan ara ürünlerin herhangi birisinin katalazı aktive ettiği şeklinde bir literatür bilgisine rastlanmamıştır. Bundan dolayı katalazdaki bu aktivite artışının, muhtemelen BR'in düşük dozlarından ileri geldiği şeklinde yorumlanabilir. BR'in 0,05 mg/dL dozundaki ilavesinde ise

katalaz aktivitesi $152,94 \pm 2,64$ U/mg protein bulunmuş ve bu düzeyiyle lökosit + oksidan madde grubundaki katalaz değeri ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Çalışmamızda, BR'in 0,1-2 mg/dL düzeylerindeki ilavelerinde ise katalaz aktivite düzeyi gittikçe düşmüş ve 2 mg/dL için katalaz değeri $59,55 \pm 1,9$ U/mg protein olarak bulunmuştur ($p<0,001$) (tablo:11, şekil:12). Katalazı inhibe eden maddeler arasında hidroksil radikalleri ve süperoksit anyonları sayılırken, organik peroksidlerin inhibe etmedikleri ifade edilmiştir (16). Deneş ortamımızda muhtemelen demir ve demir bileşikleri bulunmadığından dolayı katalaz üzerine $\cdot\text{OH}$ radikallerinin inhibisyonun olamayacağı düşünülmektedir. Öte yandan O_2^- 'nin katalazı inhibe ettiği göz önünde tutulursa, katalazın lökosit + oksidan madde ilavesi sonucunda ölçülen aktivitesinin de inhibe olması gerekirdi. Çünkü o zaman O_2^- daha fazla olması ve katalazı inhibe etmesi söz konusu olurdu. Elde ettiğimiz sonuçlar bu düşünceyi desteklemedi. Bu durumda katalaz inhibisyonunun ne $\cdot\text{OH}$ radikaliyle, ne de O_2^- 'yle olmadığına göre muhtemelen BR'in düşük konsantrasyonlarının, katalazı aktive edilebileceği, normal ve yüksek konsantrasyonlarının da katalazı inhibe edilebileceği şeklinde yorumlanabilir.

GSH'in hücre içinde oksidatif strese karşı müdafada önemli bir rolü vardır. Sitozolik GSH miktarını azaltan bir ajan olan Diamid'in veya organik hidroperoksit olan CuOOH'in kalp hücrelerine uygulanması LPO ve ciddi hücre hasarı oluşturmuştur (7,8).

Bizim GSH ile ilgili çalışmamızda sadece lökosit grubundan elde edilen GSH sonucuyla ($2,461 \pm 0,054$ mg GSH / mg protein) lökosit ve oksidan madde birlikteliğinde elde edilen GSH sonucu ($2,709 \pm 0,018$ mg GSH/mg protein) arasında artış şeklinde bir fark bulduk ($p<0,001$) (tablo:13, şekil: 13).

Scott ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada, (19) PMN lökositlerde GSH ölçümü yapmışlar ve lökositlerde GSH miktarını $12,3 \pm 2,5$ nmol / 10^7 ($\bar{x} \pm \text{SD}$) olarak bulmuşlardır. Aynı araştırmacı, bir başka çalışmasında (18) ise flow sitometrik yöntemle nötrofillerden, monositlerden ve lenfositlerden GSH düzeyleri ölçmüş. Sonuçta ise GSH miktarını, $12,5 \pm 2$ nmol / 10^7 nötrofil, $14,5 \pm 2,7$ nmol / 10^7 monosit ve $5,0 \pm 1,0$ nmol / 10^7 lenfosit olarak bulmuştur. Bu GSH sonuçlarının birimleri, bizim sonuçlarımızdan farklı olduğundan karşılaştırma imkanı bulunamamıştır.

Koster ve arkadaşları, (8) romatoid artritli (RA) hastaların eritrositleriyle, kontrol eritrositlerini 60 dakikalık sürede, 5 mM CuOOH'le inkübe etmişler ve geçen süreler içinde her iki gruptan da GSH ölçümleri yapmışlardır. CuOOH ilave edilenler başlangıçta,

edilmeyenlerin % 20 civarında GSH seviyeleri gösterirken ilerleyen zaman içinde (~ 20 dakika sonra) CuOOH ilave edilmeyenlerle aynı seviyeye yükselmiştir. Ancak 60 dakika sonunda RA'li eritrosit GSH düzeyleriyle, kontrol grubu eritrosit GSH düzeyleri arasında istatistiksel bir fark bulunamamış ve sonuç olarak peroksidatif şartlar altında uygun GSH seviyelerini sürdürme kapasitelerinin her iki grup için de aynı olduğu ifade edilmiştir.

Bizim GSH ile ilgili çalışmamızda sadece lökosit grubundan elde edilen GSH sonucuna göre lökosit ve oksidan madde birlikteliğinde elde edilen GSH sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi. ($p < 0,001$) (tablo:13, şekil13). Ancak BR'in düşük miktarlardaki ilavelerinde (0,001-0,1mg/dL) GSH düzeylerinde tekrardan istatistiksel olarak anlamlı bir düşme görülmesine rağmen BR'in 0,5-2 mg/dL'lik konsantrasyon ilavelerinde ise tablo:13 ve şekil 13 de görüldüğü gibi istatistiksel olarak anlamlı bir GSH yükselişi gözlemlendi ($p < 0,001$).

Bilindiği üzere organik hidroperoksidler, GSH-Px aktivitesi için substrat olarak davranırlar ve intrasellüler GSH'ın okside hale gelmesiyle zararsız hale getirilirler (7). GSH'in, GSH-Px ile birlikte herhangi bir nedenle oluşan H_2O_2 'in yıkımında da rol aldığı değişik yayınlarda ifade edilmektedir (8,21). Yaptığımız çalışmada, lökosit üzerine CuOOH ilavesi durumunda GSH'ın GSSG'ye dönmesi, dolayısıyla da GSH miktarının düşmesi bekleniyordu. Ancak Koster ve ark.'nın çalışmasında (8) da ifade edildiği üzere GSSG kısa bir süre sonra GSH haline dönebilmektedir. İnkübasyon süresini 60 dakika tuttuğumuzdan dolayı bu süre içerisinde muhtemelen oluşan GSSG'nin büyük kısmı tekrar GSH haline dönmüş olabileceğini düşünüyoruz. Çalışmamızda GSH miktarını 60 dakika sonra artmış bulduk. Muhtemelen oluşan GSSG'lerin büyük kısmı GSH haline dönmesinin yanında GSH'ın, H_2O_2 'in yıkımında da rol almasından dolayı ilerleyen zaman içinde GSH kullanımının fazla olmasına bağlı olarak hücre GSH sentezinin de artmış olabileceği düşünülmektedir.

Ancak ortama BR'in düşük konsantrasyonları ilave edildiğinde GSH miktarında tekrardan bir düşme gözlemlendi. Muhtemelen konjuge edilmemiş BR, H_2O_2 veya organik hidroperoksidlerin varlığında peroksidazlar için bir indirgeyici substrat olarak davranırlar (22). Bu nedenle GSH'a olan ihtiyacın azalmış olabileceği tahmin edilmektedir.

BR'in normal ve yüksek düzeyde ilavelerindeki GSH miktarlarının aşırı derecede artmış bulunması ise GSH'ın 412 nm'de okunması ve bu dalga boyunun BR'in maksimum absorpsiyon verdiği 453 nm'ye yakın olması nedeniyle, muhtemelen BR'in interferansının olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak; lökositler üzerine CuOOH'in oksidan etkisinin ve BR'in farklı konsantrasyonlarda antioksidan etkisinin olup olmadığını araştırmak üzere yaptığımız bu

çalışmada şu sonuçlar elde edilmiştir;

1- CuOOH'in lökosit membranlarını perokside ettiği, ancak bu peroksidasyonu alkoksil radikalleri ile yaptığı, dolayısıyla ilave ettiğimiz BR düzeylerinin hiçbirisinin TBARS oluşumunu azaltmadığı kanaatine varılmıştır.

2- Oksidan madde ilavesinin SOD'yi inhibe ettiği (muhtemelen fazla miktarda H_2O_2 oluşturarak) ve BR ilavelerinde bu inhibisyonun giderek azaldığı bulunmuştur.

3- Katalaz, BR'in düşük konsantrasyonlarında aktive olurken, normal ve yüksek konsantrasyonlarında inhibe olduğu gözlenmiştir.

4- CuOOH ilavesiyle GSH miktarının azalmadığı, sürenin uzun olmasından dolayı GSH'ın kendini yenilediği, hatta muhtemelen H_2O_2 'in yıkımında görev aldığından dolayı ihtiyaca bağlı olarak sentezinin arttığı kanısına varılmıştır.

VII. ÖZET

Bu çalışmada, lökositler üzerine bir oksidan madde olan kümen hidroperoksid (CuOOH) ile bir antioksidan madde olarak kabul edilen bilirübin'in (BR) değişik konsantrasyonları tatbik edildikten sonra, lökositlerden, TBARS ve redükte glutatyon (GSH) seviyeleri ile süperoksid dismutaz (SOD) ve katalaz aktiviteleri ölçüldü.

Elde edilen numunelerden lökosit havuzu yapıldı ve bu lökositler, her deney öncesinde, CuOOH'le ve BR'in değişik konsantrasyonlarıyla 60 dakikalık süre boyunca inkübe edildiler.

Tiyobarbitürik asid reaktif maddelerin (TBARS) ölçümü, BR'in interferansını elimine etmek için, hem spektrofotometrede, hem de florometrede okundu. CuOOH'e maruz bırakılmış lökositlerin TBARS düzeyleri, maruz bırakılmamış lökosit düzeylerinden, belirgin bir şekilde yüksek bulundu ($p < 0,001$), ancak ortama ilave ettiğimiz BR'in farklı konsantrasyonlarından hiçbiri, TBARS oluşumunu azaltmadı. Buna ilaveten spektrofotometrik ve florometrik yöntemler arasında BR'in eliminasyonu yönünde bir fark gözlenmedi.

Lökositlerin CuOOH'e maruz bırakılmasından sonra ölçülen lökosit SOD aktivitesi, maruz kalmamış lökositlerin SOD aktivitesinden daha düşüktü ($p < 0,001$), ancak BR'in artan konsantrasyonlarda ilavesiyle, SOD aktivitesi giderek arttı.

CuOOH'e maruz kalmış lökositlerin katalaz sonucu ile maruz kalmamış lökositlerin katalaz sonucu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. Katalaz aktivitesi BR'in düşük konsantrasyonlarının ilavesiyle artmasına rağmen, normal ve yüksek konsantrasyonlarının ilavesiyle azalma gösterdi.

Lökosit GSH sonuçlarına göre, CuOOH'e maruz kalmış lökosit GSH seviyeleri artış gösterdi ($p < 0,001$). Ortama BR ilavesiyle tekrar bir düşme gözlendi. BR'in yüksek konsantrasyonlarında ise GSH seviyeleri belirgin bir şekilde arttı.

Sonuç olarak; CuOOH lökositlerde LPO oluşturmuştur, ancak BR bu peroksidasyon esnasındaki TBARS oluşumunu engelleyememiştir. BR'in deney ortamında kullanılan tüm konsantrasyonları, SOD'yi artan şekilde aktive ederken, düşük konsantrasyonlarının, katalazı aktive ettiği, yüksek konsantrasyonlarının ise inhibe ettiği dikkat çekmiştir. Buna ilaveten CuOOH'e maruz kalmış lökositlerin GSH seviyeleri artmış, ancak BR'in ortama ilavesi lökosit GSH düzeylerini tekrar düşürmüştür.

VIII. SUMMARY

In this study, leukocytes were exposed to cumene hydroperoxyde (CuOOH), an oxidant substance, and to various concentrations of bilirubin (BR), an antioxydant substance. Then thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and reduced glutathion (GSH) levels, superoxyde dismutase and catalase activities of leukocytes were measured.

Leukocyte pool was prepared from the samples obtained and these leukocytes were incubated with CuOOH and various concentrations of BR, for 60 minutes before each experiment.

The measurement of TBARS was performed both with a spectrophotometer and a fluorometer to eliminate the interferences arising from BR. TBARS levels of leukocytes exposed to CuOOH were statistically higher than unexposed leukocytes ($p < 0,001$), but any concentrations of BR that we added to the medium did not effect the TBARS levels. In addition, no difference was observed between the spectrophotometric and fluorometric methods.

The SOD activity measured after the exposure of leukocytes to CuOOH was lower than the SOD activity of unexposed leukocytes ($p < 0,001$), but SOD activity gradually increased when increased concentrations of BR were added to the medium.

No statistically significant difference was observed between unexposed leukocyte catalase activity and catalase activity of leukocytes exposed to CuOOH. Catalase activity was increased with addition of low concentrations of BR, but decreased with addition of normal and high concentrations of BR.

According to the results of leukocyte GSH measurement, GSH levels in leukocytes exposed to CuOOH increased ($p < 0,001$). A decrease was observed again in GSH levels by addition of BR to the medium. GSH levels clearly increased at high concentrations of BR.

Finally, CuOOH has generated LPO in leukocytes, but BR could not prevent TBARS generation during this peroxidation. All concentrations of BR used in these experiments have gradually activated SOD enzyme, but BR has activated catalase at low concentrations and inhibited the activity at high concentrations. In addition, GSH levels of leukocytes exposed to CuOOH were increased, but addition of BR to the medium again decreased GSH levels of leukocytes.

IX. - KAYNAKLAR

- 1- Airbank V.F.F., Klee G.G., Edited by Tietz N.W., "Textbook of Clinical Chemistry - Biochemical Aspects of the Hematologie" W.B.Saunders Company Philadelphia, pp: 1495-1588, 1986
- 2- Chiu D., Kuypers F., Lubin B., "Lipid peroxidation in human red cells", Seminars in Hematology, 26(4): 257-276, 1989
- 3- Codish H., Baltimore D., Berk A., Molecular Cell Biology, Third Edition, Scientific American Books, 1995
- 4- Goth L., "Serum Catalase: Reversible formed charge isoform of erythrocyte catalase" Clinical Chemistry, 37(12): 2043-2047, 1991
- 5- Gutteridge J.M.C., "Lipid peroksidation and antioksidants as biomarkers of tissue damage", Clinical Chemistry, 41(12): 1819-1828, 1995
- 6- Hägglöf B., Marklund S.L., Holmgren G., "CuZn superoxide dismutase, Mn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in lymphocytes and erythrocytes in insulin dependent diabetic children", Acta Endocrinologica, 102:235-239, 1983
- 7- Horton A.A., Fairhurst S., "Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity", CRC Critical Reviews in Toxicology", 18(1): 27-73, 1987
- 8- Koster J.F., Biemond P., Swaak A.J.G., "Intracellular and extracellular sulphhydryl levels in rheumatoid arthritis", Annals of the Rheumatic Diseases, 45: 44-6, 1986
- 9- Kökoğlu E., Belce A., Gümüştaş K., Aktuğlu G., "Akut lösemilerde lökosit katalaz enziminin önemi", Turkish Journal of Neoplasia, 2(3):115, 1994
- 10- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall J., Journal of Biological Chemistry 193: 265, 1951
- 11- Markert M., Vaglio M., Frei J., "Activation of the human neutrophil respiratory burst by an anion channel blocker", Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 111(5): 577-583, 1988
- 12- McDonagh A.F., "Is bilirubin good for you?", Clinics in Perinatology, 17(2): 359-369, 1990

- 13- Neuzil J., Stocker R., "Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin", *FEBS* 13055, 331(3): 281-284, 1993
- 14- O'Brien J.S., Edited by Tietz N.W., "Textbook of Clinical Chemistry - Lysosomal Enzymes" W.B. Saunders Company Philadelphia, pp: 763-774, 1986
- 15- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K., "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction", *Analytical Biochemistry*, 95: 351-8, 1979
- 16- Pigeolet E., Corbisier P., Houbion A., Lambert D., Michiels C., Raes M., Zachary M.D., Remacle J., "Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxidase and oxygen derived free radicals", *Mechanisms of Ageing and Development* 51(3): 283-297, 1990
- 17- Pincus M.R., Zimmerman H.J., Henry J.B., "Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods - Clinical Enzymology" 19th Edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp:268-295, 1996
- 18- Scott R.B., Collins J.M., Matin S., White F., Swerdlow P.S., "Simultaneous measurement of neutrophil, lymphocyte, and monocyte glutathione by flow cytometry. " *Journal of Clinical Laboratory Analysis (United States)*, 4(5): 324-327, 1990
- 19- Scott R.B., Matin S., Hamilton S.C., "Glutathione, glutathione S-transferase, and transmembrane transport of glutathione conjugate in human neutrophil leukocytes." *Journal of Laboratory and Clinical Medicine, (United States)*, 116(5): 674-680, 1990
- 20- Siegers C.P., Younes M., "Clinical significance of the glutathione-conjugating system", *Pharmacological Research Communications*, 15(1): 1-13, 1983
- 21- Smith J.A., Baker M.S., Weidemann M.J., "Free radical generation in hydroperoxyde-treated erythrocytes monitored continuously by luminol-amplified chemiluminescence", *Biochemistry International*, 28(6): 1009-1020, 1992
- 22- Stocker R., Ames B. N., "Potential role of conjugated bilirubin and copper in the metabolism of lipid peroxides in bile", *Proceeding National Academia of Science USA*, 84: 8130-8134, 1987
- 23- Stocker R., Yamamoto Y., McDonagh A.F., Glazer A. N., Ames B.N., "Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance", *Science*, 235(4792): 1043-1046, 1987
- 24- Sun Y., Oberley L.W., Lu Y., " A simple method for clinical assay superoxide dismutase", *Clinical Chemistry*, 34(3): 497-500, 1988
- 25- Tanrikulu G., "Behçet Sendromu'nda PMN lökosit ve serum antioksidasyon mekanizmasında yer alan enzim düzeylerindeki değişiklikler" (Doktora Tezi) Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1991

- 26- Taourel D.B., Guérin M.C., Torreilles J., "Is malonaldehyde a valuable indicator of lipid peroxidation?", *Biochemical Pharmacology*, 44(5): 985-988, 1992
- 27- Topinka J., Binkova B., Sram R.J., Erin A.N., "The influence of α -tocopherol and pyritinol on oxidative DNA damage and lipid peroxidation in human lymphocytes", *Mutation Research*, 225: 131-136, 1989
- 28- Toshiaki Miura and Taketo Ogiso, "Lipid peroxidation of the erythrocyte membrane caused by stimulated polymorphonuclear leukocytes in the presence of ferritin", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 39(6), 1507-1509, 1991
- 29- van der Zee J., van Steveninck J., Koster J.F., Dubbelman T.M.A.R., "Inhibition of enzymes and oxidative damage of red blood cells induced by t-butylhydroperoxide-derived radicals", *Biochimica et Biophysica Acta*, 980: 175-80, 1989
- 30- Wolfe L.C., "Oxidative injuries to the red cell membrane during conventional blood preservation", *Seminars in hematology*, 26(4): 307-312, 1989
- 31- Xiaolie L., Liangjun Y., Baolu Z., Jingwu H., Wenjaun X., "Effects of oxygen radicals on the conformation of sulphydryl groups on human polymorphonuclear leukocyte membranes", *Cell Biology International Reports*, 15(8):667-674, 1991
- 32- Yalçın A.S., Kılınç A., Gülcan G., Sabuncu N., Emerk K., "Cumene hydroperoxide induced in vitro peroxidative changes in human red blood cell membranes", *Biochemical Archives*, 5:147-152, 1989
- 33- Yalçın A.S., Sabuncu N., Emerk K., "Cumene hydroperoxyde-induced chemiluminescence in human erythrocytes effect of antioxydants and sulphhydryl compounds" *International Journal of Biochemistry*, 24(3): 499-502, 1992
- 34- Yeşilkaya A., Yeğin A. "Inhibition of human erythrocyte (Na⁺-K⁺)ATPase by organic hydroperoxides and protection by ascorbic acid and butylated hydroxytoluene", *General Pharmacology*, (Yayın aşamasında)
- 35- Zimmerman J.J., Lewandoski J.R., "In vitro phosphatidylcholine peroksidation mediated by activated human neutrophils", *Circulatory Shock*, 34: 231-239, 1991

11/11/91
 11/11/91
 11/11/91