

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**N-NİTROZODİETİLAMİN'İN (NDEA) RAT KALP DOKULARINDA ADENOSİN
DEAMİNAZ, KSANTİN OKSİDAZ, NİTRİK OKSİT METABOLİZMASI VE
OKSİDAN / ANTİOKSİDAN SİSTEMDE GÖREV ALAN ENZİM AKTİVİTELERİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI:
ELLAJİK ASİDİN ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Bil. Uzm. ZAHİDE ESRA DURAK

Tez Danışmanı

Prof. Dr. MUSTAFA KAVUTÇU

ANKARA

Kasım 2012

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**N-NİTROZODİETİLAMİN'İN (NDEA) RAT KALP DOKULARINDA ADENOSİN
DEAMİNAZ, KSANTİN OKSİDAZ, NİTRİK OKSİT METABOLİZMASI VE
OKSİDAN / ANTİOKSİDAN SİSTEMDE GÖREV ALAN ENZİM AKTİVİTELERİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI:
ELLAJİK ASİDİN ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Bil Uzm. ZAHİDE ESRA DURAK

Tez Danışmanı
Prof. Dr. MUSTAFA KAVUTÇU

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
01/2010-129 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Kasım 2012

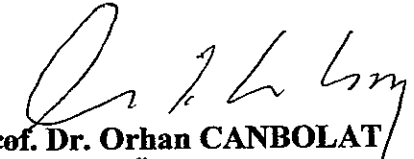
**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Biyokimya (Tıp) Ana Bilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi : 30/11/2012


Prof. Dr. Aysel ARICIOGLU
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Cemal ÇEVİK
Gazi Üniversitesi


Prof. Dr. Orhan CANBOLAT
Gazi Üniversitesi


Prof. Dr. H. Serdar ÖZTÜRK
Ankara Üniversitesi


Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU
Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Şekiller Dizini

Tablolar Dizini

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. 2-4 Dinitrozodietilamin.....	4
2.1.1. Nitrozamin Örnekleri.....	6
2.1.2. Kimyasal Yapısı.....	7
2.1.3. Kanserojen Özellikleri.....	7
2.2. Ellajik Asit.....	9
2.3. Kanser Metabolizması.....	10
2.3.1. Serbest Radikaller.....	10
2.3.1.1. Reaktif Oksijen Türleri.....	12
2.3.1.2. Serbest radikallerin kaynakları.....	16
a. Endojen kaynaklar.....	16
b. Eksojen kaynaklar.....	17
2.3.1.3. Serbest radikallerin etkileri.....	17
a. Lipidlere Etkileri.....	17
b. Proteinlere Etkileri.....	18
c. Nükleik asitler ve DNA'ya etkileri.....	19
d. Karbonhidratlara Etkileri.....	19
2.3.2. Oksidan Sistemler.....	20
2.3.3. Antioksidan Savunma Sistemi.....	21
2.3.3.1. Antioksidan Enzimler.....	22
2.3.3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	22
2.3.3.1.2. Katalaz (CAT).....	24
2.3.3.1.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px).....	26
2.3.3.1.4. Glutatyon Redüktaz (GSR).....	27
2.3.3.1.5. Glutatyon S-transferaz (GST).....	27

2.3.3.2. Enzim Olmayan Antioksidanlar.....	28
2.3.3.2.1. C vitamini.....	28
2.3.3.2.2. E vitamini.....	28
2.3.3.2.3. Glutasyon.....	29
2.3.3.2.4. Flavanoidler.....	30
2.3.3.2.5. Karotenoidler.....	31
2.3.3.2.6. Melatonin.....	31
2.3.3.2.7. Ürik Asit.....	31
2.3.3.2.8. Ubikinon.....	31
2.3.3.2.9. Selenyum.....	32
2.3.3.2.10. Transferrin.....	32
2.3.3.2.11. Seruloplazmin.....	32
2.3.3.2.12. Albumin.....	32
2.3.4. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türlerinin Etkileri.....	33
2.4. Malondialdehid (MDA).....	35
2.4.1. Kimyasal Yapı ve Özellikleri.....	35
2.5. Ksantin Oksidaz (XO).....	37
2.6. Adenozin Deaminaz.....	39
2.6.1. Kimyasal Yapısı Ve Özellikleri.....	40
2.6.1.1. Adenozin Deaminazın görev aldığı reaksiyonlar....	40
2.6.1.2. Adenozin Deaminazın katalizlediği tepkimeler....	41
2.7. Nitrik Oksit (NO).....	42
2.7.1. Nitrik Oksit Senteziyle Serbest Radikal üretimi.....	45
2.8. Nitrik Oksit Sentaz (NOS).....	47
2.7. Kalp.....	49
2.7.1. Kalbin Odacıkları.....	50
2.7.2. Kalbin Kapakları.....	51
a. Atrioventriküler Kapaklar.....	51
b. Semilunar Kapaklar.....	52
2.7.3. Kalbin Damarları.....	52
2.7.4. Kalbin Tabakaları.....	53
a. Dış Tabaka.....	53
b. Orta Tabaka.....	53
c. İç Tabaka.....	53

2.7.5. Kalbin Çalışma Sistemi.....	54
2.7.6. Kalbin Uyarı ve İleti Sistemi.....	55
3.GEREÇ ve YÖNTEM.....	58
3.1. Deney Hayvanları.....	58
3.2. Gereçler	60
3.2.1. Cihazlar.....	60
3.2.2. Kimyasal Maddeler.....	60
3.3. Lowry Yöntemi (Protein Miktarı Tayini).....	61
3.4. Oksidan ve Antioksidan Parametrelerin Ölçüm Metodları.....	63
3.4.1. Malondialdehit (MDA) Miktarı Ölçüm Metodu.....	63
3.4.2. Ksantin Oksidaz (XO) Aktivitesi Ölçüm Metodu.....	65
3.4.3. Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçüm Metodu.....	67
3.4.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçüm Metodu.....	68
3.4.5. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi Ölçüm Metodu.....	71
3.4.6. Adenozin Deaminaz (ADA) Aktivitesi Ölçüm Metodu.....	73
3.4.7. Nitrik Oksit (NO) Düzeyi Ölçüm Metodu.....	76
3.4.8. Nitrik Oksit Sentaz Enzim Aktivitesi Ölçüm Metodu.....	78
3.7. İstatistiksel Analiz.....	80
4. BULGULAR	81
5.TARTIŞMA.....	83
6. SONUÇ.....	88
7. ÖZET.....	90
8. SUMMARY.....	93
9. KAYNAKLAR.....	96
10. EKLER.....	107
11. ÖZGEÇMİŞ.....	108

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 : Nitrozamin'in Genel ve NDEA'nın Kimyasal Yapısı.....	7
Şekil 2.2 : N-nitrozo bileşiklerinin metabolizması.....	8
Şekil 2.3 : Ellagic asitin kimyasal yapısı	10
Şekil 2.4 : Süperoksit dismutaz ve nitrojen monoksitin süperoksit için yarışması	24
Şekil 2.5 : Glutasyon'un kimyasal yapısı.....	29
Şekil 2.6 : Malonaldehit'in kimyasal yapısı.....	36
Şekil 2.7 : Ksantin Oksidaz enziminin substrat ve ürünleri.....	37
Şekil 2.8: Nitrik oksit oluşumundaki kimyasal reaksiyon.....	49
Şekil 3.1 : TBA – MDA Kompleksi Oluşumu.....	63

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1: Protein standart grafiği.....	62
Grafik 2: MDA standart grafiği.....	65
Grafik 3: ADA enziminin gruplar üzerine etkisi.....	81
Grafik 4: XO enziminin gruplar üzerine etkisi.....	81
Grafik 5: GSH-Px enziminin gruplar üzerine etkisi.....	82
Grafik 6: SOD enziminin gruplar üzerine etkisi.....	82
Grafik 7: CAT enziminin gruplar üzerine etkisi.....	83
Grafik 8: NOS enziminin gruplar üzerine etkisi.....	83
Grafik 9: Nitrik Oksitin gruplar üzerine etkisi.....	84
Grafik 10: Malondialdehitin gruplar üzerine etkisi.....	84
Grafik 11: Çalışma grupları üzerine etkiler.....	85

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1 : Protein ölçümü metoduna ait protokol.....**62**

Tablo 3.2: MDA ölçümü metoduna ait protokol.....**64**

Tablo 3.3: XO aktivitesi ölçümü metoduna ait protokol.....**66**

Tablo 3.4: SOD aktivitesi ölçümü metoduna ait protokol.....**70**

Tablo 3.5: GSH-Px aktivitesi ölçümü metoduna ait protokol.....**72**

Tablo 3.6: NO ölçümü metoduna ait protokol.....**77**

Tablo 3.7: NOS aktivitesi ölçümü metoduna ait protokol.....**78**

Tablo 4.1 : Rat Kalp dokuları enzim aktivitelerine ait ortalama $\pm$ standart sapma ($X \pm SD$) değerleri ve anlamlılık (p) testi.....**82**

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ANOVA : Tek yönlü varyans analizi

ATP : Adenozin trifosfat

C : Konsantrasyon

dk : Dakika

DNA : Deoksiribonükleik asit

EDTA : Etilendiamintetraasetik asit

EA : Ellagic asit

FAD : Flavın adenin dinükleotid

Fe : Demir

g : Gram

G-SH : Glutasyon (redükte)

GSH-Px : Glutasyon peroksidaz

GS-SG : Glutasyon (okside)

GST : Glutasyon S-transferaz

HCl : Hidroklorik asit

H₂O₂ : Hidrojen peroksit

IU : İnternasyonal Ünite

IP : İntraperitoneal

CAT : Katalaz

XO : Ksantin oksidaz

L : Litre

LOOH : Lipit hidroperoksit

M : Molarite

MDA: Malondialdehit

mIU : Miliinternasyonal ünite

mL : Mililitre

NAD : Nikotinamid adenin dinükleotid

NADPH : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (redükte)

NDEA : Nitrozodietilamin

NO : Nitrik oksit

NO[•] : Nitrik oksit radikali
NO₂ : Azot dioksit
NOS : Nitrik oksit sentaz
¹O₂ : Singlet oksijen
O₂^{•-} : Süperoksit anyon radikali
OH[•] : Hidroksil radikali
ONOO⁻ : Peroksinitrit anyonu
ROS : Reaktif Oksijen Türleri
RO[•] : Alkoksil radikal
ROO[•] : Proksit radikal
SD : Standart sapma
OD: Optik Dansite
SF : Serum fizyolojik
Se : Selenyum
-SH : Sülfidril
SOD : Süperoksit dismutaz
St : Standart
TBA : Tiyoarbiturik asit
TCA : Trikloroasetik asit
TEP : Tetraetoksipropan
U : Ünite
v/v : Hacim/hacim
w/v : Ağırlık/hacim

1. GİRİŞ

Günümüzde kanser oluşumunu tetikleyen bir çok faktör bilinmektedir. Bu faktörlerden biri de serbest radikaller (SR) olarak kabul görmektedir. Serbest radikaller, lipidler, karbohidratlar ve benzeri makromoleküllere etki ederek ya kendi radikalik ara ürünlerini ya da oksijen ve/veya azot orjinli radikal yapıları ara ürünler oluşturmaktadır. Buna benzer şekilde radikallerin DNA'nın yapısında da hasar oluşturmak suretiyle kanser gelişiminin başlangıç, ilerleme/metastaz evrelerinde etkili olabildiği yönünde değişik yayınlar vardır. Reaktif oksijen türleri de (ROS) bir serbest radikal türüdür. Reaktif oksijen türleri (ROS); insan vücudunda normal aerobik metabolizma sonucu ortaya çıkan ürünlerdir.¹ Reaktif oksijen türleri üretimi, çeşitli antioksidanlar tarafından zararlı etkilerini önlemek amacıyla etkili biçimde bloke edilmektedir.¹

Reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi veya antioksidan sistemin etkisinin azalması oksidan/antioksidan dengesini bozmaktadır. Böylece oksidatif stresin sürmesiyle, vücuttaki hayati önem taşıyan makromoleküler yapılar (lipid, protein, DNA gibi) okside olmakta ve hücre hasarı ortaya çıkmaktadır.²

İnsan ve hayvan gıdalarında karşılaşılan nitrat, nitrit ve N-nitrozo bileşikleri sağlık bakımından ciddi riskler oluşturmaktadır. Nitrozaminler özellikle N-nitrozodietilaminler (N-NDEA) çevresel ortamlarda yaygın olarak bulunabilmekte ve güneş ışığında kolayca yıkılmaktadırlar. Çevre ortamındaki N-nitrozo bileşikleri ile nitrat ve nitrit gibi bunların ön maddeleri vücuda alındıktan sonra kanser oluşumu için risk faktörlerini oluştururlar. Nitrozaminlerin oluşturduğu etkin oksijen gruplarının artmasıyla karakterize oksidatif stresin sonucu, lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehit (MDA) düzeylerinde artma ve katalaz (CAT) düzeyleriyle süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon (GSH) antioksidan enzim aktivitelerinde değişiklikler ortaya çıkar.³

Reaktif oksijen türlerinin hücredeki bu etkileri nedeniyle, ateroskleroz, yaşlanma, kanser, Diabetes Mellitus gibi birçok kronik hastalığın ortaya çıkabileceği düşünülmektedir.⁴ Bu nedenle dışarıdan alınan maddelerin oksidan/antioksidan sistem üzerindeki etkileri insan sağlığı açısından oldukça önem taşımaktadır.

Vücudumuzdaki tüm hücrelerde, radikallere karşı, CAT, SOD, GSH vb. enzimlerden oluşan radikal süpürücü enzim sistemi dediğimiz bir savunma mekanizması vardır.⁵

Ellajik asit, güçlü bir antikanserojen, antimutajenik etkiye sahip bir fenolik asit olup, antibakteriyel ve antiviral etkisinin de olduğu tesbit edilmiştir. Ellajik asitin, DNA'da oksidatif zararların büyük bir kısmını engelleyerek kanser gelişmesini büyük ölçüde durdurduğu yönündeki bilgiler artmaktadır.⁶

Bu amaçla, normal beslenen ve belirli zamanlarda N-nitrozodietilamin (NDEA) ve ellagic asit verilen ratlardan alınan kalp dokularında; glutatyon peroksidaz (GSH), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), ksantin oksidaz (XO) ve adenozin deaminaz (ADA) enzim aktiviteleri ile malondialdehid (MDA) düzeyleri çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. 2-4 Dinitrozodietilamin

Nitrozaminler doğada çok çeşitli ve yaygın olarak bulunan kanserojenik bileşiklerdir. Bazı kozmetik, tarım ilaçları üretiminde ve en çok kauçuk ürünlerde kullanılır. Bu bileşiklerin kanserojenik ve sitotoksik formlara dönüşebilmesi için metabolik aktivasyona uğramaları gerekmektedir. Sularda ve sebzelerde yüksek miktarda nitrat bulunması birçok ülke için ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Vücuda dışardan alınan veya vücutta oluşan nitrit, ikincil ve üçüncül aminlerle tepkimeye girerek nitrozaminleri oluşturur.^{7,8} Nitrozamin oluşumu için gerekli ikincil aminlerin balık ürünleri, tahıl, çay, sigara ve sigara dumanında ve birçok ilaç yapısında bulunduğu bildirilmiştir.⁹ Nitrozaminlerin oluşumunda etkili olan nitritlerin kimyasal maddeler, zirai ilaçlar, su ve bitkilerde büyük oranda bulunduğu bilinmektedir. Ayrıca doğada yaygın olarak bulunan nitratın bakteriler tarafından nitrite indirgenmesiyle de oluşmaktadır. Son yıllarda yoğun kimyasal gübre kullanımından dolayı çevrede nitrat düzeyinde artış gözlenmiştir.¹⁰ Nitratlı gübrelerin ve lağım sularının sulama amacıyla yeniden kullanılması, kök ve yapraklı bitkilerde nitrat biriminin artmasına neden olmuştur. Nitrit ve nitrat bileşikleri insanların tüketmekte olduğu et, balık, peynir ve sucuk gibi gıdalarda koruyucu olarak kullanılmaktadır.¹¹

Nitrozaminlerin protein ve nükleik asitlere bağlanarak kanserojenik etki gösterdikleri bilinmektedir. Mide, özafagus, nazofarenks, mesane ve karaciğer kanserleriyle, nitrat-nitrit ile nitrozaminlerin eksojen alımı ve endojen nitrozamin oluşumu arasında kuvvetli bir ilişki bulunmuştur. Nitrozaminler ve özellikle N-Nitrozodietilamin (N-NDEA) çevresel ortamlarda yaygın olarak bulunabilmekte ve güneş ışığı altında kolayca yıkımlanmaktadır. Fakat çevre ortamında bulunan N-nitrozo bileşikleri ile nitrat ve nitrit gibi bunların ön maddeleri vücuda alındıktan sonra kanser oluşumları için potansiyel risk faktörlerini oluşturmaktadır. Araştırmalar gıdalar ile içme suyu içindeki nitrat ve nitritin de nitrozaminlerin oluşumuna yol açarak kanser oluşturabileceğini göstermektedir.^{9,12,13}

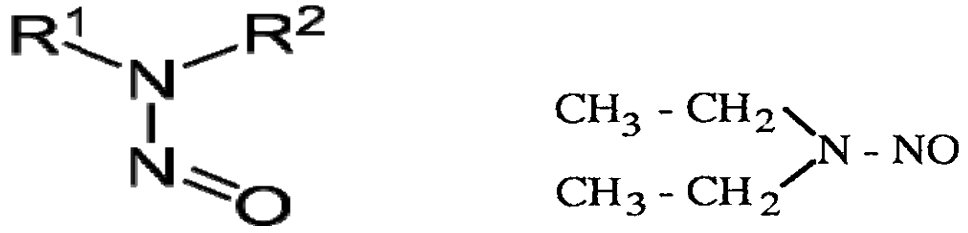
2.1.1. Nitrozamin Örnekleri

Tablo 1: Nitrozamin örnekleri ¹⁴

İsmi	CAS #	Sinonimleri	Moleküler Formül	Fiziksel Görünüm	Kanserojen Kategori
N-Nitrosornicotine	16543-55-8	NNN	C ₉ H ₁₁ N ₃ O	Yağlı Sarı Sıvı	
N-Nitrosodimetilamine	62-75-9	Dimethylnitrosamine, N,N-Dimetilnitrosamine, NDMA, DMN	C ₂ H ₆ N ₂ O	Sarı Sıvı	EPA-B2; IARC-2A; OSHA Carcinogen; TLV-A3
N-Nitrosodietilamine	55-18-5	dietilnitrosamid, dietilnitrosami, N,Ndietilnitrosamin, N-etil-N-nitrosoetanamin, dietilnitrosamin, DANA, DENA, DEN, NDEA	C ₄ H ₁₀ N ₂ O	Sarı Sıvı	EPA-B2; IARC-2A
N-Nitrosoanatabine	71267-22-6				IARC-3
N-Nitrosoanabasine	37620-20-5	NAB			IARC-3
4(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone	64091-91-4	NNK, 4'-(nitrosomethylamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone	C ₁₀ H ₁₃ N ₃ O ₂		

2.1.2. Kimyasal Yapısı

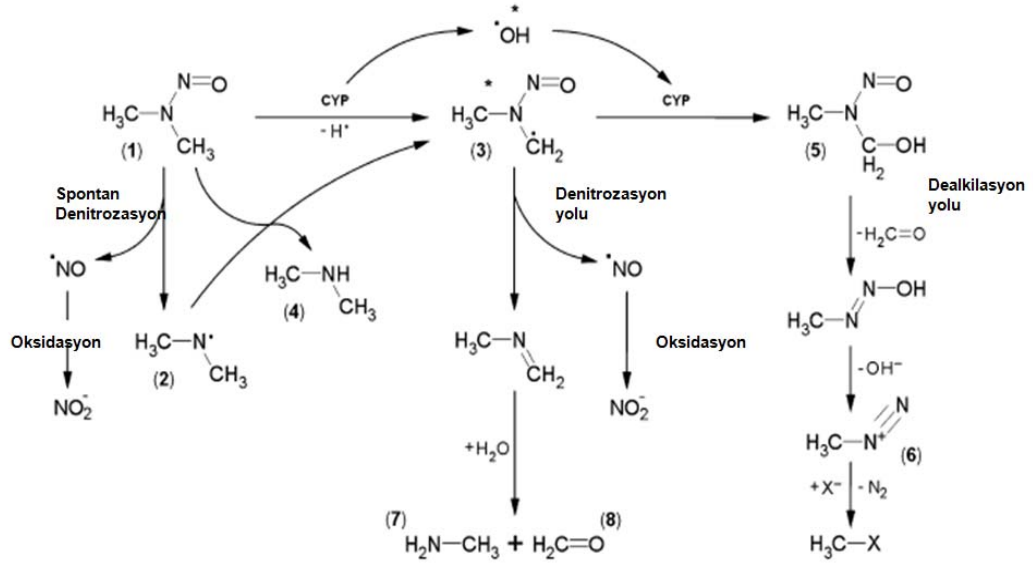
Nitrozaminlerin genel yapısı ve NDEA'nın kimyasal yapısı aşağıdaki şekildedir.



Şekil 2.1. Nitrozamin'in genel yapısı (sol) ve NDEA'nın Kimyasal Yapısı

2.1.3. Kanserojen Özellikleri

1956 yılında, iki İngiliz bilim adamı John Barnes ve Peter Magee, dimetilnitrozaminin ratlarda karaciğer tümörlerine yol açtığını bildirmiştir. Araştırmalar sonucu nitrozaminlerin %90 ının kanserojen olduğu ortaya çıkmıştır.



Şekil 2.2. N-Nitrozo Bileşiklerinin Metabolizması

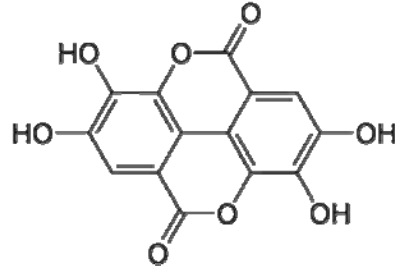
Nitrozaminlerin metabolizması öncelikle karaciğerde gerçekleşir. Ancak, başta N-NDEA olmak üzere nitrozaminler toksik etkilerini öncelikle kanda, özellikle de karaciğerde oluştururlar. Ayrıca kan akımının fazla olduğu böbrekler gibi diğer organlar bu durumdan karaciğere göre daha düşük düzeyde etkilenirler. Çeşitli araştırmalarda deney hayvanlarına farklı nitrozaminler verildiğinde başta karaciğer olmak üzere diğer organ ve doku tümörlerine neden olduğu gösterilmiştir.^{15,16}

2.2. Ellajik Asit

Ellajik asit bitkilerdeki fenol yapısında doğal olarak bulunur. Anti-mutajenik, anti-kanserojenik aktivitesi olan bir maddedir. Ellajik asit, ellagitaninlerin bazı kimyasal işlemler geçirmesi sonucunda oluşur. Ellajik asitin kullanılabilmesi için uygun bir yapıda bulunması gereklidir. Bu form, şeker molekülleri ile birleşmesi sonucunda oluşmaktadır.¹⁷ Özellikle kırmızı ve siyah ahududularda bulunan ellajik asit, vücutta kansere yol açan kimyasalları inaktif duruma getirir. Ayrıca yaşlanmayı geciktirici etkisi de vardır. Yapılan çalışmalarda özellikle kırmızı ahududulardan elde edilen ellajik asitin, bazı kanser tipinde, kanserli hücrelerin gelişmesini engellediği tespit edilmiştir.¹⁸

Ellajik asit, aflatoksin B1 ve N-metil N-nitrozoüre'nin mutajenliğini azaltmıştır. Ellajik asitin bir potansiyel çevresel kanserojen olan N-NDEA farelerde oluşturduğu akciğer tümör oluşumuna inhibitör etkisi bulunmuştur.

Çalışmalara göre, ellajik asit, serumda kansere neden olan kimyasalların temizlenmesini sağlar. Kanser hücrelerini temizler, hücresel DNA'da kanserojenlerin bağlanmasını engeller, yüksek oranda yıkıcı serbest oksijen radikallerini temizler veya bağlar. Böylece bir antioksidan görevini yapar. Yıkıcı kanser hücrelerine karşı immun sistemini uyarır.¹⁹



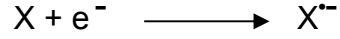
Şekil 2.3. Ellajik Asit Kimyasal Yapısı

2.3. Kanser Metabolizması

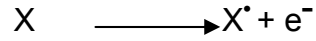
2.3.1. Serbest Radikaller

Atomlar, çekirdek çevresinde bulunan belli yörüngelerde dönen elektronlardan oluşmaktadır. Bu yapıların dış orbitallerinde elektron çiftleri bulunur. Bu elektronlardan her biri zıt yörüngeye sahiptir. Bu durum atomu veya molekülü stabil hale getirir. Serbest radikal denildiğinde, son yörüngelerinde eşlenmemiş elektron içeren ve bu nedenle de reaksiyon verebilen atomlar veya moleküller anlaşılır. Serbest radikal, dış orbitaldeki elektronu eşleştirerek daha kararlı bir yapı haline gelmek için diğer moleküllerle kolayca reaksiyona girebilir. Organizmada serbest radikallerin açığa çıkması üç yolla olmaktadır.

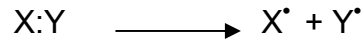
1.Bir atom veya moleküle tek elektron eklenmesi yoluyla radikal oluşumu:



2.Bir atom veya molekülün elektron kaybetmesi yoluyla radikal oluşumu:



3.Bir molekülün yapısındaki kovalent bağın homolitik yarılmaması yoluyla radikal oluşumu:



Bu üç yolla oluşan moleküllerin yörüngelerindeki elektron sayısı, merkezdeki proton sayısına eşit değildir. Bu nedenle, oldukça aktif hale geçen bu ajanlar, negatif, pozitif yük dengesini kurabilmek için, başka yapılardan elektron almaya veya son yörüngelerindeki eşlenmemiş elektronlarını vermeye çalışırlar.⁴

Bu durum kontrollü ve sınırlı olduğu zaman biyolojik anlamda fayda sağlarken, kontrol dışı, aşırı olmuş reaktifler, organizmanın makromoleküler yapılarını etkileyebilir. Bu durumda insan vücudunda telafisi imkansız olan zararlı sonuçlar ortaya çıkabilir.

2.3.1.1. Reaktif Oksijen Türleri

Reaktif oksijen türleri, oksijenin e lenmemi  elektron taşıması veya elektron düzeninin de i mesiyle oluşurlar. Reaktif oksijen türlerine  rnekler:

Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$)

Hidroksil radikali ($OH^\bullet$)

Nitrik oksit ($NO^\bullet$)

Hidrojen peroksit (H_2O_2)

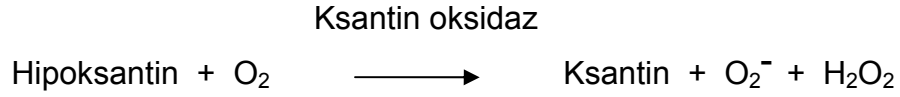
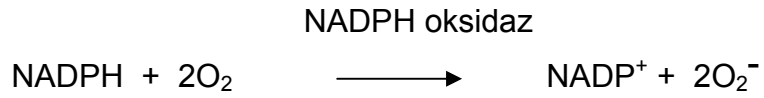
Lipit hidroperoksit (LOOH)

Azot dioksit (NO_2)

Singlet oksijen (1O_2)

Reaktif oksijen türleri, endojen ve ekzojen kaynaklar aracılığıyla olu abilirler. Mitokondri, peroksizom, inflamatuvar hücre aktivasyonu, sitokrom P450 metabolizması endojen kaynaklara örnek olarak verilebilir.²⁰ Ekzojen kaynaklar arasında ise, tütün ve alkol, bazı antibiyotikler, kimyasallar, radyasyon ve pestisitler sayılabilir.

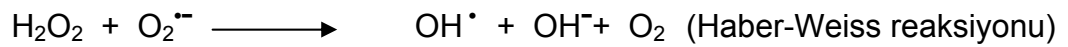
Oksidazlar olarak adlandırılan ve yapısında oksijen içeren tepkimeleri katalizleyen enzimler tarafından reaktif oksijen türü üretimi olabilmektedir.



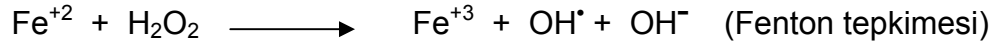
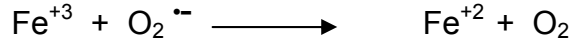
Enzimatik olmayan kaynaklardan da oldukça reaktif oksijen türleri oluşabilmektedir.



Oldukça reaktif bir radikal olan hidroksil radikali ($\text{OH}^\bullet$) Haber-Weiss tepkimesi ile oluşur.²¹



Metallerin varlığında ise, hidroksil radikali oluşumu fenton tepkimesi aracılığıyla gerçekleşir.²¹

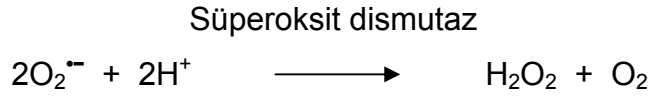


Hidrojen peroksit (H_2O_2) ile reaksiyona girerek fenton tepkimesine neden olan başlıca metaller; demir, bakır, kobalttır.

Bir diğer reaktif oksijen türü kaynağı ise elektron taşıma zinciridir. Mitokondride gerçekleşen bu döngüde, normal koşullarda oksijen suya indirgenirken, zincirde yer alan NAD, FAD gibi yapılar oksijen ile reaksiyona girip süperoksit anyon radikali ($\text{O}_2^{\bullet -}$) açığa çıkmasına neden olabilmektedir. Normal şartlarda oluşmayan bu durum, bir nedenle mitokondri yapısının bozulduğu ve antioksidan savunma sisteminin yetersiz kaldığı durumlarda ortaya çıkmakta ve organizmaya zarar verebilmektedir.⁴

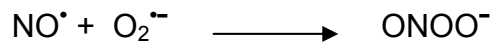
Mitokondri yanında, aktive makrofajlarda da, hidrojen peroksit (H_2O_2), nitrik oksit ($\text{NO}^{\bullet}$) gibi reaktif oksijen türleri üretimi olmaktadır.²²

Endojen reaktif oksijen türleri kaynakları arasında, mikrozom ve peroksizomlar da sayılabilir. Bunlar da önemli ölçüde hidrojen peroksit (H_2O_2) üretimine neden olmaktadır.²³



Biyolojik sistemlerde süperoksit dismutaz enzimi (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi hidrojen peroksiti ortadan kaldıran antioksidan etkili enzimlerle birlikte çalışmaktadır.²⁴

İmmün sistem hücreleri, süperoksit anyonu yanında, sinyal molekülü olarak görev yapan ve oldukça reaktif bir radikal olan nitrik oksit ($\text{NO}^\bullet$) üretimini de yapar. Bu yol, inflamatuvar sürece bağlı reaktif metabolit oluşturan endojen kaynaklardan biridir. Ortaya çıkan süperoksit anyonları ve nitrik oksit, genetik yapıyı da bozabilen daha aktif radikallere dönüşebilir. Peroksinitrit anyonu (ONOO^-) bunlardandır.²⁵



2.3.1.2. Serbest Radikallerin Kaynakları

Serbest radikallerin kaynakları 2 kısımda incelenir. ^{26,27,28}

a. Endojen Kaynaklar:

- 1- Organizma ve doku seviyesinde: Stres, egzersiz, kronik hastalıklar, enfeksiyon, gıdalarla alınan antioksidanların alınmasını önleyen durumlar
- 2- Hücresel seviyesinde: (normal metabolik durumlarda)
 - Mitokondriler: Hidrojen peroksit, hidroksil ve süperoksit radikali oluşur.
 - Sitokrom P450 enzim sistemi: Karaciğerde detoksifikasyon ve eliminasyonda görevli olan sistemin aktivasyonu sonucu oksidasyon yan ürünler de oluşur.
 - Makrofajlar ve nötrofiller: Sahip oldukları NADPH oksidaz kompleksi sayesinde, faal olduklarında süperoksit radikalleri ve hidrojen peroksit oluştururlar.
 - Peroksizomlar: Yağ asitlerinin yıkılmasından sorumlu olan peroksizomlarda yan ürün olarak hidrojen peroksit oluşur.

b. Eksojen Kaynaklar:

- 1- Çevresel: Ozon, iyonize radyasyon, hava kirliliği, ultraviyole ışınlar, sigara dumanı.
- 2- İlaçlar: Kanseri tedavisinde kullanılan ilaçlar, asetaminofen gibi ilaçlar.
- 3- Gıdasal: Yiyeceklerin uygun olmayan şartlarda hazırlanması ve depolanması, çoklu doymamış yağ asitlerinden zengin beslenme.

2.3.1.3. Serbest Radikallerin Etkileri

a. Lipidlere Etkileri

Serbest radikallerin, dokulardaki doymamış yağ asitlerine etkisi olan lipid peroksidasyonunun toksik olduğu tespit edilmiştir. Serbest radikal, lipid peroksidasyonu oluşturarak kaçış reaksiyonlarına neden olurlar. Bu zincirleme reaksiyon eğer engellenmezse hücre membranını harap eder. Toksik etki, lipid peroksitlerinin düzeyi ölçülerek belirlenir. Doymamış yağ asitlerindeki bir hidrojen atomunun çıkması, peroksidasyonun başlamasına yol açar böylece yağ asiti zinciri lipid radikali özelliğini kazanır. Radikal kararsızdır. Lipid peroksil radikalleri diğer doymamış yağ asitlerine etki ederek yeni radikaller meydana getirir, bir yandan da hidrojen atomları alarak hidroperoksitlere dönüşürler.

Lipid peroksidasyonu antioksidan tepkimelerle sonlandırılır ya da devam ederek daha ileriye gider. Oluşan lipid peroksitleri ve hidroperoksitleri, membran yapısına doğrudan, diğer hücre bileşenlerine ise aldehit üreterek dolaylı olarak zarar verir. Bu da pek çok hastalığın ve doku hasarının oluşmasına yol açar. Membran yapısının bozulması sonucu MDA açığa çıkar.²⁹

b. Proteinlere Etkileri

Proteinlerin oksidatif strese en duyarlı bölgeleri sülfidril gruplarıdır. Proteinler, radikallerin etkilerine lipitlere oranla daha az hassastır ve aminoasit dizilişlerine bağlı olarak etkilenirler. Özellikle doymamış yağ ve sülfür içeren moleküllerin ROS ile etkileşimleri son derece yüksektir. Buyüzden yapısında metionin, triptofan, fenil alanin, tirozin, histidin ve sistein gibi aminoasitler bulunduran proteinler, ROS'a karşı daha hassastır. Serbest radikaller, proteinlere zarar vererek yeni immünolojik yapılar meydana getirebilirler. Bu şekilde immünolojik disfonksiyon ya da inflamatuvar süreçlere sebep olurlar.³⁰

c. Nükleik asitler ve DNA'ya Etkileri

Radyasyon sonucu oluşan serbest radikaller , DNA'yı etkileyerek mutasyona yol açar ve hücre ölümüne neden olurlar. Serbest radikaller baz sekanslarında değişiklik yaparak, nükleik asit fonksiyonunu bozarlar. Geri dönüşsüz DNA hasarı oluşturur. Gen ekspresyonunda değişikliklere, replikatif kapasitenin düşmesine yol açarlar. Hidroksil radikali bazlarla kolayca tepkimeye girer. Hidrojen peroksit ise membranlardan kolayca geçip hücre çekirdeğindeki DNA'ya ulaşır. Hücre fonksiyonlarının bozulmasına hatta ölümüne neden olurlar. Bu yüzden DNA daha kolay zarar görebilen bir moleküldür.³¹

d. Karbonhidratlara Etkileri

Serbest radikaller karbonhidratların reseptör aktivitelerini direkt olarak inaktive ederler veya normal fonksiyonlarını inhibe ederler. Monosakkaritler okside olur. Bunun sonucu peroksit ve okzoaldehitler açığa çıkar. Okzoaldehitler, proteinlere bağlanabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler.³²

2.3.2. Oksidan Sistemler

Oksijen insan yaşamı için çok gerekli olmasına karşın, normal metabolizma sırasında üretilen bazı reaktif oksijen türleri vücuda yoğun bir zarar verme potansiyeline sahiptir. Reaktif oksijen türleri normal oksijen molekülüyle karşılaştırıldığında, kimyasal reaktivitesi daha yüksek olan oksijen formlarıdır. Serbest radikaller, dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla çift oluşturmamış elektron içeren yüksek enerjili, stabil olmayan bileşiklerdir. Bu çiftlenmemiş elektron serbest radikallere büyük bir reaktivlik kazandırarak protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermelerine neden olmaktadır. Bu zararın yaşanmayı teşvik ettiği ve ayrıca kalp-damar hastalıkları gibi birçok hastalığa sebep olmaktadır.³³ Canlı hücrelerdeki oksijen metabolizması, çevre kirleticileri, radyasyon, pestisitler, çeşitli tıbbi tedavi yolları ve kontamine sular gibi birçok etmen oksijen türevi serbest radikallerin oluşumuna yol açmaktadır. Bu radikallerin başlıcaları; tekli oksijen ($^1\text{O}_2$), süperoksit anyonu ($^-\text{O}_2$), hidroksil (^-OH), peroksi ($\text{ROO}^{\cdot}$) ve alkoksi ($\text{RO}^{\cdot}$) radikalleridir.³⁴

2.3.3. Antioksidan Savunma Sistemi

Antioksidanlar, organizmada oksidan ajanları inaktif hale getirerek, onların verebileceği hasarları önleyen maddelerdir. Antioksidan savunma sistemi üç farklı yolla radikal etkisini sonlandırabilir.

1-Oluşan radikallerin ortamdan uzaklaştırılması

2-Radikal oluşumunun engellenmesi

3-Oluşmuş radikallerin girdiği reaksiyonların sona erdirilmesi³⁵

Antioksidanlar çeşitli şekilde sınıflandırılabilirler.

1-Kaynaklarına göre: Endojen olanlar, Ekzojen olanlar

2-Yerleşimlerine göre: İntrasellüler yerleşimli olanlar, Ekstrasellüler yerleşimli olanlar

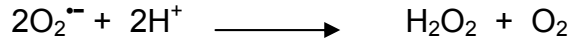
3-Çözünürlüklerine göre: Suda çözünenler, Yağda çözünenler

4-Yapılarına göre: Enzimler, Enzim olmayanlar

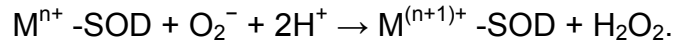
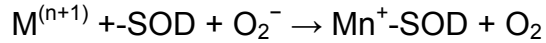
2.3.3.1. Antioksidan Enzimler

2.3.3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Oldukça etkili bir hücre içi antioksidan enzim olan süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit radikalinin, hidrojen peroksit ve oksijene dönüşümünü katalizler.



SOD, antioksidan savunma açısından oksijene maruz kalan tüm hücrelerde önemlidir. Süperoksitin SOD-katalizli dismutasyonu;



M = Cu (n=1) ; Mn (n=2) ; Fe (n=2) ; Ni (n=2).

Bu reaksiyonda, metal katyonun oksitlenme durumu n ve n+1 arasında gidip gelir.

Süperoksit anyon radikali (O_2^-), O_2 ve hidrojen peroksit'e dönüşür. SOD, süperoksitin hassas ve kritik hücrel hedeflerle reaksiyona girmesi için gereklidir. Örneğin NO radikaliyle reaksiyona girer ve toksik peroksinitriti oluşturur. Dismutasyon hızı ikinci derecedendir. Süperoksitin yarıömrü, yüksek konsantrasyonlarda çok kısa olmasına rağmen düşük konsantrasyonlarda oldukça uzundur. Buna karşılık süperoksitin SOD ile reaksiyonu birinci derecedendir. Ayrıca süperoksit dismutazı bilinen enzimler içerisinde en büyük katalitik verime sahiptir. Bu reaksiyon kendisi ve süperoksit arasındaki çarpışmanın frekansı ile sınırlıdır. Yani reaksiyon hızı, difüzyon sınırındır.^{36,37}

SOD farklı izoformlarda bulunabilir. İnsanda üç SOD izoformu bulunmaktadır.

Mitokondriyal SOD (Mn-SOD)

Ekstrasellüler SOD

Sitozolik SOD (Cu,Zn-SOD)

Demir içeren Fe-SOD ökaryotlarda bulunmamaktadır.³⁸

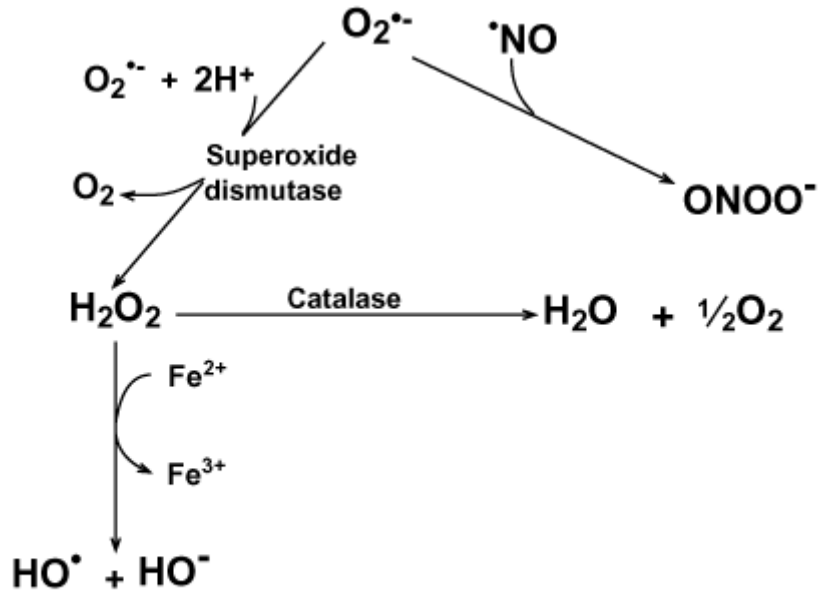


Figure 8. Superoxide dismutase and nitrogen monoxide compete for superoxide.

Şekil 2.4. Süperoksit dismutaz ve nitrojen monoksitin süperoksit için yarışması

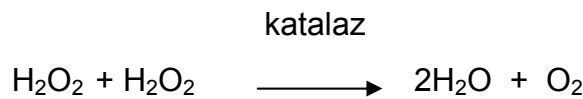
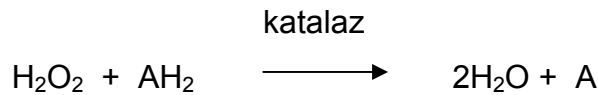
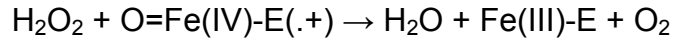
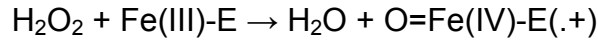
2.3.3.1.2. Katalaz (CAT)

Katalaz oksijene maruz kalan tüm canlı organizmalarda bulunan ortak bir enzimdir. Hidrojenperoksitin su ve oksijene parçalanmasını katalizler. Üretim reaksiyonlarında önemli bir enzimdir. Aynı zamanda katalaz, bütün enzimlerin içinde en yüksek turnover sayısına sahiptir; 1 katalaz molekülü milyonlarca hidrojen peroksit molekülünü su ve oksijene çevirebilir.

Yapısal olarak bir hemoproteindir. Peroksisomlarda lokalizedir. Karaciğer, böbrek, kemik iliği ve kanda büyük miktarlarda bulunmaktadır. Aktif kısmı, Fe+3-protoporfirin'dir. Hidrojen peroksitin, su ve moleküler oksijene dönüştürülmesinden sorumludur.

Katalaz herbiri 500 aminoasit uzunluğunda olan 4 polipeptid zincirinin tetrameridir. Hidrojen peroksitle reaksiyona geçmesine izin veren 4 demir grubu içerir. İnsan katalazı için yaklaşık optimum pH seviyesi 7 dir.

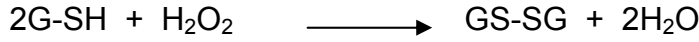
Reaksiyonun 2 aşamada gerçekleştiği düşünülmektedir:



Enzimler içinde oldukça yüksek bir aktiviteye sahiptir. Bir molekül katalaz, bir dakikada, altı milyon molekül hidrojen peroksiti dönüştürme potansiyeline sahiptir. Katalazın aktivite gösterebilmesi için demir gerekmektedir.

2.3.3.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz, glutasyonun indirgenmiş halini elektron vericisi olarak kullanarak, peroksitlerin detoksifikasyonunda önemlidir. Lipid peroksidasyonun başlamasını ve gelişmesini engeller. Bu enzimler aminoasitlerinin aktif merkezlerinde selenosistein içerip içermemesine göre ikiye ayrılırlar. Selenyum içeren tip peroksit detoksifikasyonunda önemli etkinliğe sahiptir. Selenyum içermeyen tip ise antioksidan etkinliği düşüktür. Sadece lipid peroksitlerini metabolize eder. H₂O₂ ve organik hidroperoksitleri indirgeme görevi sırasında glutasyonu elektron donörü olarak kullanır.³⁹

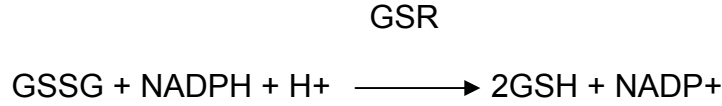


Hidrojen peroksitin redüklenmesi sırasında, glutasyon, yapısında bulunan sülfidril (SH) grupları sayesinde oksitlenir. Böylece glutasyon peroksidaz, hücre zarını ve diğer makromoleküler yapıları lipid peroksidasyonunun getireceği zararlı etkilerden korumuş olur.

Döngünün devam edebilmesi için, okside glutasyonun, yeniden redüklenmesi gerekmektedir. Bu redüklenme işleminde NADPH bağımlı bir enzim olan glutasyon redüktaz rol oynar. Bu nedenle glutasyon redüktaz da dolaylı olarak antioksidan sisteme destek vermektedir.³⁵

2.3.3.1.4. Glutasyon Redüktaz (GSR)

Glutasyon redüktaz, antioksidan savunmanın etkinliğini sürdürebilmesi için gerekli olan indirgenmiş glutasyon sentezinde rol alır. Glutasyon yolunu NADPH'ın reversibl oksidasyonu ve redüksiyonu üzerinden, heksoz monofosfat yoluna bağlar.⁴⁰



2.3.3.1.5. Glutasyon S-transferazlar (GST)

Glutasyon S-transferazlar, GSH ile elektrofilik gruplar taşıyan bileşikler arasındaki konjugasyonu katalizleyen, çok fonksiyonlu faz II biyotransformasyon multigen enzim ailesinin üyeleridir. Reaksiyon sonucu, bileşiğin hidrofilitesi artar ve molekülün lipid tabakası içerisindeki dağılımı ile hücre içi birikimi önlenmiş olur. GST, aktif merkezine hem GSH, hem de elektrofilik substratı bağlayarak, GSH ile substratın etkileşimini sağlar, glutasyonun sülfidril grubunu aktive eder. GSH'ın elektrofilik substrat üzerindeki nükleofilik atağını gerçekleştirir.⁴¹

2.3.3.2. Enzim Olmayan Antioksidanlar

2.3.3.2.1. C Vitamini

C vitamini, vücutta oldukça etkili bir antioksidandır. Sulu ortamlarda etkisini gösterir. Daha çok, bir antioksidan olan E vitamininin rejenerasyonuna yardımcıdır. Membranlarda ve lipoproteinlerdeki oluşmuş α -tokoferol radikallerinden tekrar α -tokoferol oluşumunu sağlar.⁴²

2.3.3.2.2. E Vitamini

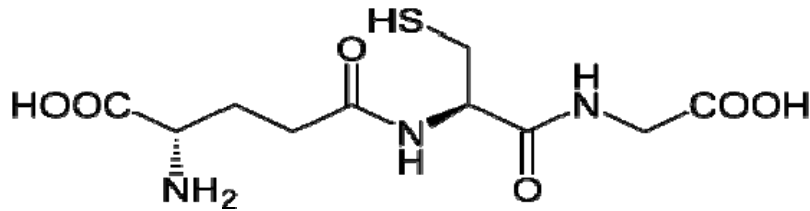
E vitamini, yağda çözünen vitaminlerdendir. Sekiz farklı formu olmakla birlikte, insanda en aktif olan form α -tokoferoldür. α -tokoferol, hücre zarındaki lipidleri koruyan en önemli antioksidandır.⁴³ α -tokoferoldeki güçlü antioksidan aktivitenin nedeni, 6. karbona bağlı olan OH grubudur. Böylece kendisi oksitlenen α -tokoferol, özellikle hücre zarı lipidlerinin oksitlenmesini önler.

2.3.3.2.3. Glutasyon

Glutasyon, tripeptid yapısında bir antioksidandır. Glutamik asit, glisin ve sistein içerir. Antioksidan özelliği, yapısında bulunan sülfidril (-SH) grubu nedeniyledir. Glutasyon, en çok sitozol, çekirdek ve mitokondride bulunur.⁴⁴

Glutasyon, serbest radikaller ve peroksitler gibi reaktif oksijen çeşitlerinin sebep olduğu hücresel hasarın önlenmesinde etkilidir.⁴⁵

Tiyol grupları, hayvan hücrelerinde 5 mM bir konsantrasyonda varolan indirgen ajanlardır. Glutasyon elektron vericisi olarak hizmet vererek disülfid bağ oluşumunu azaltır. Bu süreçte glutasyon onun okside formu olan glutasyon disülfite (GSSG) çevrilir. Buna L(-)-Glutasyon da denir.



Şekil 2.5. Glutasyon'un (GSH) Kimyasal Yapısı

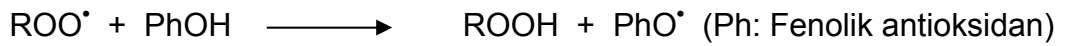
Glutasyon; glutasyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesinde rol alır. C vitamini ve E vitamini gibi antioksidanların, oksidan radikallerle yükseltgendikten sonra tekrar redükte forma dönmelerinde etkilidir. Ayrıca aminoasit taşınmasında fonksiyonu vardır.

Glutasyon hücreleri apopitozise karşı korur. Bunda, serbest radikallerin detoksifikasyonunu sağlayarak, oksidan/antioksidan sistem arasındaki dengede fonksiyon görmesi önemli rol oynar.

2.3.3.2.4. Flavonoidler

Flavonoidler, polifenolik bileşiklerin önemli bir grubunu oluştururlar. Polifenolik bileşikler, önemli bitki metabolitleridir. Flavonoid denildiğinde, bitkilerdeki renk pigmentlerini oluşturan, lipidlerde çözünen polifenoller anlaşılır.

Flavonoidlerin antioksidan özellikleri, yapılarındaki hidroksil grupları nedeniyledir. Bu özellikleri sayesinde, lipid peroksidasyonunu engelleyebilir ve serbest radikal reaksiyonlarını sonlandırabilirler.⁴⁶



Fenolik antioksidanlarla oluşan fenolik radikaller, diğerlerine göre oldukça kararlı olup, organizma için zararları yok denecek kadar azdır.

2.3.3.2.5. Karotenoidler

Doğada birçok canlıda bulunan pigmentlerdir. 600 çeşit karotenoid içinde en etkili olanı β -karotendir. A vitamininin ön maddesidir. Lipidlerde çözünen ve antioksidan etkisi olan bir maddedir. Singlet oksijeni bastırabilir. Süperoksit ve peroksil radikalleri ile direkt reaksiyona girerek, onların organizmaya zarar vermesini önler. Lipidlerde çözündüğü için, özellikle lipidleri oksidatif metabolitlere karşı koruyucu özelliği vardır.

2.3.3.2.6. Melatonin

Lipidlerde çözünen ve antioksidan etkisi olan bir maddedir. Antioksidan özelliğini, hidroksil radikalini temizleyerek gösterir.

2.3.3.2.7. Ürik Asit

Suda çözünen ve bu nedenle lipidlere etkisi olmayan bir antioksidandır. Demir ve bakırın oksidan etkisini önler. Askorbik asitin de oksidasyonunu engeller.

2.3.3.2.8. Ubikinon

Elektron taşıma zincirinde görev yapan ubikinon, iç mitokondri zarındaki fosfolipidlerin oksidasyonunu engeller. İnsanda bulunan en önemli formu, koenzim-Q olarak da bilinen ubikinon 10'dur. Lipidlerde çözünen ubikinon, E vitamininin rejenerasyonunda da rol almaktadır.^{35, 47}

2.3.3.2.9. Selenyum

Glutasyon peroksidaz ve tiyoredoksin redüktaz enzimlerinde görev alan selenyum, bu enzimlerin antioksidan özelliği olması nedeniyle, indirekt olarak oksidatif hasarı önlemektedir.⁴⁸

2.3.3.2.10. Transferrin

Oksidan bir madde olan demiri bağladığı için, onun oksidatif reaksiyonlara katılıp, radikal oluşturmalarının önüne geçmiş olur.³⁵

2.3.3.2.11. Seruloplazmin

Bakırın oksidatif reaksiyonlara katılmasını önler. Bunu, bakırı bağlayarak yapar.

2.3.3.2.12. Albümin

Yapısındaki sülfidril grubu aracılığıyla, bakır iyonlarını bağlayarak, bakırın oksidatif radikal oluşturmalarının önüne geçer. Böylece oksidatif hasarın önlenmesine yardımcı olur.

2.2.4. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türlerinin Etkileri

Redoks reaksiyonları denildiğinde, organizmadaki oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları anlaşılır. Normal şartlar altında, biyolojik sistemlerde, redoks reaksiyonları denge halindedir. Bunun için, prooksidanların ve antioksidanların vücutta yeterli miktarda bulunması, aynı zamanda yeterince aktivite gösterebiliyor olması gereklidir.

Reaktif oksijen türleri, biyolojik çevrelerde ortaya çıkan ve birçok fizyolojik olayda görev alan oksijen metabolitleridir. Normal şartlarda, fizyolojik olarak görev yapan bu reaktiflerin kontrolsüz artışı veya bunları sınırlandıracak antioksidan mekanizmaların işlevinin azalması durumunda organizma için zararlı olan sonuçlar doğuran oksidatif stres ortaya çıkar.⁴⁹

Organizmadaki birçok makromoleküler yapı, reaktif metabolitlerin vereceği hasara açıktır. Örneğin, hücre membranları çoklu doymamış yağ asitlerinden zengindir. Bu yağ asitleri radikal hasarına duyarlıdır. Yağ asitlerinin oksitlenmesi sonucunda membran yapısı bozulmakta ve hücre geçirgenliği artmaktadır.

Serbest radikallere duyarlı bir diğer makromolekül proteindir. Protein yapısındaki bazı aminoasitlerin oksidasyonu ile proteolizis olmaktadır. Bu durumdan yapısında protein bulunduran maddeler zarar görmektedir.

Yine reaktif oksijen türleri, DNA ile reaksiyona girerek yapısını bozmakta, böylece çeşitli mutasyonlar oluşmaktadır.

Oksidatif stresin, organizmadaki makromoleküler yapılara verdiği bu zararlar sonucunda, patolojik değişiklikler ortaya çıkmakta ve böylece kronik bazı hastalıklara zemin hazırlanmaktadır. Ortaya çıkabilecek hastalıklardan bazıları şunlardır: ⁴

-Ateroskleroz

-İnflamatuvar hastalıklar

-İskemik kalp hastalığı

-Bazı nörolojik hastalıklar (Parkinson Hastalığı, Alzheimer Hastalığı vb.)

-Kanser

-Diabetes mellitus

-Yaşlanma

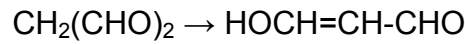
2.4. Malondialdehit (MDA)

Malondialdehit, kimyasal formülü $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$ olan organik bir bileşiktir. Bu reaktif türler kendiliğinden oluşur ve oksidatif stres için bir göstergedir.

MDA, lipid peroksidasyonunun son ürünü olduğu için, oksidasyonun göstergesi olarak sıkça kullanılan bir maddedir. Tiyobarbitürik asit (TBA) ile, MDA dışındaki maddeler de reaksiyona girebilir. Bu nedenle bu maddeler, TBARS olarak adlandırılır. TBARS, TBA ile reaksiyona giren maddeler anlamı taşır.⁵⁰

2.4.1. Kimyasal Yapı ve Özellikleri

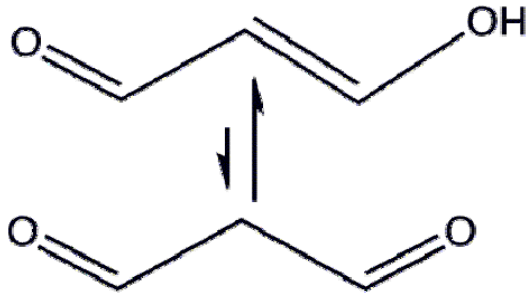
MDA esas olarak enol biçiminde bulunur.



Trans izomeri hakim olmasına rağmen, organik çözücüler olarak cis izomeri tercih edilir.

MDA genelde saf şekilde görülmeyen ve yüksek aktiviteye sahip bir bileşiktir.

MDA bir reaktif oksijen çeşididir (ROS). Reaktif oksijen çeşitleri, poliansature yağları indirger ve malondialdehit oluşturur.

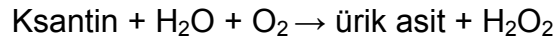
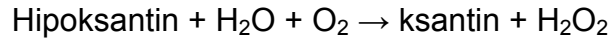


Şekil 2.6. Malondialdehit'in Kimyasal Yapısı

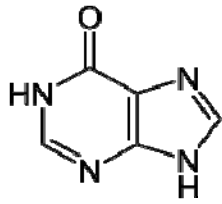
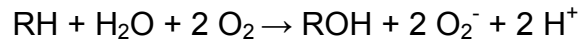
MDA, DNA'daki deoksiadenozin ve deoksiguanozinle reaksiyona girerek mutajenik olan DNA formlarını oluşturur. MDA potansiyel mutajeniktir ve yanmış Ayçiçek yağı ve palmiye yağlarında bulunabilir.

2.5. Ksantin Oksidaz (XO)

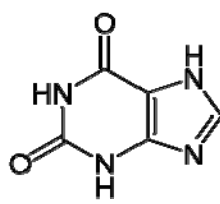
Reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu bir enzimdir. Hipoksantin ksentine oksidasyonunu katalizler. XO, insanlardaki bazı türlerdeki pürinlerin katabolizmasında önemli rol oynar.



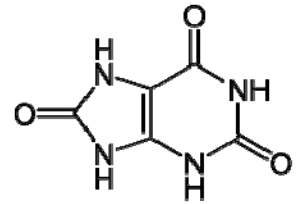
Bazı şartlarda süperoksit iyon oluşabilir.



Hipoksantin
(1 Oksijen Atomu)



Ksantin
(2 Oksijen)



Ürik Asit
(3 Oksijen)

Şekil 2.7. Ksantin oksidaz enziminin substrat ve ürünleri

Ksantin oksidaz serum ve akciğerlerde normalde bulunan süperoksit üretici enzimdir ve influenza A enfeksiyonu sırasında aktivitesi artar. Ciddi karaciğer hasarı süresince ksantin oksidaz kana geçer. Buyüzden ksantin oksidaz bakılan bir kan testi karaciğerde hasar olup olmadığını belirlemek için bir yoldur.⁵¹

Bunun yanısıra ksantin oksidaz ürik asit üretimi için bir metabolik yol olduğu için ksantin oksidaz inhibitörü allopurinol gut tedavisinde kullanılır.

Ksantinüri, ksantin oksidaz eksikliğinde kanda ksantin miktarının yüksek konsantrasyonda görülmesine yol açan nadir görülen bir genetik hastalıktır ve böbrek yetmezliği gibi sağlık sorunlarına neden olabilir. Spesifik bir tedavisi yoktur. Hastaların yüksek pürin içeren gıdalardan kaçınmaları ve yüksek miktarda sıvı almaları gerekmektedir.⁵²

Ksantin oksidaz inhibisyonu damar sağlığının iyileştirilmesi için bir mekanizma olarak öne sürülmüştür. Aynı zamanda ksantin oksidaz oksidatif göz hasarına neden olabilir.⁵³

Ksantin oksidaz inhibitörleri; allopurinol, oksipürinol ve fitik asittir.

2.6. Adenozin Deaminaz (ADA)

Adenozin deaminaz hidrolazlar sınıfında bulunan bir enzimdir olup, hidrolazlar C-O, C-N, C-C ve fosfo anhidrit bağıını da içeren diğer bazı bağların hidrolotik olarak yıkılmasını katalizleyen enzimlerdir.

Spesifik olarak adenozin ve bazı diğer nükleozit analoglarını substrat olarak kullanır. Hayvan dokularında yaygın olarak bulunur. Enyüksek aktivite çekumintestinal mukoza ve dalakta bulunur. Buna karşılık iskelet kasında, deride ve kemikte de çok az aktivite vardır. Enzim büyük ölçüde hücrenin stoplazmik fraksiyonunda bulunmasına karşılık, kısmen nükleusta da mevcuttur.⁵⁵

Substrat spesifikliğı, elde edildiğı kaynaklara göre değışiklik gösterir. Aynı şekilde farklı organ ve dokulardan elde edilen enzim farklı optimal pH, elektroforotik mobilite ve substrat spesifikliğı gösterir. Buna karşılık aynı organizmanın farklı dokularında aynı enzim mevcuttur.⁵⁶ Serumdaki ADA aktivitesi malin tümörlerde viral hepatitte ve sirozda enzim aktivitesinin arttığı görölmüştür. Özellikle günümüzde serum ADA aktivitesi, akciğer kanseriyle akciğer tüberkülozunun ayırıcı teşhisinde de kullanılmaktadır.^{57,58}

Akciğer kanserinde serumdaki ADA aktivitesi anlamlı derecede değışiklik göstermemesine rağmen, tüberkülozda anlamlı derecede yükselme görölmektedir.

2.6.1. Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Adenozin deaminaz, sekiz β zinciri ve periferde sekiz α heliks içeren paralel bir $\alpha\beta$ kompleksi içerir. Bu protein 1088 nükleotid tarafından şifrelendirilmektedir.

Protein zinciri başlangıçtaki metiyonin hariç 362 aminosit içerir. N- terminal uçtaki aminoasit alanin, C- terminal uçtaki aminoasit ise lösin'dir.⁵⁹

ADA'nın atomik absorpsiyon spektroskopisine göre her enzim molekülü başına 0.9 ± 0.1 Zn atomu bağlar. Aktif merkezdeki Zn iyonu, His15 , His17 ve His214 ' ün N atomlarına, Asp295 ' in O atomuna ve hidroksipurin ribonükleozid ' in (HDRP) O atomuna koordine bağlarla bağlanmıştır.⁶⁰

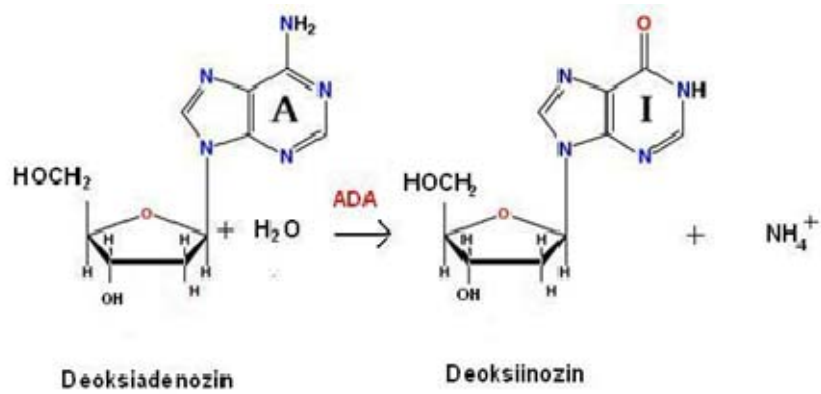
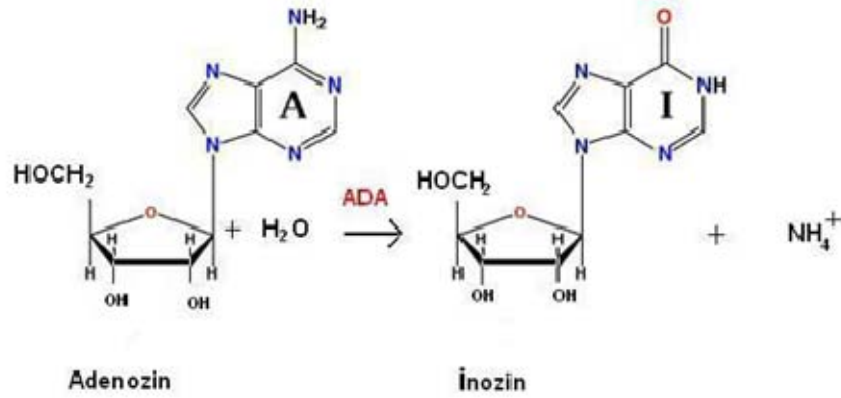
2.6.1.1. Adenozin Deaminazın görev aldığı reaksiyonlar:

ADA, adenozin ve 2'- deoksiadenozini sırası ile inozin ve 2'- deoksiinozine yıkım yolunu katalize etmektedir. Bu reaksiyon geriye dönüşümsüz olduğu için, bu enzim reaksiyonu adenozinin yıkılmasında kontrol basamağını oluşturur. Adenozin ve deoksiadenozin moleküllerinin yüksek konsantrasyonları hücre için toksik olduğundan bu nükleozidlerin hücre içi seviyelerinin düzenlenmesi açısından önemlidir.^{61,62}

ADA



2.6.1.2. Adenozin Deaminazın katalizlediği tepkimeler:

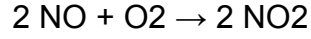


2.7. Nitrik Oksit (NO)

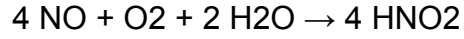
Nitrojen monoksit olarak da bilinir. Radikalik özelliğe sahip olan önemli bir bileşiktir. Nitrik oksit hücrel olaylarda çeşitli fonksiyonel görevler yapar. Bunun içindir ki, NO insanlar da dahil tüm memelilerde, birçok fizyolojik ve patolojik süreçte görev alan önemli bir hücrel sinyal molekülü olarak kabul edilir. Mesela, yarılanma ömrü birkaç saniye olan kuvvetli bir vazodilatördür. NO fizyolojik konsantrasyonlarda, hemen hemen tüm organ sistemlerinde değişik biyolojik etkilere sahiptir. Gastrointestinal sistem, solunum sistemi gibi sistemlerde ve kavernöz dokulardaki vasküler düz kasların gevşemesinde önemli bir mediyatördür. NO merkezi sinir sisteminde, hafızanın şekillenmesini de içeren çeşitli fonksiyonları bir nörotransmitter olarak destekler; Periferde ise gastrointestinal, solunum ve genitoüriner sistemle ilgili çeşitli fonksiyonları düzenler. İlave olarak NO'nun, konak savunması ve immunolojik reaksiyonlarda da fonksiyonu vardır. Miyokard fonksiyon bozukluğu, dolaşım yetmezliği ve farklı organ disfonksiyonu ile sonlanan durumlarda, artmış NO oluşumunun katkısı mevcuttur. Diğer taraftan artmış NO; vazodilatasyona, trombosit yapışmasının engellenmesi ile dokuların mikrosirkülasyonunda rahatlamaya ve sonuçta da dokuların oksijenlenmesi yönünde çok yararlı katkı sağlayabilmektedir.

NO;

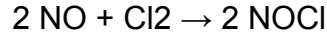
- Oksijene maruz kaldığında, nitrojen dioksite dönüşür.



- Oksijen ve suyla HNO₂ ve nitroz asit oluşturmak için reaksiyona girer.



- XNO kimyasalları oluşturmak üzere flor, klor ve bromla reaksiyona girer.



NO sinyal iletiminde görevli bilinen birkaç gazdan birisidir. Omurgalılarda anahtar role sahip bir sinyal molekülüdür ve birçok biyolojik süreçte rol oynamaktadır. Başlangıçta vasküler sistemde endotel kaynaklı gevşetici faktör (EKGf, EDRF) olarak tanımlanmıştır. NO ve diğer bir son ürün olan sitrüllin, argininden NO sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla sentezlenir.



Damarın içteki endotel tabakası NO sinyaliyle kendisini kuşatan damar düz kasını gevşetir bu da vazodilatasyon ve artmış kan akımı ile sonuçlanır. Yüksek rakımlı yerlerde yaşayan insanlarda hipoksi oluşumunu önlemek için NO sentezi artar. NO'nun vazodilatasyonun yanı sıra bir nörotransmitter olduğu ayrıca saç ve kıl oluşumunda rolü olduğu bilinmektedir.

Guanilat siklazin prostatik grubuna NO' in bağlanmasıyla vasküler düz kas hücresi gevşer ve buna bağlı fizyolojik süreç başlar. Endotel kaynaklı NO aynı zamanda cGMP bağımlı bir mekanizmayla trombositlerin adezyonunu, aktivasyonunu, sekresyon ve agregasyonlarını inhibe eder. NO bu etkilerini ayrıca trombosit içi kalsiyum artışını ve trombositlerdeki P-selektin ekspresyonunu inhibe ederek de gösterir. Kardiyovasküler sistemdeki bu etkilerine ilaveten, endotel kaynaklı NO endotelyuma lökosit adezyonunu, düz kas hücresi migrasyon ve proliferasyonunu da inhibe eder.⁶¹

NO salınımına yol açan nedenler:

Nörotransmitterler (Asetilkolin ve Noradrenalin)

Trombositlerden salınan maddeler (Serotonin, Adenozin di fosfat)

Koagülasyon sırasında oluşan maddeler (Trombin)

Damar duvarında oluşan otakoidler (Histamin, Bradikinin ve Endotelin)

2.7.1. Nitrik Oksit Senteziyle Serbest Radikal Üretimi

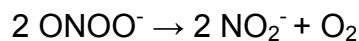
Oksijen molekülünün dış yörüngesinde eşlenmemiş bir elektron bulunması serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olur. Süperoksit, hidroksil peroksit, alkoksil ve hidroksiperoksil reaktif oksijen ürünleridir. Ayrıca NO ve NO₂ iki nitrojen serbest radikalidir. Bunlar hidrojen peroksit (H₂O₂), hipoklöröz asit ve peroksinitrit gibi radikal olmayan reaktif türlere çevrilebilir.

NO eşlenmemiş bir elektron içerir. Bu yüzden oksijen, süperoksit radikalleri, Fe (demir), Cu (bakır), kobalt, mangan gibi geçiş metalleriyle hızla reaksiyona girmektedir.

Nitrik oksit radikali, süperoksit anyon radikali (O₂⁻) ile reaksiyona girerek peroksinitriti (ONOO⁻) meydana getirir. Peroksinitrit serbest radikal değildir. Peroksinitritin protonlanmasıyla peroksinitröz asit (ONOOH) oluşur, bu bileşik OH⁻ gibi davranır ve güçlü bir oksidandır.



Peroksinitrit alkali çözeltilerde stabil olsa da, yavaşça nitrit ve oksijene bölünür.



pH 7'de peroksinitrit 1 saniyeden az bir sürede peroksinitröz asite (ONOOH) bozunur. Bu bileşik stabil değildir ve hızla nitrata izomerize olur.

NO'in koruyucu etkinliği ve toksisitesi arasındaki hassas denge hücre düzeyinde göreceli olarak NO'in indirgenmiş formlarının (nitrojen monoksit ve nitrozonyum iyonu) oluşumuyla düzenlenir. Çünkü bu moleküllerin toksisitesi de peroksinitrit oluşumuna bağlıdır.

Ayrıca yüksek NO düzeyleri kanser gelişimini yavaşlatır. Bazı araştırmacılar nitrik oksitin en önemli işlevlerinden birinin anormal hücre gelişimini sınırlayarak çeşitli kanserlerin oluşumunu önlemek olduğunu söylemişlerdir.

NO ayrıca insanda immun yanıtın bir bileşeni olarak makrofaj ve nötrofillerde de üretilmektedir. Bakteri ve insanda patojen olan diğer organizmalara karşı toksik etki göstermektedir. Ama günümüzde birçok bakteri No'ya karşı direnç mekanizmaları geliştirmiştir.

Bitkilerde, 4 ayrı yoldan biriyle sentezlenmektedir:

- (i) L-arjinin-bağımlı azot oksit sentaz
- (ii) Plazma membranına bağlı nitrat redüktaz
- (iii) Mitokondrial ETS ile
- (iv) Enzimatik olmayan tepkimelerle

Bitkilerde de bir sinyal molekülüdür, esas olarak oksidatif strese karşı görev yapar ve bitkilerin patojenlerden korunmasını sağlar.

NO, sinir sistemi, fizyoloji, immunoloji gibi alanlarda yapılan birçok araştırmanın temel molekülüdür. Ayrıca NO, 1992 yılında AASS (American Association for the Advancement of Science, Amerikan Bilim Gelişimi Kuruluşu) tarafından Yılın Molekülü seçilmiştir.

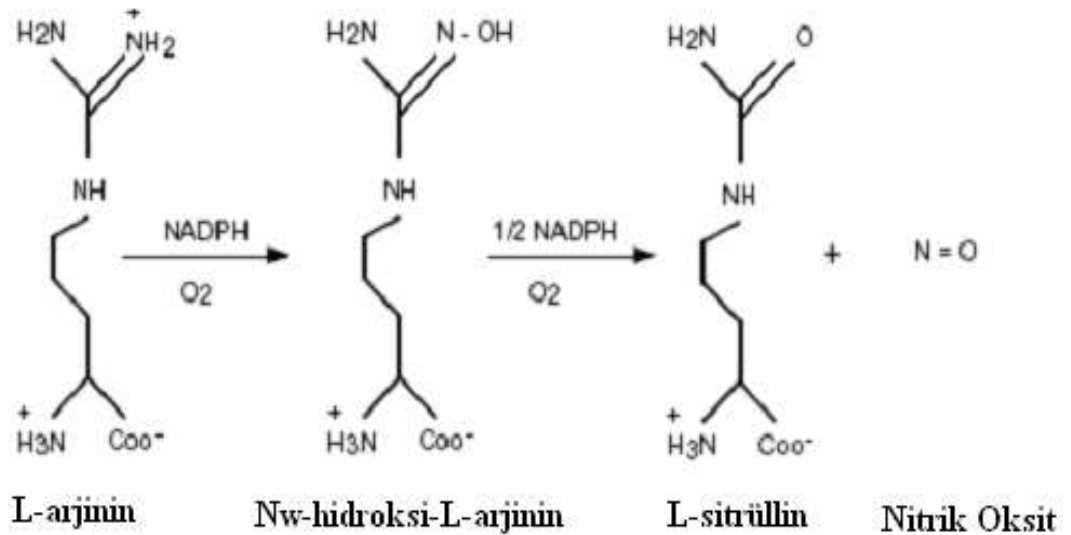
2.8. Nitrik Oksit Sentaz

Nitrik oksit sentaz (NOS)'in genetik olarak farklı üç izoformu tespit edilmiştir. Bunlar; düşük miktarda üretilerek vasküler olayları yönlendiren endotelial izoform (eNOS), sinaptik şekillenme ve nörotransmisyonu düzenleyen nöronal izoform (nNOS) ve yüksek miktarda üretilerek, immün/inflamatuar olaylarda rol alan ve hücre aracılı immün cevapta etkili bir komponent olan uyarılabilir form (iNOS)'dur. nNOS ve eNOS izoenzimleri NO üretimi için Ca^{++} / kalmodulin kompleksine bağımlıdır, buna karşın iNOS bundan bağımsızdır.

Hücre içi ve hücre dışı birçok molekül nitrik oksiti stabilize eder veya kimyasal olarak parçalar. NOS ın hücre içi yerleşiminin NO in etkileri ve kimyasal durumunu etkileyebileceği düşünölmüş ve bu konuda bir çok çalışma yapılmıştır . NO in hücre çekirdeğinde guanilat sentaz genini de içeren birçok genin transkripsiyonunu arttırdığı gösterilmesine rağmen NOS hücre çekirdeğinde saptanamamıştır. NOS ın mitokondiri, endoplazmik retikulum, golgi cisimciğinde bulunduğunu gösterilmiş fakat fonksiyonu tam olarak açıklanamamıştır. NOS ın hücre iskelet molekülleri ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir. eNOS endotelde sürekli olarak sentezlenir. Kültürde endotel hücresi ile yapılan deneylerde NOS sentezinin birçok faktör tarafından artırılıp, azaltıldığı gösterilmiştir. eNOS sentezini arttıran faktörler arasında lizofosfotidilkolin ve siklik GMP analogları sayılabilir.

Düzenli egzersiz yaptırılan köpeklerde eNOS düzeyi artmıştır. eNOS aktivitesini azaltan faktörler ise TNF-a, okside LDL ve hipoksidir. Bu durumlarda mRNA'nın posttranskripsiyonel ömrünün kısalması, eNOS sentezinin azalmasında önemli rol oynar. Ayrıca bir transmembran proteini olan kaveolin de eNOS'ı inhibe edebilir. Bu inhibisyon kalmodulin – Ca^{2+} kompleksi tarafından tamamen ortadan kaldırılır. Aterosklerotik plak üzerindeki endotel hücrelerinde eNOS sentezinin azalmadığı gösterilmiştir.

NOS, NO sentezinde substrat olarak L-arginin, kosubstrat olarak NADPH ve koenzim olarak da FAD, FMN, tetrahidrobiyopterin, indirgenmiş tiyol ve hem molekülünü kullanır. Bu kofaktörler elektron taşınmasında redoks grubu olarak görev alırlar. Sonuçta oksijen molekülünden bir oksijen atomu argininin terminal guanidin nitrojen grubuna aktarılır ve ortaya çıkan bileşikten L-sitrülin ve NO oluşur.



Şekil 2.8: Nitrik oksit oluşumundaki kimyasal reaksiyon

2.7. Kalp

Kalp, kalp kası olarak bilinen özel bir tip çizgili kastan oluşmuş, içi boş, kendiliğinden kasılma özelliğine sahip kuvvetli bir pompadır. Temel görevi kanı vücuda pompalamak olan kalp, metabolizma faaliyetleri sonucunda oluşan artık ürünlerin de vücuttan uzaklaştırılması, vücut ısısının düzenlenmesi, asit-baz dengesinin korunması, hormonlar ve enzimlerin vücutun gerekli bölgelerine taşınması gibi görevleri yapar.⁶³

Kalp, göğüs boşluğunda, 2 akciğer arasında, sternum'un arkasında, diyafram kası üzerinde ve 4. 5. ve 6. 'Costae'ların arka yüzünde, üçte ikisi orta çizginin solunda, üçte biri ise sağında yer almaktadır.⁶⁴

2.7.1. Kalbin odacıkları

Kalbin sağ ve sol kısımları birbirinden bir duvarla (Septum) tamamen ayrılmaktadır. Kalp memelilerde 4 odacıklı ve 4 kapakçıklıdır. [Sağ atrium (Sağ Kulakçık), Sol atrium (Sol Kulakçık), Sağ Ventrikül (Sağ Karıncık), Sol Ventrikül (Sol Karıncık)]. Bu odacıkları kalbin içini bölen duvarlar oluşturmuştur. Septum interatriale (Atriumlar arası bölme), septum interventriculare (Ventriküller arası bölme) ve septum atrioventriculare (Atriumlar ve ventriküller arası bölme) ile kalp bölümlere ayrılmış dört odacık oluşturmuştur. Bu odacıklardan kalbin tepe bölümündekilere Kulakçık (Atrium), taban bölümündekilere ise Karıncık (Ventrikül) adı verilir. Bu odacıklar şunlardır; ⁶⁵

- Sağ kulakçık (Atrium dextrum)
- Sol kulakçık (Atrium sinistrum)
- Sağ karıncık (Ventriculus dexter)
- Sol karıncık (Ventriculus sinister)

2.7.2. Kalbin kapakları

Kalpte iki adet atrioventriküler kapak, iki adet de büyük damar kapakları (Semilunar kapak) olmak üzere 4 adet kapakçık bulunmaktadır. Kalp kapakçıklarının amacı kalpte kan akışının yalnızca tek yönde ilerlemesini sağlamak ve kanın geriye dönüşümünü engellemektir. Bu kapaklar fibröz yapıda olup kan damarı bulunmaz, beslenmesi diffüzyon yoluyla sağlanır.⁶⁶

a. Atrioventriküler kapaklar

Kulakçıklardan karıncıklara pompalanan kan, karıncıklardaki basıncın kulakçıklardan daha fazla olduğundan geri dönme eğilimindedir. Kulakçık gevşediğinde (Diastol) kanın geri dönüşünü engellemek için her bir kulakçık ile karıncık arasında atrioventriküler kapaklar vardır.

- Triküspid kapak (Valvula tricuspidalis-üçüz kapak)
- Mitral kapak (Valvula bicuspidalis, valvula mitralis-ikiz kapak)

b. Semilunar kapaklar

Bu kapaklar, karıncıklara bağlanan büyük damarların açılma delikleri ağzında yer alır. Kapandıklarında yarım aya benzer. Karıncıkların sistolünde açılarak kanın kalpten arterlere atılmasını; karıncıkların diastolünde ise kapanarak atılan kanın karıncıklara geri dönüşünü önler.

- Valvula trunci pulmonalis
- Valvula aortae

2.7.3. Kalbin damarları

Kalp de diğer organlarda olduğu gibi hücrelerden oluşmaktadır ve oksijenlenmesi yani beslenmesi gerekir. Her ne kadar kalbin dört odacığı da kanla dolu olsa da kalp, kendi içindeki kanla değil aort damarından ayrılan sağ ve sol kalp atardamarlarından beslenir. Kalbi besleyen bu damarlara Koroner arterler (Arteria coronaria) denir. Bunlardan sağda olanına sağ koroner arter (Arteria coronaria dextra), solda olanına ise sol koroner arter (Arteria coronaria sinistra) denir. Başlangıçta iki ana dal hâlinde olan bu arterler daha sonra kollara ve dallara ayrılarak tüm kalbi besler.⁶⁷

2.7.4. Kalbin tabakaları

Kalbi saran 3 tabaka vardır. Bu tabakalar; en dışında Dış Tabaka (Pericardium veya Epicardium), Orta Tabaka (Myocardium) ve İç Tabaka (Endocardium)'dır.⁶⁸

- a. Dış tabaka (Pericardium veya Epicardium) : Kalbi dıştan bir torba gibi saran fibro seröz yapıda bir zardır.
- b. Orta tabaka (Myocardium) : Kalbin kas tabakasıdır. Kaslar, enine çizgilenme göstermektedir. Bu kaslar çizgili olmasına rağmen istem dışı çalışırlar. Kalbin en kalın tabakasıdır.
- c. İç tabaka (Endocardium) : Yassı, tek katlı epitel hücrelerden yapılmış olan bu zar, kalbin iç yüzeyini örten zardır. İçeriye doğru uzantılar vererek kalpteki dört kapağın esasını oluşturur. Bu tabakada kan damarı bulunmaz.

2.7.5. Kalbin çalışma sistemi

Kalp kası sinirsel impulsa gereksinimi olmayan, kendi uyarılarını kendi oluşturabilen bir kastır. Ancak kalbin çalışması otonom sinir sisteminin denetimi altındadır. Sempatik sinirler kalbin ritmik kasılma ve gevşeme hareketlerini hızlandırırken parasempatik sinirler yavaşlatılmasını sağlar.

Kalp, sürekli kasılıp gevşeyerek çalışır. Kalbin kasılmasına sistol, gevşemesine diastol denir. Kalpte her iki kulakçık ve karıncık ile birlikte kasılıp gevşer. Kulakçık ve karıncıkların kasılıp gevşemesi kanın hareketi için itici bir güç oluşturur. Bu kasılıp gevşeme birbirine zıttır. Kulakçıkların her ikisi aynı anda sistol durumundayken karıncıklar diastol durumuna geçer. Kalbin bir sistol ve diastol hareketine kalp atışı denir. Kalp atışı yetişkin bir insanda dakikada 60-80, ortalama 70'dir. Çocuklarda ise bu sayı dakikada 90-140 arasındadır.⁶⁹

Kulakçıklar diastolde kanla dolar. Kanla dolduktan 0,1 saniye içinde sistol dönemi başlar. Bu dönemde karıncıklar diastol halinde olup basıncın etkisiyle sağ kulakçık ve sağ karıncık arasındaki triküspit, sol kulakçık ve sol karıncık arasındaki mitral kapakçıklar açılır. Böylece kulakçıklardaki kan atrio-ventriküler deliklerden karıncıklara geçer ve karıncıklar kanla dolar.

Karincıkların sistolünde artan basıncın etkisiyle triküspit ve mitral kapaklar kapanır. Böylece kanın kulakçıklara geri dönüşü engellenir. Sağ karıncıktaki venöz kan Arteria Pulmonalis (Akciğer atardamarı) girişindeki seminular kapakçıkların açılmasıyla akciğerlere, sol karıncıktaki arterial kan ise aort girişindeki valvula aortun açılmasıyla aorta, oradan da tüm vücut dokularına dağılır.⁶⁷

2.7.6. Kalbin uyarı ve ileti sistemi

Kalbin, kulakçık ve karıncıklarının kesintisiz bir şekilde sistol ve diastolünü sağlayan özel bir yapısı vardır. Kalbin şu işini düzenli bir şekilde idare eden ve içinde sinir elemanları bulunan özel karakterdeki kas demetine Kalbin Uyarı ve İleti Sistemi denir.⁷⁰

Bu sistem; özel hücre kümeleri, demetleri ve liflerden oluşur. Uyarı ve ileti sistemi; Sinoatrial (SA) Düğüm, Atrioventriküler (AV) Düğüm, Atrioventriküler Demet (His demeti) ve Purkinje Lifleri olmak üzere 4 bölümden meydana gelir. Bunlardan ilk ikisi uyarı, diğer ikisi ise ileti sistemidir.

- Sinoatrial (SA) düğüm (Keith-flack) : Sağ kulakçığın üst yan duvarında üst ana toplardamarın kulakçığa açıldığı yerin altındadır. Sinoatrial düğüm kalp atımlarını başlatan ve ritmini kontrol eden elektriksel uyarıların başladığı bölgedir.
- Atrioventriküler (AV) düğüm (Aschof-tavara düğümü) : Triküspid kapağın arkasında sağ kulakçığın arka duvarında bulunur. Sinoatrial düğümde oluşan uyarılar, düğümler arası yollarla atrioventriküler düğüme gelir. Buraya gelen uyarılar 0.1 saniyelik bir gecikmeyle his demetine geçer.
- His demeti (Atrioventriküler demet) : His demeti atrioventriküler düğüme bağlıdır. Karıncıklar arası bölmede sağ ve sol dallara ayrılır. His demetine gelen uyarı his demetinin sağ ve sol dallarında ilerleyerek sağ ve sol karıncık kasındaki purkinje sistemine ulaşır.
- Purkinje lifleri : Karıncık kaslarına dağılan his demetinin daha küçük dallarına purkinje lifleri denir. Purkinje lifleri uyarıyı karıncık kaslarına ileterek karıncıkların kasılmalarını sağlar.

Bu ileti sistemi sayesinde kalp fonksiyonel bir bütün olarak çalışır. Sinoatrial düğümde oluşan uyardının kulakçuk kasına yayılması sonucunda kulakçık sistolü, karıncık kasına yayılması sonucunda ise karıncık sistolü oluşur. Uyardının kalpte yayılması sırasında atrioventriküler düğümdeki 0.1 saniyelik gecikme kulakçıkların, karıncıklardan önce kasılmasını sağlar. Böylece, karıncıklar diastol halindeyken kulakçıklar sistolde dir. Sinoatrial düğüm den her bir uyarı kalp kasında bir sistolü takip eden bir diastole neden olur. Sinoatrial düğüm dakikada kaç uyarı çıkartı yorsa kulakçıklar ve karıncıklar da o kadar sistol yapar. Bir kalp vuruşu karıncıkların sistolüdür.⁷¹

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada ağırlıkları 230 ± 20 g olan 30 adet Wistar ırkı erişkin dişi albino ratlar kullanıldı. Çalışmada kullanılan ratlar Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (GÜDAM)'nden temin edildi. Hayvan deneyleri, Gazi Üniversitesi Yerel Etik Kurulu kararlarına uygun olarak gerçekleştirildi (Kod no: G.Ü.ET-10.006).

Araştırmada kullanılan hayvanlar, bir grupta 6 rat olacak şekilde 5 gruba ayrıldı.

1. Kontrol (K) grubu: Deney süresince 10 hafta laboratuvar diyeti ve içme suyu ile beslendi.
2. N-nitrozodietilamin (NDEA) grubu: 15. günde tek doz N-nitrozodietilamin (NDEA) intraperitoneal (IP) olarak 200mg/kg dozunda uygulandı.
3. Ellajik asit (EA) grubu: Çalışma başlangıcından 2 hafta sonra 15. Günde uygulama başlatılarak 8 hafta boyunca 25mg/kg/gün dozunda, gūnaşırı olmak üzere serum fizyolojik (SR) gavaj yoluyla oral yoldan uygulandı.

4. N-nitrozodietilamin (NDEA) + Ellajik asit (EA) grubu (Eşzamanlı): Çalışma başlangıcından 2 hafta sonra 15. günde başlanarak EA 25mg/kg/gün dozunda gūnaşırı olmak üzere SF içerisinde gavaj yolu ile oral yoldan uygulandı. Ek olarak yine çalışmanın 15. gününde tek doz N-nitrozodietilamin (NDEA) intraperitoneal olarak 200mg/kg dozunda uygulandı.
5. N-nitrozodietilamin (NDEA) + Ellajik asit (EA) (Pre) grubu: Çalışma başlangıcından itibaren EA'in koruyucu etkisini araştırmak için 25mg/kg/gün dozunda EA gūnaşırı uygulandı. Çalışmanın 15. gününde tek doz N-nitrozodietilamin (NDEA) IP olarak 200mg/kg dozunda uygulandı.

Çalışma süresi sonunda hayvanlardan bazı analizleri yapmak için kan alındıktan sonra, sakrifiye edildiler. Daha sonra organları çıkarılarak soğuk (4 °C) SF ile dokuların temizliğı yapıldıktan sonra, kalp dokusu patolojik inceleme ve enzim analizleri için alındı ve çalışma yapılana kadar -74 °C'de saklandı.

Analizlere başlamadan önce her gruba ait kalp dokuları derin dondurucudan çıkarılıp çözüldükten sonra, önce hassas terazide tartıldıktan sonra 1/8 (m/v) serum fizyolojikle homojenize edildi. Homojenat soğutmalı santrifüjde 5000 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı ayrıldı. Süpernatantlarda protein tayininin yanı sıra, glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), ksantin oksidaz (XO), Adenozin deaminaz (ADA) ve Nitrik Oksit sentaz (NOS) enzim aktiviteleri ile Nitrik oksit (NO) ve malondialdehid (MDA) seviyeleri ölçüldü.

3.2. Gereçler

3.2.1. Cihazlar

Derin dondurucu (-85 C°, Sanyo marka)

Buzdolabı (+4 C°, Arçelik marka)

Hassas elektronik tartı (Sartorius Basic marka)

Sabit/ayarlanabilir pipetler (Socorex ve Brand marka)

Spektrofotometre (Helios-α, Unicam marka)

Soğutmalı santrifüj (Labofur 200, Heraüs marka)

Homojenizatör (B. Braun Melsungen marka)

3.2.2. Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan N-nitrozodietilamin ve Ellajik asit, Adenozin, Ksantin, XO, GSH-Red, NBT, Albumin, H₂O₂, GSH, Na₂CO₃, Tris, HCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, Folin- Cioceltau, CuSO₄ ve NaOH Sigma (St. Louis, U.S.A)'den temin edildi.

3.3. Lowry Yöntemi (Protein Miktarı Tayini)

Kalp dokusu protein konsantrasyonlarının tayininde Lowry yöntemi kullanıldı.⁷² Spektrofotometrik bir ölçüm yöntemi olan bu deneyin prensibi; alkali ortamda peptid moleküllerinin (proteinler) Cu^{+2} – protein kompleksi yapması ile mavi renk oluşturması esasına dayanır. Bu tepkimenin gerçekleşmesinde, proteinlerin triptofan ve tirozin içeren bakiyeleri etkilidir. Oluşan bu renkli bileşiğin absorbansı spektrofotometrede ile 700 nm de ölçülür. Absorbans protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ($A=\epsilon bC$).

Deneyde kullanılan reaktiflerin içeriği:

A reaktifi: 0,5 gr $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ile 1 gr sodyum sitratın 100 ml distile suda çözülmesiyle elde edilir.

B reaktifi: 0,1 N 1 L NaOH içinde, 20 gr Na_2CO_3 çözülerek elde edilir.

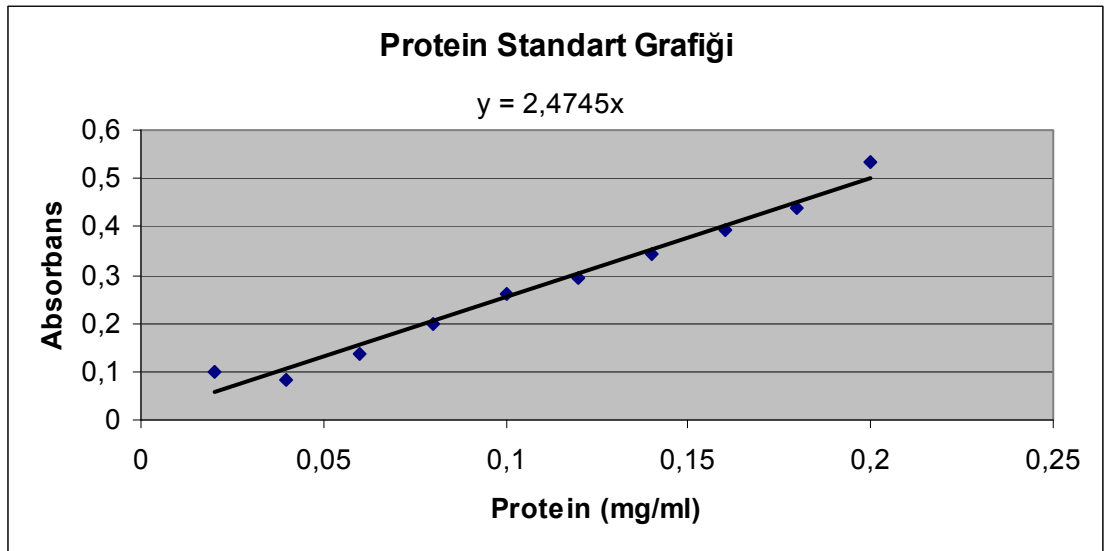
C reaktifi: 1 ml A reaktifi + 50 ml B reaktifi karıştırılarak elde edilir.

D reaktifi (Folin- Cioceltau): 10 ml Folin- Cioceltau reaktifine 10 ml distile su ilave edilerek hazırlanır.

Tablo 3.1: Protein ölçümü metoduna ait protokol

	KÖR	NUMUNE (N)
SÜPERNATAN	---	10 µl
DİSTİLE SU	500 µl	490 µl
C REAKTİFİ	2,5 ml	2,5 ml

10 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra, 0,25 ml D reaktifi numune ve kör tüplerine ilave edildi. Karışım tekrar 30 dakika süreyle oda sıcaklığında bekletildikten sonra spektrofotometrede 700 nm dalga boyunda, kör ve numunenin absorbansı distile suya karşı okundu. Bu deney için hazırlanan BSA standart çözeltisi ile aynı şartlarda standart grafik çizilerek grafiğin eğiminden örneklerdeki protein miktarı hesaplandı.

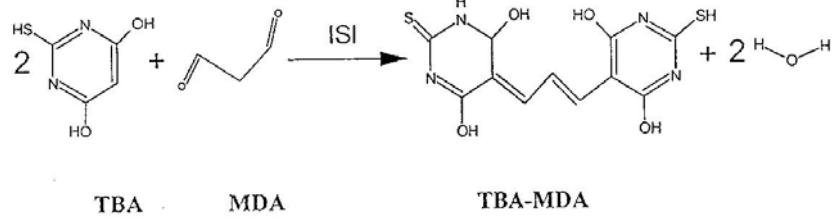


3.4. Oksidan ve Antioksidan Parametrelerin Ölçüm Metodları

3.4.1. Malondialdehid (MDA) Miktarı Ölçüm Metodu

Malondialdehit tayini Van Ye TM ve arkadaşlarının tarif ettiği metoda göre çalışıldı.⁷³

Metodun prensibi: İki mol TBA asidik ortamda ve 85-100 °C sıcaklıkta bir mol MDA ile birleşerek mor renkli TBA-MDA kompleksini oluşturur. Bu kompleksin verdiği absorbans 532 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülür.



Şekil 3.1: TBA-MDA kompleksi oluşumu

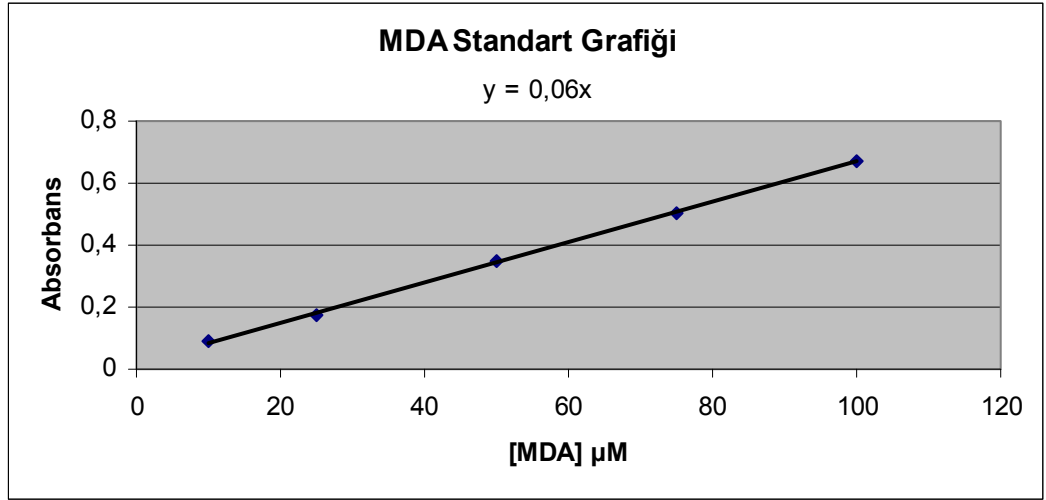
Tablo 3.2: MDA ölçümü metoduna ait protokol

	NUMUNE	KÖR
SÜPERNATAN	100 µl	100 µl
ETİL ALKOL(% 95)	1 ml	1 ml
FOSFAT TAMPONU	1 ml	1 ml
TCA	1 ml	1 ml
TBA	1 ml	---

Tüpler 30 dakika süreyle kaynar su banyosunda tutuldu. Daha sonra, 6000 devirde 20 dakika süreyle santrifüj edildi. Spektrofotometrik ölçüm yapılacağı zaman, kör tüpüne 1 ml TBA çözeltisi ilave edildi. 532 nm de kör ve numune tüplerinin absorbansı, distile suya karşı okundu.

Bu ölçümde MDA standardı olarak tetraetoksipropan (TEP) kullanıldı. (%96; d=0,92; MA= 220,3).

1,1,3,3-Tetraetoksi propandan önce 10 mM'lık stok çözelti hazırlandı, stok çözeltiden uygun seyreltmelerle 10, 25, 50, 75 ve 100 µM'lık standart çözeltiler hazırlanarak standart grafik çizildi.



Grafik 2: MDA standart grafiği

Absorbans=f (Konsantrasyon) grafiğinin eğiminden de numunelerdeki MDA miktarları hesaplandı. Sonuçlar nmol/mg protein olarak ifade edildi.

3.4.2. Ksantin Oksidaz (XO) Aktivitesi Ölçüm Metodu

Ksantin oksidaz tayini Hashimoto S'nin tarif ettiği metoda göre çalışıldı.⁷⁴ Ksantin oksidaz pürin bazları olan hipoksantin ve ksantini ürik aside dönüştüren enzim olup, reaksiyon sonucunda oluşan ürik asit 293 nm'de maksimum absorbans vermektedir.

Tablo 3.3: XO aktivitesi ölçümü metoduna ait protokol

FOSFAT TAMPONU	2,8 ml
KSANTİN ÇÖZELTİSİ	0,1 ml
SÜPERNATAN	0,1 ml

Elde edilen çözeltinin absorbansı başlangıç (0.) ve 1. saatlerde ölçüldü. Ölçüm, spektrofotometrede, 293 nm dalga boyunda yapıldı. Ölçümler arasındaki fark (ΔA) bulunduğundan sonra XO aktivitesi ürik asitin molar absorpsiyon katsayısı kullanılarak ($\epsilon: 10 \times 10^{-3} \text{ L}/\mu\text{mol. cm}$) hesaplandı.

XO aktivitesi spesifik aktivite cinsinden verildi (mIU/mg prot.)

3.4.3. Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçüm Metodu

Kalp doku örneklerinde Katalaz aktivitesinin ölçümü Aebi H'nın metoduna göre yapıldı.⁷⁵

Metodun prensibi: 240 nm'de katalaz tarafından yıkılan hidrojen peroksitin absorbans değişiminin izlenmesi esasına dayanmaktadır.

Reaktifler:

1. Fosfat tamponu: KH_2PO_4 ve Na_2HPO_4 kullanılarak, 0.1 M pH 7 olan fosfat tamponu hazırlanır.

2. H_2O_2 çözeltisi: Stok H_2O_2 çözeltisi, fosfat tamponu ile seyreltilir.

H_2O_2 çözeltisi, süpernatant ve fosfat tamponu kuvarz küvete konuldu. Spektrofotometrede, 240 nm dalga boyunda absorbanst 1 dakika süreyle izlendi. Gözlenen absorbanst farkı (ΔA) hesaplandıktan sonra, CAT aktivitesi hidrojen peroksitin molar absorpsiyon katsayısı kullanılarak (ϵ : 0.04098 litre/mmol.cm) hesaplandı.

CAT aktivitesi spesifik aktivite cinsinden (IU/mg protein) verildi

3.4.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçüm Metodu

Kalp doku örneklerinde SOD aktivitesi Durak İ ve arkadaşlarının tarif ettiği metoda göre çalışıldı.⁷⁶

Metodun prensibi: Nitroblue tetrazolium'un (NBT) süperoksit üreticisi olan ksantin-ksantin oksidaz sistemi tarafından indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Reaksiyon ortamına ilave edilen SOD enzimi oluşan süperoksit radikallerini ortamdan uzaklaştırarak, aktivitesiyle doğru orantılı olarak NBT'nin redüksiyonunu engeller.⁷⁶

Redüklenmiş NBT menekşe rengindedir ve spektrofotometrede, 560 nm dalga boyunda absorbans verir. Ortama SOD ilave edilerek bulunan absorbans değeri, enzimin ilave edilmediği kör deneyinin absorbansıyla karşılaştırılarak enzim aktivitesi hesaplanır.

Reaktifler:

Ksantin oksidaz çözeltisi: Amonyum sülfat içinde XO çözülür.

CuCl₂ çözeltisi: Distile suda CuCl₂ çözülür.

Reaktif 1: Aşağıdaki çözeltiler ayrı ayrı hazırlandıktan sonra birleştirilir.

-9,1 mg ksantin, 1 N NaOH'den distile su içine damlatıldıktan sonra bu çözeltiye ilave edilerek çözülür. Daha sonra distile su tamamlanır.

-100 ml distile suda EDTA çözülür.

-100 ml distile suda NBT çözülür.

-30 ml distile suda 30 mg sığır albümini çözülür.

-60 ml distile suda Na₂CO₃ çözülür.

Daha sonra bütün çözeltiler birleştirilerek Reaktif 1 elde edilir.

Tablo 3.4: SOD aktivitesi ölçümü metoduna ait protokol

	NUMUNE	KÖR
REAKTİF 1	2,75 ml	2,75 ml
SÜPERNATAN	100 µl	---
XO	50 µl	50 µl

Tüpler oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi.

CuCl ₂	100 µl	100 µl
SÜPERNATAN	---	100 µl

Bu deneyde SOD enzim aktivitesi IU cinsinden verilmez. Bunun yerine özel olarak tanımlanmış ünite tarifi kullanılır. Buna göre; 1 ünite SOD aktivitesi, NBT'nin redüklenmesini % 50 oranında inhibe eden enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Kör ve numunelere ait absorbanslar spektrofotometrede, 560 nm’de distile suya karşı okunduktan sonra, SOD aktivitesi yukarıda verilen ünite tarifine göre hesaplandı. Buna göre, ‘Faktör’ değeri 20 olarak bulundu.

SOD aktivitesi (U/mg) = $[(\Delta OD_{Kör} - \Delta OD_N) / \Delta OD_{Kör}] \times 20 / \text{Protein konsantrasyonu (mg/ml)}$

3.4.5. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi Ölçüm Metodu

GSH-Px aktivitesi Paglia DE ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı.⁷⁷

Metodun prensibi: 340 nm’de NADPH’ın absorbans değişimine dayanmaktadır. Enzim aktivitesi ise NADPH’ın ϵ değerinden (6.22 $\mu\text{mol/ml}$) yararlanılarak hesaplandı.

Reaktifler:

Fosfat tamponu (pH:7, 0.1 M): EDTA, Na₂HPO₄ ve KH₂PO₄ 1 litre distile suda çözülerek hazırlanır.

Glutasyon çözeltisi: 250 mg glutasyon 5 ml fosfat tamponunda çözülür.

NADPH: 15 mg NADPH 2,5 ml fosfat tamponunda çözülür.

Glutasyon redüktaz enzimi: 3,2 M amonyum sülfatta, glutasyon redüktaz enzimi seyreltilir.

Tablo 3.5: GSH-Px aktivitesi ölçümü metoduna ait protokol

FOSFAT TAMPONU	2,5 ml
GSH	100 µl
NADPH	50 µl
GSH REDÜKTAZ	100 µl
SODYUM AZİD	100 µl
SÜPERNATAN	100 µl

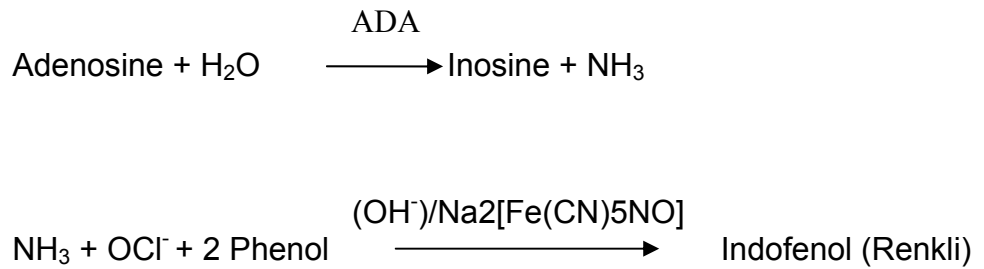
Spektrofotometre 340 nm dalga boyuna ayarlandı ve fosfat tamponuyla sıfırlandı. Çözeltiler küvete konulduktan sonra, 1dakika süreyle absorbans takip edilerek kör değeri elde edilmiş oldu. Aynı işlem 100 µl H₂O₂ çözeltisi eklenerek 5 dakika süre ile takip edilerek ΔA hesaplandıktan sonra, GSH-Px aktivitesi NADPH'ın molar absorpsiyon katsayısı kullanılarak hesaplandı.

GSH-Px aktivitesi mIU/mg protein olarak verildi

3.4.6. Adenozin Deaminaz (ADA) Enzimi Ölçüm Metodu

ADA aktivite tayini Giuseppe Giusti'nin tarif ettiği metoda göre yapılmıştır.⁸⁷

Metodun Prensibi:



Reaksiyonu gereği, ADA aktivitesinin ölçümü için substrat olarak adenozin (deoksiadenozin) kullanılır. ADA adenozinden inozin

(deoksiinozin) oluşumunu katalizler. Bu sırada açığa çıkan amonyak, sodyum hipoklorit ve fenol/nitroprussid ile birlikte alkali çözeltide koyu mavi indofenol şeklini alır. Sodyum nitroprussid katalizör olarak görev yapar. Bu reaksiyon gereği amonyak konsantrasyonu indofenol konsantrasyonu ile (absorbansıyla) doğru orantılıdır.

Reaktifler:

- 1) Fosfat Tamponu (50mM; pH: 6,5)
- 2) Tamponlanmış Adenozin Çözeltisi (Substrat 21 mM)
- 3) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ stok çözeltisi (15 mM)
- 4) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ standart çözeltisi (75mM; 0,15 μ val, NH_3 /ml)
- 5) Fenol- Nitroprussid çözeltisi (106mM Fenol, 0.17mM Na nitroprussid)
- 6) Alkali Hipoklorit çözeltisi (11 mM NaOCl, 125 mM NaOH)

Kalp doku örneklerinde ADA aktivitesi ölçümü için; numune tüplerine 1ml adenozin çözeltisi ve 0.05ml supernatan, numune körü tüplerine de 1ml adenozin çözeltisi eklenerek karıştırıldıktan sonra tüplerin ağzı parafilmle kapatılarak 37°C'de 60 dakika su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra numune tüplerine 3mL FNP çözeltisi ve 3ml alkali HOCl

çözeltisi, numune körü tüplerine de 3ml FNP çözeltisi, 0.05ml homojenat ve 3ml alkali HOCl çözeltisi eklendi.

Tüpler karıştırılıp 37°C' de su banyosunda 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası numune ve körlerin absorbansı 628 nm'de distile suya karşı okundu. Absorbansın 1.00'in üstüne çıktığı durumlarda örnekler distile su ile 2-5 kat seyreltilerek deney tekrarlandı.

ADA aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{ADA Aktivitesi (IU/L)} = \{(A)_N - (A)_K / (A)_S - (A)_{SK}\} \times 50$$

Sonuçlar Spesifik Aktivite (IU/mg Protein) cinsinden verilmiştir.

3.4.7. Nitrik Oksit (NO) Düzeyi Ölçüm Metodu

NO metabolizmasının son ürünleri olan nitrit-nitrat miktarını hesaplamak için indirgenmede kullanılan yöntem belli büyüklükte kadmiyum boncukları ile muamele edilmesi esasına dayanır. Böylece nitratın nitrite çevrilmesi gerçekleşmiş olur. Bundan sonra total nitrit düzeyleri Griess reaksiyonu ile ölçülür. Nitrik asitin sülfanilamid diazotizasyonu ve naftil etilendiamin hidroklorid ile reaksiyonu sonucu oluşan pembe renkli bir ürün meydana gelir. Kompleksin absorbansı 540 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Reaktifler:

12,5 mM naftietilen diamin dihidroklorid çözeltisi,

18,75 mM Sülfanilik asit çözeltisi,

0,05 M HCl çözeltisi

Numuneden her tüpe 200 µl alınır ve proteinleri çöktürmek için %20'lik (w/v) TCA'dan 20 µl her tüpe ilave edilir. Karıştırılıp, 5 dakika oda sıcaklığında bekletilir. 5000 devirde 5 dakika santrifüj edilir. Süzüntü çıktığı kadar alınıp üzerine birer adet kadmiyum metali konulur. Bir gece bekletilir. Bundan sonra protokole devam edilir:

Tablo 3.6: NO ölçümü metoduna ait protokol

	KöR	NUMUNE
SÜZÜNTÜ	50 µl	50 µl
HCl	250 µl	250 µl
SÜLFANİLİK ASİT	250 µl	250 µl
NAFTİL ETİLENDİAMİN DİHİDROKLORİD	---	250 µl
DİSTİLE SU	250 µl	---

Tekrar 5000 devirde 5 dakika santrifüj edildikten 30 dakika sonra 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede okuma yapılır.

Standartın optik dansitesi (St_{OD}) = 0,1

Standartın konsantrasyonu (St_c) = 25 mM

NO konsantrasyonu (mM) = $\{(N_{OD} - \sum K_{OD}) / St_{OD}\} \times St_c$

NO konsantrasyonu (mM) = $\{(N_{OD} - \sum K_{OD}) / 0,1\} \times 25 \text{ mM}$

NO konsantrasyonu (mM) = $(N_{OD} - \sum K_{OD}) \times 250$

3.4.8. Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Enzim Aktivitesi Ölçüm Metodu

NOS aktivitesi ölçüm prensibi, numunedeki NOS'un arginini NO'e dönüştürmesi ve oluşan NO düzeyinin belirlenmesi esasına dayanır.

Nitrit ve nitrat biyolojik sıvılarda bulunan NO oksidasyon ürünleridir. NOS aktivitesi belirteci olarak kullanılırlar.

Tablo 3.7: NOS aktivitesi ölçümü metoduna ait protokol

	NUMUNE TÜPÜ	KÖR TÜPÜ
NUMUNE	100 µL	100 µL
ARGİNİN	200 µL	200 µL

Numune tüpleri 70 dakika, kör tüpleri 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.

HCl	200 µL	200 µL
SÜLFANİLİK ASİT	200 µL	200 µL
NAFTİL ETİLENDİAMİN DİHİDROKLORİD	200 µL	200 µL

Karıştırılan tüpler 1 saat oda sıcaklığında bekletilir. 5000 devirde 5 dakika santrifüj edilir. Süpernatant alınarak, spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda distile suya karşı okunur.

Standartın optik dansitesi (St_{OD}) = 0,1

Son hacimdeki Standartın konsantrasyonu (St_C) = 25 mM = 25 μ mol/mL

Numune hacmi = 0,1 mL

Total hacim = 0,9 mL

NOS aktivitesi(IU/mL)=[{(N_{OD}-K_{OD}) / St_{OD} } x St_C] x (1/60)xSeyreltmefaktörü

NOS aktivitesi(IU/mL)=[{(N_{OD}-K_{OD}) / St_{OD} } x 25 μ mol/ mL]x (1/60)x (0,9/0,1)

NOS aktivitesi(IU/mL)= (N_{OD} - K_{OD}) x 37,5

3.7. İstatistiksel Analiz

Sonuçların istatistiksel analizinde SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) programı kullanıldı. Elde edilen değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. Grupların karşılaştırılmasında Anova testleri kullanıldı. Anova testinde anlamlı çıkan sonuçlar, Independent Samples Test ile değerlendirildi ve $P < 0,05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Deney sonuçlarına ait veriler Tablo 4.1’de görülmektedir. Tablodan da görüleceği gibi ADA aktivitesi tüm gruplarda birbirlerine yakın olarak çıkmıştır. Bu durum Ne NDEA’nın Ne de EA’in rat kalp dokusunda kontrol grubuna göre farklı bir etki yapmadığını göstermektedir. Aynı durum MDA açısından da benzer sonuçlar göstermektedir. Bu da bize NDEA’nın olası etkisini lipid peroksidasyonu mekanizması dışında başka bir mekanizma ile gösterdiğini düşündürebilir.

XO enzim aktivitesi incelendiğinde, kontrol grubuna göre sadece EA ve eş zamanlı NDEA+EA grubunda anlamlı derecede enzim aktivitesinin azaldığını göstermektedir sırası ile $p=0.048$, $p=0.036$.

Serbest radikal metabolizmasında görev alan enzimlerden GSH-Px incelendiğinde, kontrol grubuna göre NDEA grubunda anlamlı bir değişiklik gözlenemezken, EA, NDEA+EA pro ve NDEA+EA, eş z.. gruplarında enzim aktivitesinde artışlar görülmektedir, ancak kontrol grubuna eş zamanlı olan istatistiksel olarak anlamlı derecede yükselmiştir $p=0.013$. Ayrıca NDEA grubu ile eş zamanlı grup kıyaslandığında eş zamanlı grupta NDEA grubuna göre aktivitede anlamlı bir yükseklik görülmektedir $p=0.013$.

SOD ve CAT aktiviteleri incelendiğinde; kontrol grubuna göre proflaksi grubunda anlamlı bir düşme gözlenirken ($p=0.001$), diğer gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Ancak kontrol grubu dışındaki diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler görülmektedir.

NO miktarı ve NOS aktivitesinde anlamlı bir değişim görülmemiştir.

Tablo 4.1 : Rat Kalp dokuları enzim aktivitelerine ait ortalama $\pm$ standart sapma ($X \pm SD$) değerleri ve anlamlılık (p) testi

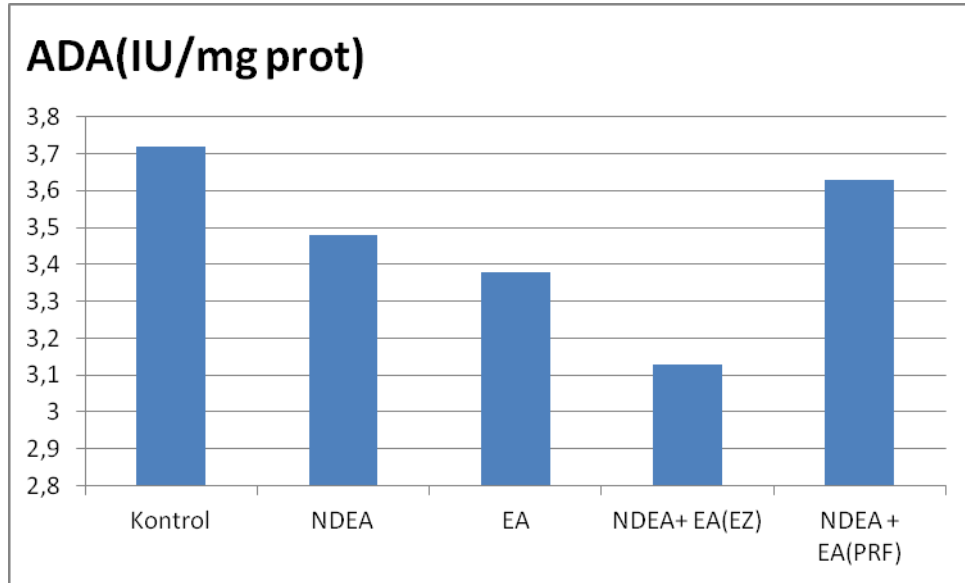
GRUP	ADA		XO		GSH-Px		SOD		CAT		NOS		NO		MDA	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
1. Kontrol	3.72	0.60	24.00	7.91	7.34	2.57	1.38	0.20	23.05	2.42	1.11	0.13	25.24	2.03	3.97	1.13
2. NDEA	3.48	1.02	21.17	4.79	7.50	1.89	1.23	0.19	24.63	3.20	1.14	0.12	21.46	1.61	3.97	0.68
3. E.Asit	3.38	0.43	18.33	2.42	10.44	1.61	1.47	0.07	20.27	4.80	.96	0.10	21.98	1.49	3.37	0.76
4. NDEA+EA (Eş zamanlı)	3.13	1.10	14.00	4.36	12.05	3.02	1.39	0.13	16.20	3.92	1.21	0.29	25.35	4.10	4.19	1.08
5. NDEA+EA (Proflaksi)	3.63	0.66	20.67	2.89	10.35	3.84	0.93	0.05	23.30	4.13	1.09	0.13	22.85	3.00	4.01	0.60
One-way anova P değeri	0.838		0.097 *		0.045 *		0.001 **		0.020 *		0.169		0.082		0.609	
1-2	Gruplardaki Fark anlamlı olmadığı için çoklu karşılaştırma yapılmadı		0.048	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	Gruplardaki Fark anlamlı olmadığı için çoklu karşılaştırma yapılmadı		Gruplardaki Fark anlamlı olmadığı için çoklu karşılaştırma yapılmadı		Gruplardaki Fark anlamlı olmadığı için çoklu karşılaştırma yapılmadı		Gruplardaki Fark anlamlı olmadığı için çoklu karşılaştırma yapılmadı	
1-3			0.036		p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05								
1-4				p>0.05	0.013	p>0.05	0.010									
1-5					p>0.05	0.001	p>0.05									
2-3				p>0.05	p>0.05	0.014	p>0.05									
2-4				p>0.05	0.013	p>0.05	0.002									
2-5				p>0.05	p>0.05	0.012	p>0.05									
3-4				p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05									
3-5				p>0.05	p>0.05	0.001	p>0.05									
4-5				p>0.05	p>0.05	0.001	0.014									

* p < 0.05 ** p < 0.01

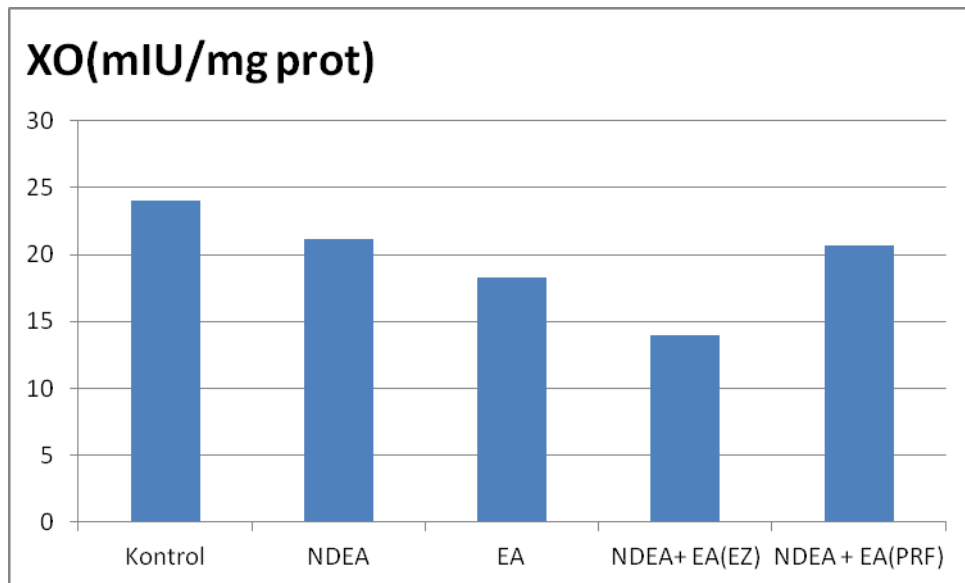
ADA, NOS, GSH-Px ve CAT (IU/mg protein)

XO (mIU/mg Protein), SOD (U/mg protein)

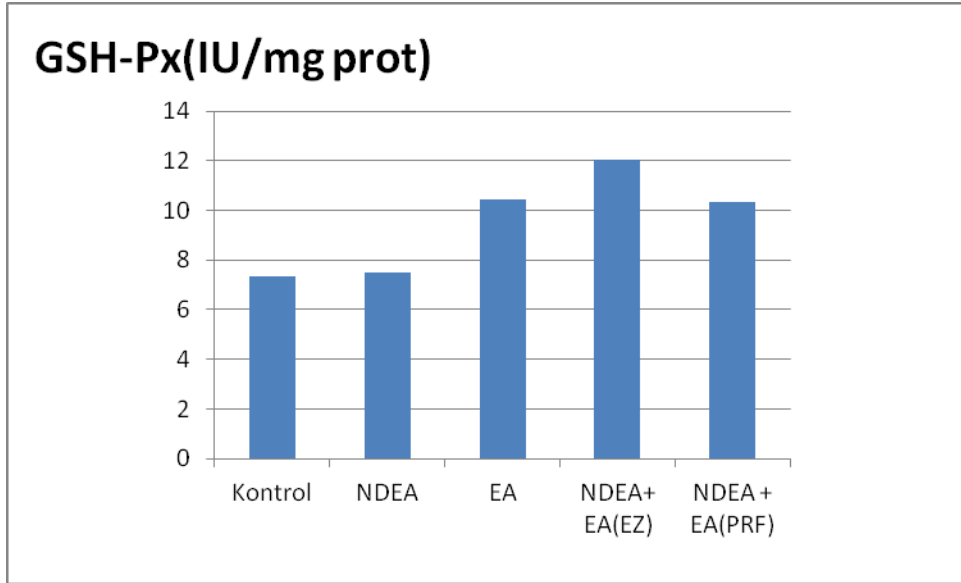
MDA (nmol/mg protein), NO: μ mol/mg protein



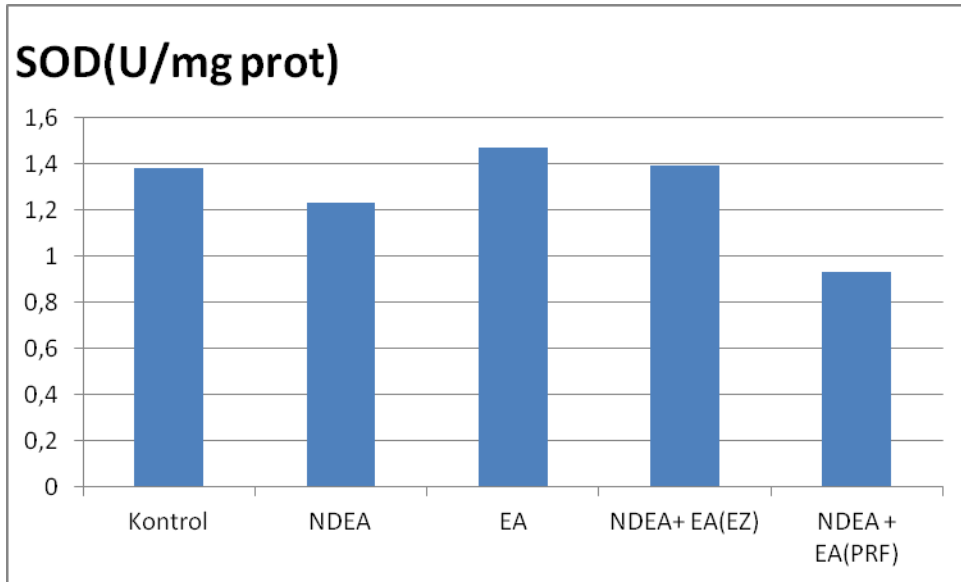
Grafik 3: ADA enziminin gruplar üzerine etkisi



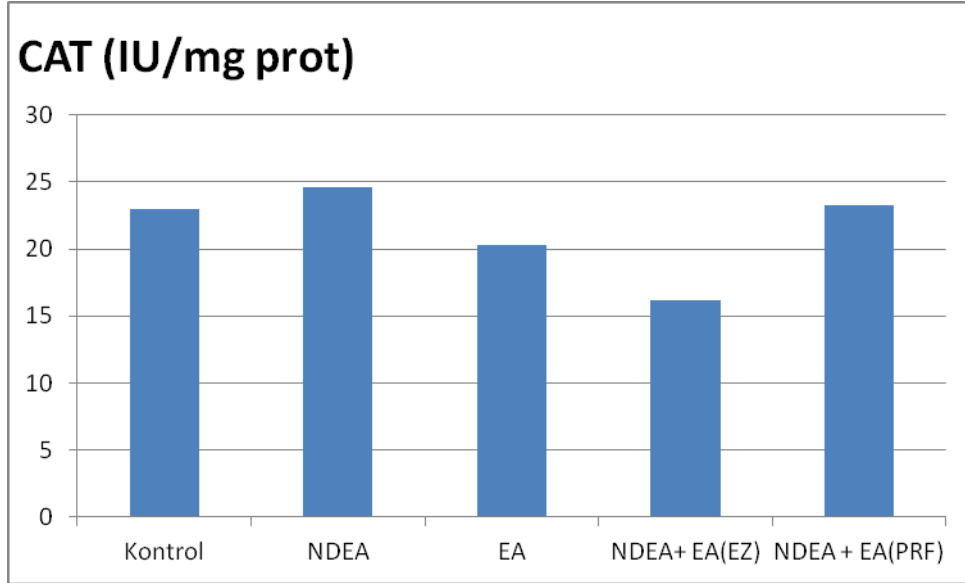
Grafik 4: XO enziminin gruplar üzerine etkisi



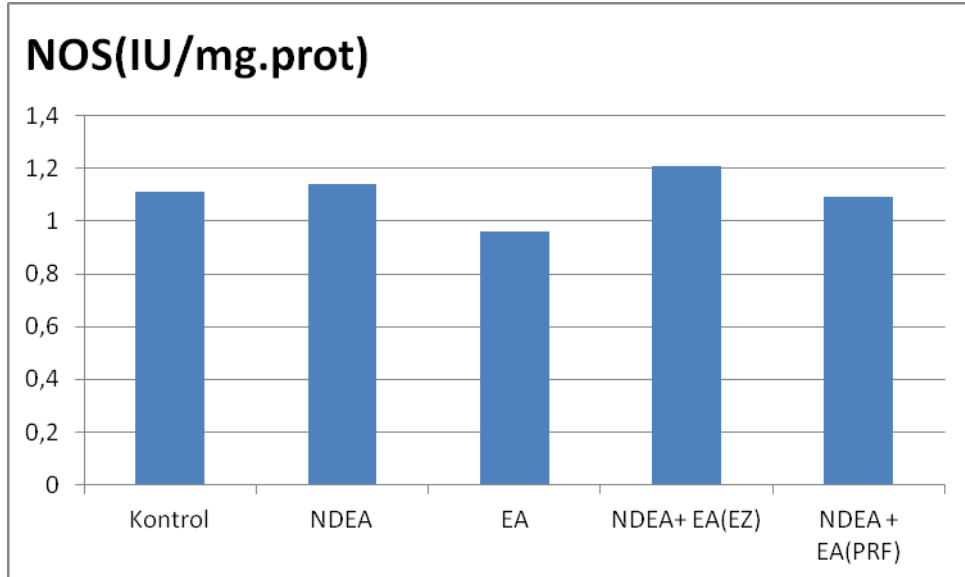
Grafik 5: GSH-Px enziminin gruplar üzerine etkisi



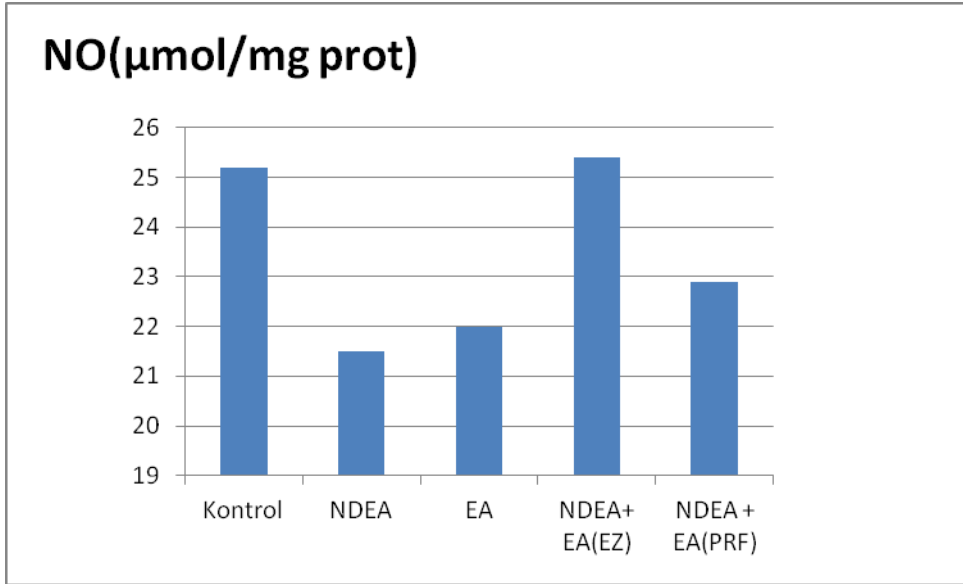
Grafik 6: SOD enziminin gruplar üzerine etkisi



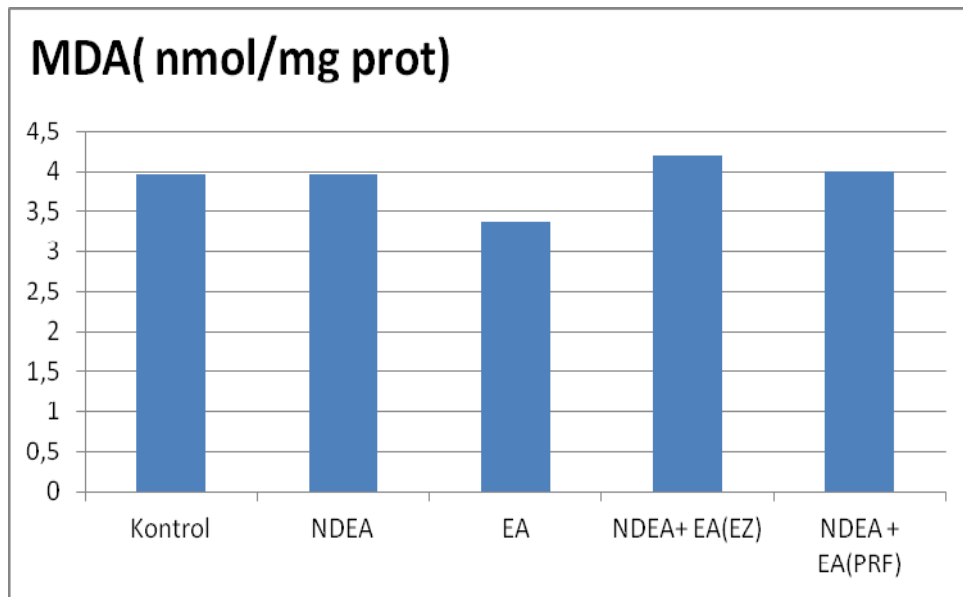
Grafik 7: CAT enziminin gruplar üzerine etkisi



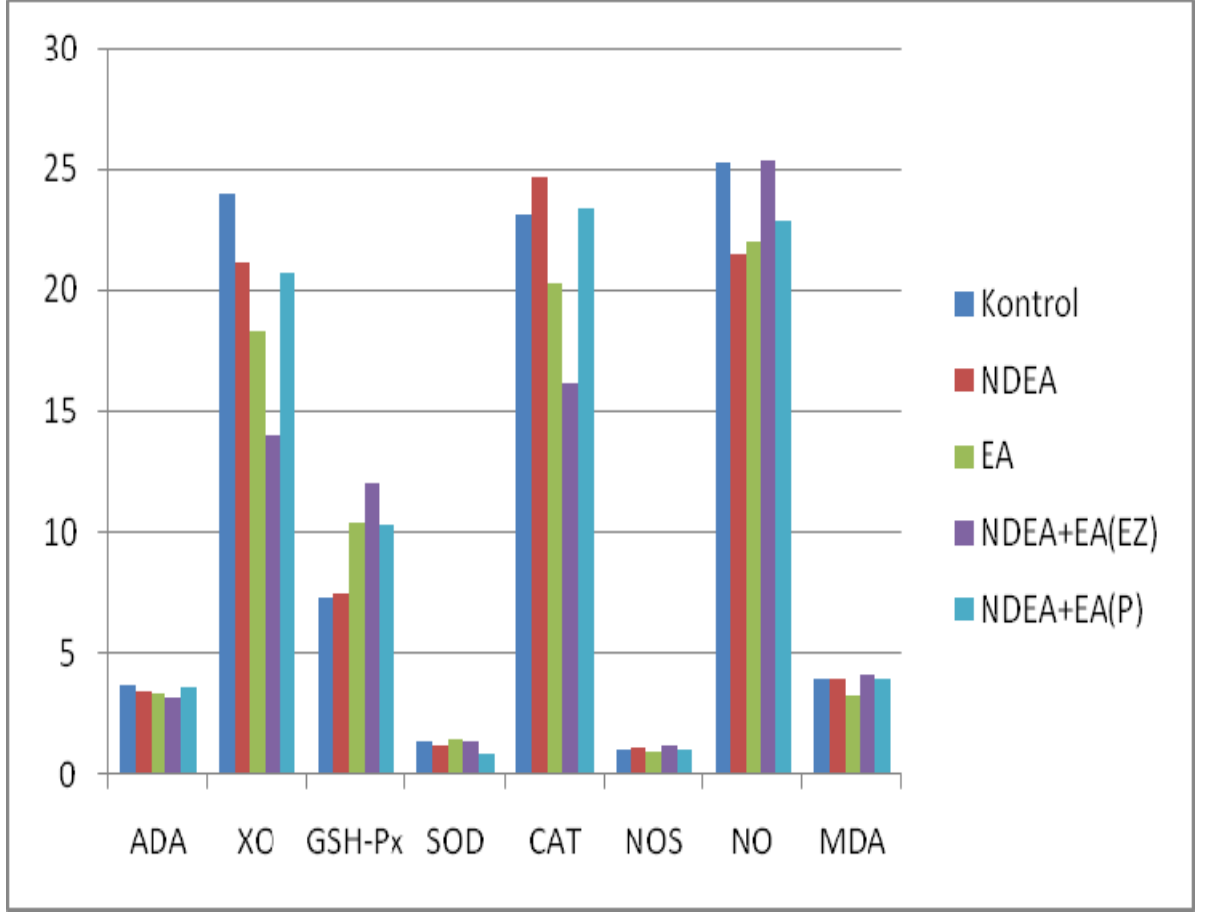
Grafik 8: NOS enziminin gruplar üzerine etkisi



Grafik 9: Nitrik Oksitin gruplar üzerine etkisi



Grafik 10: Malondialdehitin gruplar üzerine etkisi



Grafik 11: Çalışma grupları üzerine etkiler

ADA, NOS, GSH-Px, CAT: IU/mg Protein

XO: mIU/mg protein, SOD: U/mg protein

NO: $\mu\text{mol/mg protein}$, MDA: nmol/mg protein

6. TARTIŞMA

Bu çalışmada, N-NDEA verilmiş ratların kalp dokularında NO düzeyleri ve ellajik asit'in etkisini araştırmak amacıyla MDA düzeyleri, NOS, CAT, GSH-Px, SOD, XO, ADA aktiviteleri incelendi.

N-Nitrozo bileşiklerin deney hayvanları üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda toksik, te*ratojenik, mutajenik ve kanserojenik etkilerinin olduğu belirtilmiştir. İnsanların N-nitrozo bileşiklerine maruz kalması genellikle iki şekilde gerçekleşmektedir. Birincisi, bu bileşikler gıdalarda katkı maddesi ya da doğal olarak bulunan nitrat ve nitritin çeşitli biyolojik aşamalar sonucu metabolize olmasıyla vücutta endojen olarak meydana gelmektedir. İkincisi ise, mikrobiyal dayanıklılığın artırılması amacıyla et ürünleri, balık ve peynirlere ilave edilen nitrit tuzlarının gıdaların içeriğindeki aminlerle tepkimeye girmesi sonucunda alımı şeklinde olmaktadır. N-nitrozo bileşiklerinin oluşumunda; besinlerin pişirilme şekli, pişirme süresi ve uygulanan ısı da etkilidir. Özellikle kızartılarak pişirilen nitritle kürlenmiş etlerde, N-nitrozo bileşiklerinin daha fazla oluştuğu bilinmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, insanlarda görülen kanser olgularının başlıca sebebinin (%60) beslenmeye bağlı olduğunu ortaya koymaktadır. Beslenmeden kaynaklanan kanserlerin azaltılması için potansiyel kanserojen N-nitrozo bileşiklerinin gıdalardaki miktarlarının denetimi titizlikle yapılmalı ve gerekli sınırlamalar uygulanmalıdır.

Benzer şekilde, gıdalara koruma amaçlı olarak ilave edilen veya doğal olarak içeriğinde yer aldıkları gıdalar ile vücuda alınan nitrat ve nitrit miktarlarının azaltılması için gerekli çalışılmalar yapılmalıdır. Gıdalarda ve vücutta, N-nitrozo bileşiklerinin oluşumunu önleme özelliği bilinen antioksidanların katkı maddesi olarak uygun miktarlarda gıdalara eklenmeli veya antioksidan özelliğe sahip bileşikler diyetlerde yeterli miktarda alınmalıdır.⁷⁸

Ellajik asit serbest radikallerin yıkıcı etkilerini bloke edici özelliği olan bir antioksidandır. Ahududu ve çilek gibi meyvelerde bulunan ellagitannins vücutta ellajik asite dönüşür. Ellajik asit kansere sebep olan moleküle bağlanarak etkisiz hale getirir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda kanserli hücrelerin büyümesini engelleyici ve oksidatif hasara karşı korumada etkili olabileceği ortaya çıkmıştır. Ellajik asit genellikle ahududu, çilek, böğürtlen, karadut, kırmızı üzüm, nar, kiraz, vişne, kızılcık ve ceviz gibi besin maddelerinde bulunur.

Bir çalışmada nitrozodietilaminin deney tavşanlarında aterosklerozla ilişkisi incelenmiştir. Tavşanlara oral hiperkolesterolemik diyet ile birlikte günde 50 mg NDEA verilmiş ve eritrositlerin in vitro lipid peroksidasyonunun artmasının yanısıra ozmotik fragilitesi de belirli oranda artmıştır. NDEA olmadan veya hiperkolestrol diet eşliğindeki beslenme süresince plazma total lipid düzeyi, kolestrol ve gliserit miktarı artmaya devam etmiştir. Hiperkolestrol diet kesildikten sonra yağ oranları düşmüştür. Çalışma sonucu NDEA'nın oral uygulanmasının sonucu kandaki lipid peroksidasyonu artmış ve lipid klirensi düşmüştür.⁸⁰

NDEA ve vitamin etkileşiminin çalışıldığı bir çalışmada vitamin E ile ön tedavinin, NDEA verilmiş rat karaciğerinde oksidatif strese karşı koruyucu bir etkisinin olup olmadığı incelenmiştir. Sonuç olarak E vitaminin karaciğer hasarında sadece küçük değişiklikler oluşturmalarına karşın, bu vitaminle ön tedavi sonucu oksidatif stresin azaldığı görülmüştür.⁸¹

Başka bir çalışmada farklı dozlarda NDEA'nın ratlar üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışma kalp ve dalak büyümesi ve karaciğer ağırlığındaki artışla sonuçlanmıştır. Doza bağımlı karaciğer fonksiyon testlerindeki enzim seviyelerinde sürekli bir artış gözlenmiştir. Çalışma sonucu NDEA dozuna bağlı olarak kan ve doku lipid peroksidasyonu artmıştır.⁸²

Birçok deneysel çalışmada NDEA'nın oluşturdukları doku hasarında artmış olan MDA düzeyleriyle karakterize lipid peroksidasyona neden olduğu gösterilmektedir. Bir çalışmada ratlara uzun süreli NDEA verilmiş kalp dokusunda MDA düzeyleri önemli derecede yüksek çıkmıştır.⁸³

Başka bir çalışmada, ratlara NDEA uygulandıktan sonra karaciğer dokularında MDA düzeyleri anlamlı derecede yüksek çıkmıştır.⁸⁴

Bir alışmada Ellajik asit'in kanserojenik bir madde olan benzoapiren'e karşı antimutajenik ve antikanserojen özelliği olduğu tesbit edilmiştir. Ellajik asitin potansiyel bir çevresel kanserojen olan N-NDEA'e maruz kalmış farelerdeki akciğer neoplaziye karşı tümör inhibitörü olduğu ispatlanmıştır.⁸⁵

Bir çalışmada polifenol türevi olan Quersetin'i 15 gün süreyle sıçanlara vermişler ve sonuçta katalaz enzim aktivitesinin arttığını ve lipid peroksidasyonunun azaldığını gözlemişlerdir.⁸⁶

Yapılan bazı çalışmalarda ratlara NDEA uygulandıktan sonra karaciğer dokularında SOD aktivitelerinin ve GST aktivitelerinin anlamlı derecede düşük çıktığı gözlenmiştir.⁸⁶

Grupların GSH-Px değerleri mukayese edildiğinde EA, NDEA+EA (eş zamanlı) ve NDEA+EA (Profilaksi) gruplarında kontrole göre artmıştır. Bu durum elajik asitin GSH-Px zerindeki aktivasyon gücünden kaynaklanabilir.

SOD aktivitesinde Kontrol ve NDEA+EA (Proflaksi) gruplarına bakıldığında enzim aktivitesinde azalış, NDEA ve EA gruplarında enzim aktivitesinde artış, NDEA ve NDEA+EA (Proflaksi) gruplarına bakıldığında enzim aktivitesinde azalış grlmştr. Yine anlamlı sonuç veren gruplardan EA ve NDEA+EA (Proflaksi) gruplarında

ve NDEA+EA (Eşzamanlı) ve NDEA+EA (Proflaksi) gruplarına bakıldığında enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiştir. Bu sonuçlar NDEA'nın SOD aktivitesini baskıladığını, elajik asitin ise aktive ettiğini göstermektedir.

CAT aktivitesi elajik asit grubu ile NDEA+EA (eş zamanlı) grubunda anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Bu durum elajik asitin CAT üzerinde inhibisyon oluşturabileceğini göstermektedir.

XO enzim aktivitesi incelendiğinde, kontrol grubuna göre sadece EA ve eş zamanlı NDEA+EA grubunda anlamlı derecede enzim aktivitesinin azaldığını göstermektedir sırası ile $p=0.048$, $p=0.036$. Bu değerler de EA'nın XO enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon yapabileceğini göstermektedir.

ADA ve MDA değerleri ile NO ve NOS değerlerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu durum gruplar arasında oksidasyon reaksiyonları ve nitrik oksit parametreleri arasında anlamlı bir farklılık olmadığını göstermektedir. Her ne kadar bazı antioksidan enzim aktivite değerleri arasında farklılıklar görülse de MDA değerlerinde farklılık görülmemesi dolayısı ile bu durumun oksidatif strese yol açmadığını söyleyebiliriz.

7. SONUÇ

1. NDEA, etkisini oksidan/antioksidan sistem ve NO metabolizması üzerinden göstermemektedir.
2. Ellajik Asit, istatistiksel olarak anlamsız bile olsa ADA ve XO ın azalmasına, GSH-Px ve SOD nin artmasına yol açmış gözüküyor. Hücre içi süperoksit üretici sistemin baskılanması (ADA, XO düşüklüğü) ve enzimatik sistemin nisbi aktivasyonu (GSH-PX ve SOD nin nisbi artışı), EA nın oksidan stresin baskılanmasına ve MDA nın düşmesine yol açtığını göstermektedir.
3. NDEA ve EA nın birlikte verilmesi ile, (EA grubu ile mukayese edildiğinde) ADA ve XO daha fazla baskılanmış, buna karşılık GSH-Px ve SOD daha fazla aktive olmuş olmasına rağmen oksidasyon nisbi olarak artmıştır (MDA artmış). Bu etki muhtemelen CAT enzim aktivitesinde meydana gelen önemli düşme sonucu ortaya çıkmıştır. Bu grupta CAT da meydana gelen baskılanma ise muhtemelen iki farklı kimyasal yapının (NDEA ve EA) verilmesi sonucu ortaya çıkan farklı bir ara metabolit dolayısı ile olabilir; bunun en açık göstergesi tek başına NDEA ve EA gruplarında böylesi bir etki gözlenmemiştir.

NDEA Kalp dokusunda oksidasyon oluşturmamaktadır. EA ise kalp dokusunda kısmi bir antioksidan etki göstermektedir. Buna karşılık NDEA ve EA birlikte verildiğinde bilhassa CAT aktivitesindeki düşmeye bağlı olarak oksidan stres gelişmekte ve oksidasyon reaksiyonları bu grupta artmaktadır.

Dolayısıyla tek başlarına antioksidan özelliği olan bazı maddeler, başka kimyasal yapılar ile birlikte verildiğinde oksidan etki oluşturabilir. Bu bakımdan, antioksidanların rastgele kullanılmaması ve verilen diğer kimyasallar (ilaç dahil) ile her hangi olumsuz etkilerinin olup olmadığının mutlaka önceden araştırılmış olması gereklidir.

Bütün bu değerlendirmelerle birlikte, NDEA ve Ellajik asitin oksidan/antioksidan sisteme etkisiyle ilgili ve enzimlerle başta kinetik olmak üzere daha ileri çalışmaların yapılması bu konuda aydınlatıcı olacaktır.

8. ÖZET

**N-Nitrozodietilamin'in (NDEA) Rat Kalp Dokularında Adenozin
deaminaz, Ksantin oksidaz, nitrik oksit metabolizması ve Oksidan /
Antioksidan Sistemde Görev Alan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisinin
Araştırılması:
Ellajik Asidin Etkisi**

N-nitrozodietilamin (NDEA) insan sağlığına da zararlı olduğu bilinen toksik bir maddedir. Nitrozaminler özellikle N-nitrozodietilaminler (N-NDEA) çevresel ortamlarda yaygın olarak bulunabilmekte ve güneş ışığında kolayca yıkılmaktadırlar. Çevre ortamındaki N-nitrozo bileşikleri ile nitrat ve nitrit gibi bunların ön maddeleri vücuda alındıktan sonra kanser oluşumuna sebep olan nitrozaminler gibi toksik ürünler oluşturmaktadırlar.

Ellajik asit, antioksidan, antiproliferatif ve antiaterojenik etkilere sahip bir polifenoldür. Ayrıca, EA nitrozaminler, azoksimetanlar, mikotoksinler ve polisiklik aromatik hidrokarbonları içeren çeşitli karsinogenlere karşı kemoprotektif özelliklere sahiptir. EA'nın meme kanser hücrelerinde apoptozis'i indükleyerek ve anjiogenezi düzenleyerek kanser hücre büyümesini inhibe etmektedir. Buna ilave olarak, ellagic asitin DNA hasarını önleyici ve tamir edici etkisine dair çalışmalar da vardır.

Tez çalışmamızda serbest radikal aracılıklı DNA hasarına yol açarak, çeşitli organ ve dokularda karsinogeneze sebep olduğu bilinen N-nitrozodietilamin'in rat kalp dokularında ADA ve XO gibi enzim aktiviteleri ile antioksidan enzimlerden SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri ile lipid peroksidasyonu göstergesi olarak bilinen MDA seviyeleri araştırılmıştır. Ayrıca fitokimyasal bir madde olan Ellajik Asidin (EA) profilaktik ve tedavi edici etkileri'nin olup olmadığı incelenmiştir.

Araştırmada rastgele ve her grupta 6 adet rat olmak üzere; Kontrol, N-nitrozodietilamin (NDEA), Ellajik asit, N-nitrozodietilamin (NDEA) + Ellajik asit (Eşzamanlı) ve N-nitrozodietilamin (NDEA) + Ellajik asit (Pre) olmak üzere 5 çalışma grubu oluşturulmuştur. Deney sonunda hayvanlar anestezi altında sakrifiye edilerek, her bir gruptaki rat kalp dokularına ait süpernatantlarda Adenozindeaminaz (ADA), Ksantin oksidaz (XO), Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px), Superoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ve nitrik oksit sentaz (NOS) enzim aktiviteleri ile MDA ve NO seviye analizleri yapılmıştır.

N-nitrozodietilamin'in kalp dokusunda lipid peroksidasyonuna sebep olarak MDA seviyelerinde kısmi artışlar yaptığı, ADA enzim aktivitesinde anlamlı bir değişikliğe sebep olmadığı, ancak XO enzim aktivitesinde kontrole göre yükselmelere sebep olduğu görülmüştür. Ellajik asit ise kalp dokusunda kısmi bir antioksidan etki göstermektedir. Buna karşılık NDEA ve EA birlikte verildiğinde bilhassa katalaz (CAT) aktivitesindeki düşmeye bağlı olarak oksidan stres gelişmekte ve oksidasyon reaksiyonlarını artırmaktadır. NDEA verilmesi ile veya EA'nın tek başına veya NDEA ile birlikte verilmesi ile nitrik oksit metabolizmasında anlamlı değişimler meydana gelmemiştir. Bu bakımdan NDEA'nın yıkıcı etkileri NO metabolizmasından bağımsız olarak meydana gelmektedir.

Bu sebeple, tek başlarına antioksidan özelliği olan bazı maddeler, başka kimyasal yapılar ile birlikte verildiğinde oksidan etki gösterebilir. Bu bakımdan, antioksidanların rastgele kullanılmaması ve verilen diğer kimyasallar (ilaç dahil) ile her hangi olumsuz etkilerinin olup olmadığının mutlaka önceden araştırılmış olması gereklidir.

Anahtar Kelimeler: N-nitrozodietilamin, ellajik asit, kalp, oksidan/antioksidan sistem, adenozin deaminaz, ksantin oksidaz, nitrik oksit, nitrik oksit sentaz.

9. SUMMARY

**Investigation of the effects of N-Nitrosodiethylamine on the
activities of adenosine deaminase and xantine oxidase enzymes,
nitric oxide metabolism and on oxidant / antioxidant system in rat
heart tissue:
Effects of ellagic acid**

N-nitrosodiethylamine (NDEA) is a toxic chemical for human beings. Nitrosamines, in particular N-nitrosodiethylamine (NDEA) is very common chemical which is easily destroyed when exposed to sun shine. Environmental nitroso compounds and their precursors like nitrate and nitrit lead to carcinogen nitrosamines after digestion in gastrointessinal system.

Ellagic acid (EA) is a polyphenol having antioxidant, antiproliferative and antiatherogenic activities. Additionally, ellagic acid has chemoprotective poperties against various carcinogens like nitosamines, azoximetans, micotoxins and polycyclic hydrocarbons. Ellagic acid inhibits cellular proliferation by inducing apoptosis and regulating angiogenesis. There are also studies on the preventive and repairing potentials of ellagic acid on DNA damages.

In our research, the effects of N-nitrosodiethylamine (NDEA) on key enzymes of purine metabolism, namely adenosine deaminase (ADA) and xanthine oxidase (XO) enzymes, on nitric oxide metabolism namely, NO level and NOS activity, and on free radical-metabolising enzymes namely superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were studied in the rat heart tissues. Malondialdehyde (MDA) level was studied as an index of peroxidation in the heart tissue. Furthermore, potential prophylactic and curative activities of ellagic acid which is a phytochemical substance was studied.

In the research, there were 5 groups. In each group, there were 6 animals. One of them is control group. Others are EA group, simultaneous NDAE+EA group and pre NDAE+EA group. After the end of the study, animals were sacrificed and their hearts were removed to be used in the analyses, which are performed in the supernatant fraction of the material.

It has been established that NDEA causes relative increases in the MDA levels of the heart tissue, no change in the ADA activity and an increase in the XO activity. EA is found to exhibit antioxidant activity in part. However, when given EA and NDEA together, it has been established that an oxidant stress occurs possibly due to the decrease in CAT activity, which leads to further oxidation reactions. No changes were however observed in NO level and NOS activity values among the groups, indicating that harmful effects of NDEA are not related to nitric oxide metabolism.

It has been concluded that some antioxidant substances can act as oxidant when given together with some other chemicals. Therefore, it has been recommended that antioxidant substances should not be used randomly, and that possible side effects must be investigated previously regarding their potential negative interactions with other chemicals including medicines.

Key words: N-nirosodiethylamines, ellagic acid, rat, heart, oxidant/antioxidant system, adenosine deaminase, xanthine oxidase, nitric oxide, nitric oxide sentase.

10.KAYNAKLAR

1. Gillespie MN, Pastukh V, Ruchko MV. Oxidative DNA modifications in hypoxic signaling. Ann N Y Acad Sci. 2009; 1177: 140-150.
2. Andersen JK. Oxidative stres in neurodegeneration: cause or consequence? Nat Med. 2004; 10: 18-25.
3. Bartsch H, Hietanen E, Malaveille C. Carcinogenic nitrosamines: free radical aspects of their action. Free Radic Biol Med 1989; 7 (6):637-644.
4. Sözmen EY. Yaşlanma Biyokimyası. In: Onat T, Emerk K, Sözmen EY. İnsan Biyokimyası. Ankara: Palme Yayıncılık, 2002: 665-674.
5. Dergel R. Lipid peroxsitation a common pathogenetic mechanism. Exp. Toxicol Pathol 1992; 44 (4) : 169-181.
6. Mukhtar H, Das M, Bickers D. Inhibition of 3-methyl-cholanthrene induced skin tumouri genicity in BALB/C mice by chronic oral feding of trace amounts of ellagic acid in drinking water. Cancer Research 1986;46, 2262-2265.
7. Morselli PL. Drug metabolism in vitro: Role of drug metabolism in drug disposition and effects. In: Pacifici GM, Fracchia GN (Editors). Advances in Drug Metabolism in Man. Luxenbourg: European Commission, Office for Official Publications of the European Communities, 1995: 3-34.

8. Cooney RV, Ross PD, Bartolini GL, Romseyer J. N-nitrosamine formation: Factors influencing the aqueous reactions of nitrogen oxide with morfoline. *Environ Sci* 1987; 21: 77-83.
9. Andrews AW, Lijinsky W, Snyder SW. Mutagenicity of amine drugs and their products of nitrosation. *Mutat Res* 1984; 135 (2): 105-108.
10. Gough TA, McPhail MF, Webb KS, Wood BJ, Coleman RF. An examination of some foodstuffs for the presence of volatile nitrosamines. *J Sci Food Agric* 1977; 28 (4): 345-351.
11. Hodgson E, Silver IS, Butler LE, Lawton MP, Levi PE. Metabolism. In: Hayes WJ, Laws ER. (Editors). *Handbook of Pesticide Toxicology*. Vol. 1. Academic Press, San Diego, CA, 1991; 107-143.
12. Aiub CA, Pinto LF, Felzenszwalb I. N-nitrosodiethylamine mutagenicity at low concentrations. *Toxicol Lett* 2003; 145 (1): 36-45.
13. Mirvish SS. Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Lett* 1995; 93 (1): 17-48.
14. URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/Nitrosamine>
15. Vendemiale G, Grattagliano I, Caruso ML, et al. Increased oxidative stress in dimethylnitrosamine induced liver fibrosis in the rat: effect of n-acetylcysteine and interferon-alpha. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 175 (2): 130-139.

16. Vendemiale G, Grattagliano I, Caruso ML, et al. Increased oxidative stress in dimethylnitrosamine induced liver fibrosis in the rat: effect of n-acetylcysteine and interferon-alpha. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 175 (2): 130-139.
17. Chung KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y. Tannins and human health: a Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1998; (38): 421-464.
18. Stoner G D, Mukhtar H. Polyphenols as cancer chemopreventive agent. *Journal of Biochemistry Supplement*. 1995; (22): 169-180.
19. Nixon D. Oregon canneberries; what research is revealing about red raspberries. 2002[cited 2002 Feb 25]. URL: www.oregonberries.com
20. Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I, Utsumi K. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr. Med. Chem.* 2003; 10: 2495-2505.
21. Liochev SI, Fridovich I. The Haber-Weiss cycle-70 years later: an alternative view. *Redox report*. 2002; 7: 55-57.
22. Conner EM, Grisham MB. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition*. 1996; 12: 274-277.
23. Gupta M, Dobashi K, Greene EL, Orak JK, Singh I. Studies on hepatic injury and antioxidant enzyme activities in rat subcellular organelles following invivo ischemia and reperfusion. *Mol. Cell. Biochem.* 1997; 176: 337-347.

24. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell-survival against oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* 1994; 17: 235-248.
25. Carr AC, McCall MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species-reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20: 1716-1723.
26. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-1828
27. Hitchon CA, El-Gabalawy HS. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2004; 6: 265-278
28. Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Alcohol Research and Health* 2003; 27: 277-284.
29. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Ann Rev Nutr* 1996; 16: 33.
30. Sen CK, Packer L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *American Journal of Clinical Nutrition* 2000; 72: 653-669.
31. Agrawal A, Kale RK. Radiation induced peroxidative damage mechanism and significance. *Indian Journal Experimental Biology* Apr 2001;39: 291.
32. Ceballos PI, Trivler JM, Nicole A. Age-correlated modification of copper-zinc superoxide dismutase and glutathione related enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical Chemistry* 1992; 38-66.

33. Diplock, A. 1998. Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series, 59p., Belgium.
34. Kaur, C. And Kapoor, H.C. 2001. Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health. *Int. J. Food Sci. Tech.* 36; 703-725.
35. Elgün S. Enzimler. In: Elgün S, ed. *Tıbbi Biyokimya*. Ankara: Art Ofset Matbaacılık, 2004: 160-162.
36. Heinrich, Peter; Georg Löffler; Petro E. Petrides (2006). *Biochemie und Pathobiochemie (Springer-Lehrbuch) (German Edition)*. Berlin: Springer. pp. 123. ISBN 3-540-32680-4.
37. Gardner PR, Raineri I, Epstein LB, White CW (June 1995). "Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells". *J. Biol. Chem.* 270 (22): 13399–405. doi:10.1074/jbc.270.22.13399. PMID 7768942.)
38. Landis GN, Tower J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech. Ageing Dev.* 2005; 126: 365-379.
39. Fujii J, Iuchi Y, Okada F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod Biol* 2005; 3: 43.
40. Burtis CA, Ashwood AR, Bruns DE. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 4th ed. St Louis: Elsevier Saunders;2006.

41. Hamed R, Farid NM, Elowa SHE, Abdalla AM. Glutathione related enzyme levels of freshwater fish as bioindicators of pollution. *The Environmentalist* 2003; 23: 313-322.
42. Kojo S. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 2004; 11: 1041-1064.
43. Pryor WA. Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Rad. Biol. Med.* 2000; 28: 141-164.
44. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesì C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.* 2005; 16: 577-586.
45. Pompella, A; Visvikis, A; Paolicchi, A; De Tata, V; Casini, AF (2003). "The changing faces of glutathione, a cellular protagonist". *Biochemical Pharmacology* 66 (8): 1499–503.
46. Schroeter H, Boyd C, Spencer JPE, Williams RJ, Cadenas E, Rice-Evans C. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol. Aging.* 2002; 23: 861-880.
47. Stocker R. The ambivalence of vitamin E in atherogenesis. *Trends Biochem Sci.* 1999; 24: 219-223.
48. Schrauzer GN. Anticarcinogenic effects of selenium. *Cell. Mol. Life Sci.* 2000; 57: 1864-1873.

49. Shah AM, Channon KM. Free radicals and redox signalling in cardiovascular disease. *Heart*. 2004; 90: 486-487.
50. URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/Malondialdehyde>
51. Hille R (2005). "Molybdenum-containing hydroxylases". *Arch. Biochem. Biophys.* 433 (1): 107–16.
52. Harrison R (2002). "Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?". *Free Radic. Biol. Med.* 33 (6): 774–97.
53. Dawson J, Walters M (October 2006). "Uric acid and xanthine oxidase: future therapeutic targets in the prevention of cardiovascular disease?". *British Journal of Clinical Pharmacology* 62 (6): 633.
54. R. M. Smillie, *Arch. Biochem.* 67, 213 [1957].
55. W. K. Jordan, R. March, O. B. Houchin & E. Popp, *J. Neurochem.* 4, 170 [1959].
56. T. G. Brady & C. I. O' Donovan, *Biochem. J.* 80, 17 [1961].
57. B. Galanti & G. Giusti, *Minerva Med.* 59-II, 5867 [1968].
58. G. Giusti, *Pol. Arch. Med. Wewn.* 44, 524 [1970].
59. Goldberg, DM. : Serum Adenosine Deaminase in the Differential Diagnosis of Jaundice. *Brit Med J.* 1995 1 : 353-355.

60. SOLOMON, JB. : Constitutive Enzymes of the; Developing Chick Embryo:Adenosine Deaminase. *Biochem J.* 1959 75 : 278-284.
61. Daddona, P.E., Orkin,S.H., Shewach,D.S and Kelley, W.N.: cDNA and Aminoacid Squence of Human Adenosine Deaminase. *Ann.N.Y. Acad.Sci.* 1985; 451:238-244.
62. Wilson, D.K., Rudolph, F.B., Quijcho, F.A.: Atomic Structure of Adenosine Deaminase Complexed with Transition-State Analge: Understanding Catalysis and Immunodeficiency Mutations. *Science.* 1991 252:1278-1284.
63. Crigg, Gordon; Johansen, Kjell (1987). "Cardiovascular Dynamics In Crocodylus Porosus Breathing Air And During Voluntary Aerobic Dives". *Journal of Comparative Physiology B (Springer-Verlag)* 157 (3): 381-392. Archived from the original on July 3, 2012. Retrieved July 3, 2012.
64. Romer, Alfred Sherwood; Parsons, Thomas S. (1977). *The Vertebrate Body*. Philadelphia, PA: Holt-Saunders International. pp. 437–442.
65. Pratiyogita Darpan (April 2009). *Competition Science Vision*. Pratiyogita Darpan. pp. 55—. Retrieved 7 June 2012.
66. Axelsson, Michael; Craig, Franklin; Löfman, Carl; Nilsson, Stefan; Crigg, Gordon (1996). "Dynamic Anatomical Study Of Cardiac Shunting In Crocodiles Using High-Resolution Angioscopy". *The Journal of Experimental Biology (The Company of Biologists Limited)* 199: 359-365. PMID 9317958. Retrieved July 3, 2012.

67. Maton, Anthea; Jean Hopkins, Charles William McLaughlin, Susan Johnson, Maryanna Quon Warner, David LaHart, Jill D. Wright (1993). Human Biology and Health. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice Hall.
68. Marieb, Elaine Nicpon. Human Anatomy & Physiology. 6th ed. Upper Saddle River: Pearson Education, 2003.
69. Steptoe A, Kivimäki M (April 2012). "Stress and cardiovascular disease". Nat Rev Cardiol 9 (6): 360–70.
70. Van de Werf F, Bax J, Betriu A, et al. (December 2008). "Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology". Eur. Heart J. 29 (23): 2909–45.
71. World Health Organization (2008). The Global Burden of Disease: 2004 Update. Geneva: World Health Organization.
72. Lowry O, Rosenbrough N, Farr L, Randall R. Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 182: 265-275.
73. Van Ye TM, Roza AM, Pieper GM, Henderson J Jr, Johnson JP, Adams MB. Inhibition of intestinal lipid peroxidation does not minimize morphological damage. J Surg Res 1993; 55:553-558.
74. Hashimoto S. A new spectrophotometric assay method of xanthine oxidase in crude tissue homogenate. Anal Biochem. 1974; 62: 425-435.
75. Aebi H. Catalase. In: Bergmayer HU, ed. Methods of Enzymatic Analysis. New York and London: Academic Press Inc., 1974: 673-677.

76. Durak İ, Canbolat O, Kavutcu M, Öztürk HS, Yurtarslanı Z. Activities of total, cytoplasmic and mitochondrial superoxide dismutase enzymes in sera and pleural fluids from patients with lung cancer. J Clin Lab Anal. 1996; 10: 17-20.
77. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med. 1967; 70: 158-169.
78. Çakmak Ö, İşleyen A, Usca A. [N-Nitroso Compounds and their Effects on Public Health]. TAF Prev Med Bull. 2009; 8(6): 521-526.
79. "Experimental and Toxicologic Pathology" Volume 59, Issue 6, 3 April 2008, Pages 409–414.
80. "Experimental and Toxicologic Pathology" Volume 59, Issue 6, 3 April 2008, Pages: 409–414
URL:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0940299307001030>
81. "Chemico-Biological Interactions" Volume 156, Issues 2–3, 20 October 2005, Pages: 101–111
URL:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279705001857>
82. ARTICLE: Year : 2006 | Volume : 13 | Issue : 1 | Page : 39-42
"Experimental study on acute toxic effects of N-nitrosodiethylamine in rats"
Vanita Kaushal¹, APS Brar², Giridhar Soni¹
¹ Department of Biochemistry and Chemistry, Punjab Agricultural University, Ludhiana-141004, India

URL: <http://www.toxicologyinternational.com/article.asp?issn=0971-6580;year=2006;volume=13;issue=1;spage=39;epage=42;aulast=Kaushal;type=0>

83. Karahan I, Yılmaz S. Ratlarda bazı Nitrosoaminlerin düşük miktarda uzun süreli verilmesinin kan, karaciğer ve böbreklerde oksidatif stres üzerine etkileri. F.Ü.Sağlık Bil. Dergisi 2006,20(1):73-78.

84. Sivaramakrishnan V, Shilpa PN, Kumar VR, Devaraj SN. Attenuation of N-nitrosodiethylamine-induced hepatocellular carcinogenesis by a novel flavonol-Morin. Chemico-Biological Interactions 2008;171:79-88.

85. Khanduja KL, Gandhi RK, Pathania V, Syal N. Prevention of N-Nitrosodiethylamine induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice. Food and Chemical Toxicology 1999; 37:313-318.

86. Molina MF, Sanchez-Reus I, Iglesias I, Benedi J. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. Biol Pharm Bull 2003; 26: 139-140.

87. Guisti G. Adenosine Deaminase. In: Methods of Enzymatic Analysis, 2nd Ed. Bergmeyer HV. New York, Academic Press, 1974;1092-1099.

10. EKLER

EK-1

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince

Değerli bilgilerini esirgemeyen, Tıbbi Biyokimya ABD başkanı
Sayın Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU'na

Tez konumun belirlenmesinde ve çalışma evresinde desteğini,
bilgisini, sabrını esirgemeyen tez danışman hocam
Sayın Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU'ya

Eğitimim boyunca bilgi, destek ve yardımlarını esirgemeyen
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki bütün
hocalarıma teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarımda destek ve bilgileriyle yanımda olan
tüm Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Dalı hocalarına ve
asistanlarına,

Desteklerini esirgemeyen, her zaman arkamda olup bana hep
güvenen çok sevdiğim annem, babam ve kardeşlerime,

En içten teşekkür ve sevgilerimle.

Zahide Esra DURAK

11.ÖZGEÇMİŞ

Zahide Esra DURAK

Doğum Tarihi : 28.08.1985

Doğum Yeri : Ankara

Uyruğu : T.C.

Eğitim Durumu :

- | | |
|-------------|--|
| 2009 - 2012 | Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki doktora yeterlilik
sınavımı verdim. |
| 2007 – 2009 | Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı'nda Tezli Yüksek Lisans |
| 2003 – 2007 | Gazi Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi
1 sene İngilizce hazırlıktan sonra Kimya Mühendisliği
Bölümü |
| 1998 – 2003 | Özel Sevgi Lisesi (Ankara)
Orta ve lise öğretim |
| 1996 – 1998 | Ankara Üniversitesi Özel Lisesi (Ankara)
1sene İngilizce hazırlık ve ortaokul 1. Sınıf öğretimi |
| 1991– 1996 | Ulubatlı Hasan İlköğretim Okulu (Ankara)
İlköğretim |

Yabancı Diller : İngilizce

(İyi Seviyede)

**Staj : (2007) Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü
İlaç ve Kozmetik (Ankara)**

İlaç ve Kozmetik Bölümünde yaz stajı

(2008) **ÜLKER A.Ş (Ankara)**

Ülker Birlik A.Ş Un ve Bisküvi Fabrikasında yaz stajı