

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KURŞUN ARACILI DOKU HASARINDA
FLAVONOİDLERİN ROLÜ**

Ceylan KAVAS

**Şubat,2008
İZMİR**

**KURŞUN ARACILI DOKU HASARINDA
FLAVONOİDLERİN ROLÜ**

Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Bölümü

Ceylan KAVAS

Nisan 2008,

İZMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

CEYLAN KAVAS, tarafından YRD. DOÇ. DR. M. NALAN TÜZMEN yönetiminde hazırlanan “KURŞUN ARACILI DOKU HASARINDA FLAVONOİDLERİN ROLÜ” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Nalan TÜZMEN

Danışman

Prof. Dr. Filiz KÜÇÜKSEZGİN

Doç. Dr. Sinan AKGÖL

Jüri Üyesi

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Cahit HELVACI

Müdür
Fen Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Bu alıŐma, Dokuz Eylöl Üniversitesi Fen Edebiyat Faköltesi Kimya Bölümü Öğretim Üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Nalan TÜZMEN yönetiminde hazırlanarak, Dokuz Eylöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuŐtur.

Çalışmanın her aşamasında desteğini gördüğüm ve yüksek lisans tezimi yöneten danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Nalan TÜZMEN' e, tez süresince benden yardımlarını asla esirgemeyen öğretim üyesi Sayın Nilgün CANDAN' a sonsuz saygı ve Őükranlarımı sunarım.

Tez çalıŐmalarım süresince benden yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Nazan DEMİRYAS, Serdar HASARCI, Tölden KALBURCU ve Burak USANMAZ' a teşekkürlerimi borç bilirim.

Yoğun çalıŐmalarım sürece bana her konuda destek veren anlayıŐ gösteren canım annem ve babama sonsuz teşekkürler.

Ceylan KAVAS

EFFECTS OF THE FLAVONOIDS ON THE LEAD INDUCED TISSUE DAMAGE

ABSTRACT

Oxidative stress refers to the undue oxidation of biomolecules leading to cellular damage, and it is carried out by reactive oxygen species (ROS). Oxidative damage contributes deleterious effects; it may affect the DNA, which can lead to nucleotide oxidation and dimerization and it may alter structural protein function or change the tertiary structure of enzymes. The ratio between generation and detoxification of ROS requires keeping fixed and there have been several defense systems in metabolism via function different mechanisms for this balance. Nevertheless, endogenous and exogenous triggers may cause the overproduction of ROS or the impairment of these antioxidant defense systems, therefore leading to oxidative stress.

In this study, the roles of flavonoids, the delay of destruction and the removal of oxidative stress which will take place in the rats liver with the toxicity of Pb were investigated. In these inactivation mechanisms, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase enzyme activities alterations which have antioxidative effects via removing of deleterious effects of free radicals and lipid peroxidation levels were determined.

In conclusion, it can be said that Pb at the treatment and over doses can lead to oxidative liver damage via triggering free radical production. Impaired oxidant/antioxidant balance can be partially responsible for the toxic effects of lead. Restoration of the cell antioxidant capacity appears to provide a partial remedy against lead-induced oxidative stress. Curcumin and tannic acid can abate the oxidative insult by restoring the altered lead sensitive biochemical variables. So, the results from our study suggest that treated flavonoids can be effective on prevention/elimination of radicalic damage and that eating up flavonoids riched diets can be useful to minimize toxicities of the metal. Further studies should be done to explain mechanisms of beneficial effects of these flavonoids.

Key Words: Free Radical, Antioxidant Enzyme, Lipid Peroxidation, Lead, Flavonoid.

KURŞUN ARACILI DOKU HASARINDA FLAVONOİDLERİN ROLÜ

ÖZ

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) biyomoleküllerdeki aşırı oksidasyonu sonucu, nükleotid oksidasyonu veya dimerizasyonu DNA' da mutasyonlara ve yapısal proteinlerin fonksiyonlarının ya da enzimlerin kuaterner yapılarının değişimi sonucu hasara neden olan bir süreçtir. ROS' ların üretimi ve detoksifikasyonu arasındaki oranın sürekli sabit kalması gerekmektedir ve bu oranı koruyabilmek üzere metabolizmada farklı mekanizmalarla çalışan çeşitli savunma sistemleri gelişmiştir. Ancak, endojen ve ekzojen tetikleyiciler ya ROS ların aşırı üretimine ya da bu antioksidan savunma sisteminin bozulmasına yol açarak prooksidan/antioksidan dengesinin bozulmasına ve dolayısıyla oksidatif strese neden olurlar.

Bu çalışmada, kurşun aracılı olarak farelerin karaciğer dokularında oluşturulan oksidatif stresin giderilmesinde veya yıkımın geciktirilmesinde flavonoidlerin rolleri araştırılmıştır. Bu etkisizleştirme mekanizmalarında; serbest radikallerin zararlı etkilerini gideren antioksidan etkiye sahip süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin aktivite değişimleri ile lipit peroksidasyonu düzeylerindeki değişimler incelenmiştir.

Sonuç olarak, kurşunun uygulanan doz ve dolayısıyla üzerindeki dozlarda, serbest radikal oluşumunu tetikleyerek oksidatif karaciğer hasarına yol açabileceğini söyleyebiliriz. Bozulan oksidan/antioksidan denge, kurşunun toksik etkilerinden kısmen sorumlu tutulabilir. Hücrelerin antioksidan kapasitesinin restorasyonu, kurşun aracılı oksidatif strese karşı kısmi bir çözüm üretebilir. Kürkimin ve tannik asit kurşun duyarlı biyokimyasal değişkenleri restore ederek oksidatif hasarı azaltabilir. Dolayısıyla, bu çalışmanın ışığında, uygulanan flavonoidlerin radikalik hasarı önleme/gidermede etkin olabileceğini ve bu nedenle de söz konusu metallerin toksisitesini azaltmak için flavonoidlerce zengin besinlerin tüketilmesinin faydalı olabileceğini söyleyebiliriz. Ancak bu flavonoidlerin faydalı etkilerinin mekanizmalarının aydınlatılması için ilave çalışmalar yapılmalıdır.

Anahtar Sözcükler: Serbest Radikal, Antioksidan Enzim, Lipid Peroksidasyonu, Kurşun, Flavonoid.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ABSTRACT	iv
ÖZ	vi

BÖLÜM BİR - GİRİŞ

1

1.1 Oksidatif Stres	1
1.2 Serbest Radikaller	2
1.2.1 Serbest Radikallerin Oluşumu	3
1.2.2 Oksijen Radikalleri	4
1.3 Reaktif Oksijen Türleri	5
1.3.1 Süper Oksit Anyon Radikali	5
1.3.2 Hidrojen Peroksit	7
1.3.3 Hidroksil Radikali	9
1.3.4 Singlet Oksijen	10
1.4 Serbest Radikal Kaynakları	11
1.5 Vucudun Antioksidant Savunma Mekanizması	14
1.5.1 Enzimatik Antioksidantlar	17
1.5.1.1 Süper oksit Dismütaz	17
1.5.1.2 Katalaz	18
1.5.1.3 Glutasyon Peroksidaz	19
1.5.1.4 Glutasyon S-transferaz	20
1.5.1.5 Mitokondriyal Sitokrom	21
1.5.2 Non-Enzimatik Antioksidantlar	21
1.5.2.1 Glutasyon	21
1.5.2.2 E-Vitamini	24
1.5.2.3 A-Vitamini	25
1.5.2.4 C-Vitamini	25
1.5.2.5 Flovonoidler	26

1.5.2.5.1 Kürkimin	27
1.5.2.5.2 Tannik Asit	29
BÖLÜM İKİ - MATERYAL VE METHOD	31
2.1 Materyal	31
2.1.1 Deney Hayvanlarının Gruplandırılması	31
2.1.2 Doku numunelerinin hazırlanması	33
2.1.3 Kullanılan malzeme ve cihazlar	34
2.1.4 Kullanılan kimyasal malzemeler	34
2.1.5 Kullanılan kimyasal çözeltiler	36
2.2 Metod	37
2.2.1 Süperoksit dismutaz tayini	37
2.2.2 Glutasyon peroksidaz tayini	37
2.2.3 Katalaz Tayini	39
2.2.4 Lipid peroksidasyonu tayini	39
BÖLÜM ÜÇ - DENEY SONUÇLARI	41
BÖLÜM DÖRT - TARTIŞMA	44
KAYNAKLAR	48
EKLER	63

BÖLÜM BİR

GİRİŞ

1.1 Oksidatif Stres

Oksidasyon yani yükseltgenme, bir atom ya da molekülün bir alıcıya elektron verme prosesidir. Vücudumuzdaki ve besinlerdeki lipidler, karbonhidratlar, proteinler, nükleik asitlerde oksidasyona uğrayabilmekte ve canlı organizma için zararlı olabilecek oksidasyon ürünleri oluşturabilmektedir. Bu durum yaygın olarak oksidatif stres şeklinde ifade edilmektedir. Oksidatif stres, serbest radikal üretimi ve hücrelerin serbest radikallerin yıkıcı etkilerine karşı koyabilme yetileri arasındaki sitopatolojik zincirleri ifade eder (Simonian ve Coyle, 1996). Reaktif oksijen bileşiklerinin herhangi bir nedenle aşırı oluşumu veya antioksidan savunma sistemi ve onarım sistemlerindeki yetersizlikler sonucu oksidatif stres gelişir (Kökoğlu, 1998). Oksidatif stres, serbest radikaller üretildiğinde artar, serbest radikallerin temizlenmesiyle veya oksidatif modifiye moleküllerin onarımıyla azalır. Oksidatif stresin kronikleşmesi, hücrelerde prooksidan-antioksidan dengenin bozulmasına ve oksidatif hasarın başlamasına neden olur. Bu dengesizlik, hücresel disfonksiyona ve hücre ölümüne neden olabilen oksidatif modifiye moleküllerin yaplanmasıyla sonuçlanır (Reiter, 1998). Oksidatif etki genelde proteinlerin modifikasyonu, mitokondrial fonksiyon bozukluğu, lipid peroksidasyonunun ve DNA'daki hasarın artması şeklinde gözlenmektedir.

Zararlı süreçlerin bazıları, çoğu canlının yaşadığı çevresel şartların kaçınılmaz sonucudur. %20 oksijen (O₂-dioksijen) içeren atmosfer, bu ve ilgili moleküllerin oksitleme potansiyellerinden dolayı oldukça zararlıdır. Reaktif oksijen türleri (ROS) veya ara ürünleri olarak karakterize edilen bu moleküller, gerekli molekülleri yıkıma zorlar (Beckman ve Ames, 1997). Hücre içi serbest radikal kaynakları olan mitokondriyal oksidatif metabolizma, nitrik oksit, fosfolipid metabolizması ve proteolitik geçiş yolları, oksidatif strese katkıda bulunur. Çoğu canlı türünün yaşadığı oksidatif çevrede yaşamın sürdürülmesi için, bu canlı türlerinin, oksijence zengin

çevrenin zararlı etkileri ile mücadele edebilecek moleküler araçlarla donatılması gerekir.

Organizmalar, oksidasyona karşı direnç sağlayan antioksidan olarak ifade edilen moleküllere sahiptirler (Sies 1993; Sies ve Stahl 1995). Antioksidatif savunma sistemi diye adlandırılan bu kompleks süreç, genç organizmalardaki çoklu oksidatif reaksiyonlarda dengeyi sağlamak için az veya çok elverişlidir; ancak, yaş ilerledikçe veya organizmalar toksin ve/veya serbest radikal üreten reaktiflere maruz kaldıklarında, antioksidatif savunmalar işlevlerini yapamazlar ve sonuç olarak, ilgili hastalıklar ve yaşlanma belirtileri ortaya çıkar (Bourg, 2001). Bu nedenle, serbest radikal bağlantılı hastalıklara karşı koyabilmenin sırrı, organizmaların yaşam boyunca oksidatif süreçlerin bir sonucu olarak oluşan moleküler bozunmaya karşı koyabilme yeteneklerine bağlıdır (Atlante ve ark. 2001; Reiter ve ark. 1996; Touitou 2001).

1.2 Serbest Radikaller

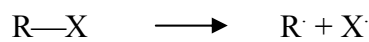
Moleküllerin çoğu çift elektronlu, az sayıdaki molekül ise tek elektronludur. Atom veya moleküller, yörüngelerindeki elektronlar eşleşmiş ve ters pozisyonda yer aldıklarında kararlı bir yapı gösterirler. Bu kararlı yapı eşleşmemiş elektron bulduklarında bozulur (Halliwell 1987; Basaga 1990; Di Mascio ve ark. 1991; Fırat, 1997). Tek, yani eşleşmemiş elektronlu olan bu moleküller, bulabilecekleri herhangi bir molekül ile etkileşime girerler. Bu eşleşmemiş elektronlu moleküllere "serbest radikaller", "oksidan moleküller" ya da "reaktif oksijen türleri" denir (Halliwell ve Chirico, 1993). Kısaca serbest radikaller; bu şekilde atomik veya moleküler yörüngesinde bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş "elektron" bulduran basit bir molekül, atom veya iyondur. (Yanbeyi, 1999). Serbest radikaller bu ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktif olup, çevrelerindeki atom ve moleküllere adeta saldırırlar. Çok kısa ömürlü olmalarına karşın, radikal olmayan maddeler ile reaksiyona girip onları da radikal yapmaları ve bir dizi zincir reaksiyonu başlatıp, birçok radikal oluşturmalarından dolayı oldukça tehlikelidirler.

Biyolojik sistemler için oldukça reaktif ve toksik maddeler olan serbest radikaller, oksijenin toksik etkisinin gerçek nedenini oluştururlar. Serbest radikal, eşleşmemiş tek elektronunu bir başka moleküle vererek onu indirgeyebilir ya da bir başka molekülden elektron alıp onu yükseltgeyerek yapısında yeni bir elektron çifti oluşturabilir. İki serbest radikalın tepkimesi sonucunda radikal özellik ortadan kalkar. Ancak bir radikal, radikal olmayan bir moleküle tepkimeye girerse başka bir radikal oluşur. Bu özellik, radikallerin zincir tepkimelerde rol oynamasına neden olur. ROS, özellikle OH[·] ve ONOO⁻, lipid, protein ve DNA'da fonksiyonel değişikliklere neden olabilir. Poli doymamış yağ asitlerinde moleküler oksijen, OH[·], H₂O₂, peroksil ve alkoksil radikallerini içeren ROS' un olduğu bir zincir reaksiyonunu başlatır. Lipid peroksidasyonu olarak adlandırılan oksidatif lipid hasarı, membran akışkanlığında ileri derecede kayba neden olur, membran potansiyelini indirger ve Ca²⁺ gibi iyonların geçirgenliğini artırır. Sonuçta hücre ölümü gerçekleşir (Reiter, 1998).

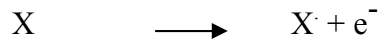
1.2.1 Serbest Radikallerin Oluşumu

Serbest radikaller üç şekilde oluşabilir (Cheeseman ve Slater, 1993 ; Akkuş, 1995; Bast ve ark. 1997).

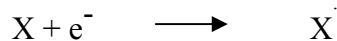
1- Kovalent bağı oluşturan elektronlardan birinin bağı atomlarından birinde, diğerinin ötekisinde kalmasıyla sonuçlanan homolitik bağ kırılmasıyla



2- Bir molekülden bir elektronun ayrılmasıyla



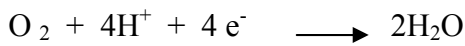
3- Bir moleküle bir elektronun katılmasıyla



Radikaller aerobik hücrelerin tüm fraksiyonlarında, metabolizma sırasında veya patolojik durumlarda birer yan ürün olarak meydana gelebilir ve hücrelerde tersinir ya da tersinmez değişikliklere neden olabilirler. Bu değişiklikler oksidasyon, fragmentasyon, köprüleşme (disülfid bağlantısı, protein-protein bağlantısı, protein-lipid bağlantısı), protein sarmalında kesilme, floresans şeklinde olur. Bunun

sonucunda ciddi hücre, doku ve/veya organ hasarı meydana gelebilir (Ames ve ark, 1993; Yanbeyi, 1999).

Hücrelerde en büyük serbest radikal kaynağı, elektron transport zincirinden elektron sızıntısıdır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondrial süperoksit radikali üretimi artar. İnsan hücrelerine giren oksijenin %90'ından fazlası, mitokondrial sitokrom oksidaz tarafından enerji üretimi için kullanılır; iki su molekülünün oluşumu ile sonuçlanan bu işlemler süresinde, her bir oksijen molekülü 4 e⁻ ilavesiyle indirgenir.

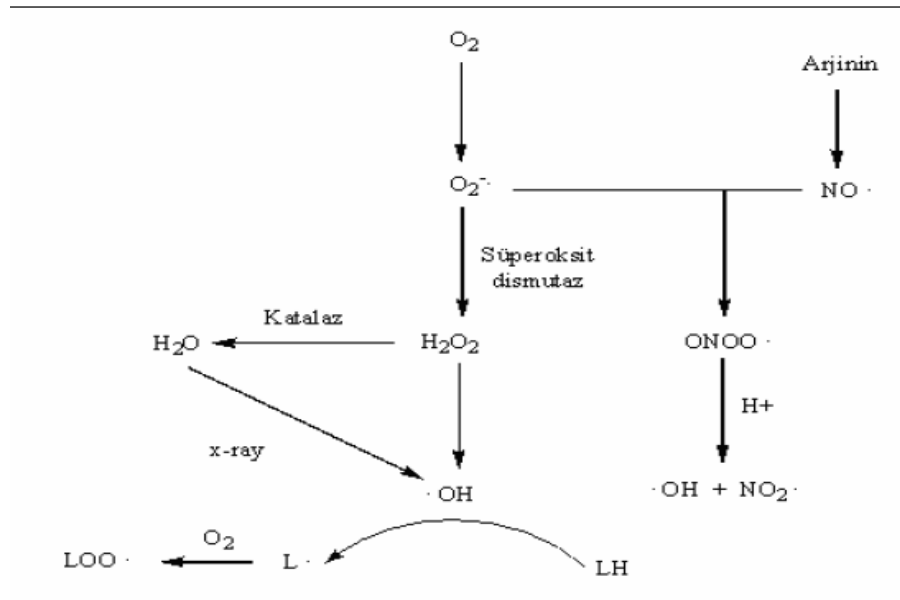


Ancak, hücre içine alınan oksijenin tahminen %1-4'ünün kısmen indirgenmiş oksijen türlerine yani reaktif oksijen türlerine (ROS) dönüştüğü bilinmektedir (Floyd, 1999). Elektron transport zincirinden kaynaklanan bu elektron kaçağının yanında peroksizomlarda lokalize olan flavin oksidaz gibi bir dizi enzim de süperoksit anyonu ya da hidrojen peroksit oluşturabilir. Hayvan hücrelerinde süperoksidin bir diğer kaynağı da askorbik asit, tiyoller, adrenalin ve flavin koenzimleri gibi moleküllerin otooksidasyonudur. (Luza ve Speisky, 1996; Halliwell ve Gutteridge, 1989).

1.2.2 Oksijen Radikalleri

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşmuş radikallerdir (Cheeseman ve Slater, 1993; Akkuş, 1995). Moleküler oksijen, bir radikal olarak nitelendirilir, her biri farklı orbitallerde yer alan fakat aynı spin kuantum sayılarına sahip olan iki eşleşmemiş elektron içerir. Bu paralel spinli eşleşmemiş elektronlardan dolayı, moleküler oksijeninin reaktif diğer radikallere kıyasla aktifliği düşük, stabilitesi yüksektir (Fridovich, 1997; Reiter, 1998). Oksijen hem tek hem de dört elektron alarak indirgenmeye uğrayabilir. Oksijenin tek elektronlu indirgenmesi ve oksijenin suya dönüşümü esnasında birçok serbest radikal ürünü ve oldukça reaktif türler oluşur (McCord, 1974; Cheeseman ve Slater, 1993).

Anaerobik canlılar da dahil olmak üzere her canlıda toksik etkili olan doğrudan moleküler oksijen değil, oksijenin tam olmayan indirgenmesi ile oluşturulan bu oksijen radikalleridir.



Şekil 1.1 Serbest oksijen radikallerinin oluşumu (S ahl ve ark., 2002).

Tablo 1.1 Reaktif oksijen türleri (Yanbeyi, 1999)

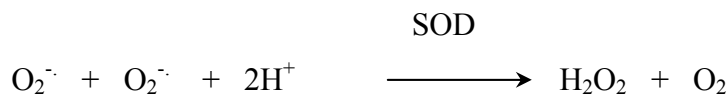
Radikaller	Radikal olmayanlar
Süperoksit radikal ($O_2^{\cdot-}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil radikal ($OH\cdot$)	Lipid hidroperoksit ($LOOH$)
Peroksil radikal ($ROO\cdot$)	Hipohalozen asit (HOX)
Alkoksil radikal ($RO\cdot$)	N-Halojenli aminler ($R-NH-X$)
Semikinon radikal ($HQ\cdot$)	Singlet Oksijen (1O_2)
Hemoproteine bağlı serbest radikaller	Ozon (O_3)
	Azotdioksit (NO_2)

1.3 Reaktif Oksijen Türleri

1.3.1 Süperoksit Anyon Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Moleküler oksijen dış orbitallerinden her biri birer elektron kabul edebilir. Bu orbitallerin tek elektron alması ile süperoksit anyonu (süperoksit radikali, $O_2^{\cdot-}$), iki

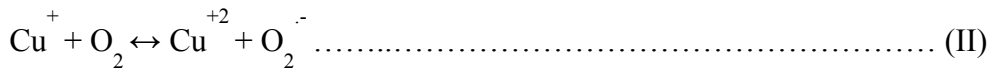
elektron alması ile de peroksi anyonu (O_2^{2-}) oluşur (Fridovich, 1975; Çakır, 1997). Süperoksit anyon radikali, aerobik biyolojik sistemlerdeki enzimatik ve enzimatik olmayan oksidasyonlar süresince oluşturulur (Donnelly, 1989). Bu radikalın ana kaynağı, mitokondrideki elektron transport zinciridir (Reiter, 1998). Diğer radikallerle kıyaslandığında süperoksit anyon radikalının reaktivitesi çok düşüktür. Ancak bu radikal, oluşumuna neden olduğu diğer radikallerle birlikte organizmada genel bir oksitleyici gibi davranmaktadır. Aynı zamanda $O_2^{\cdot-}$ 'nin, hem yükseltgen hem de indirgen özelliği vardır. Süperoksit anyonlarından birisi yükseltgen, diğeri indirgen olarak davranarak spontan dismutasyon reaksiyonuna uğrayabilir. Bu durumda, bir $O_2^{\cdot-}$ diğeriyle reaksiyona girerek H_2O_2 ve moleküler oksijen oluşturur. Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenen bu dismutasyon reaksiyonu, negatif yüklü radikaller arasındaki elektrostatik itmelerle oluşur ve reaksiyon hızı oldukça yavaştır. (Donnelly, 1989).



Mitokondriyal elektron transport zincirinden elektron iki yerde sızar. Birincisi, NADH-dehidrogenaz basamağı, ikincisi ise koenzim Q ya da ubikinon basamağıdır. En son basamakta elektronların O_2 'e taşınmasından sorumlu olan sitokrom oksidaz enzimi oksijenin % 97-99'unu harcayarak suya indirger. Fakat, O_2 'nin % 1-3'ünden, transport zincirinden sızan elektronlarla $O_2^{\cdot-}$ oluşur. Bu da yaklaşık olarak insan vücudunda her yıl iki kilogramdan fazla $O_2^{\cdot-}$ yapıldığı anlamına gelir (Mc Cord, 1984; Fırat, 1997; Dikici, 1999).

Süperoksit radikali düşük pH' larda daha etkili bir radikal olan HO_2^{\cdot} (perhidroksil) radikali meydana getirir. Fizyolojik pH' larda ise sadece % 1 kadarı protonlanmış haldedir (Cheeseman ve Slater, 1993; Dikici, 1999).

$O_2^{\cdot-}$ ile HO_2^{\cdot} reaksiyona girince, biri okside olurken diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda O_2 ve H_2O_2 meydana gelir. $O_2^{\cdot-}$ ayrıca geçiş metallere otoksidasyonu sonucunda da meydana gelebilir. Bu reaksiyonlar redoks reaksiyonları olduğu için tersine de dönebilir.

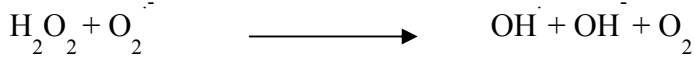


Süperoksit radikalinin fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit (NO^{\cdot}) ile birleşmesi sonucu bir reaktif oksijen türü olan peroksinitrit ($ONOO^-$) meydana gelir. Peroksinitrit, nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) oluşturmak üzere metabolize edilir. Peroksinitrit, azot dioksit (NO_2^{\cdot}), hidroksil radikali (OH^{\cdot}), nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi toksik ürünlere dönüşebilir ki nitrik oksitin (NO^{\cdot}) zararlı etkilerinden peroksinitrit sorumludur. (Akkuş,1995)

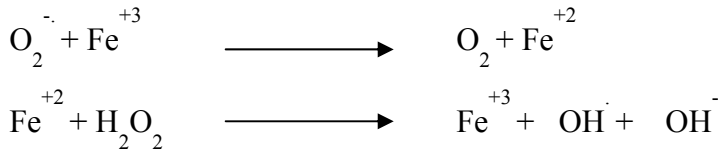
1.3.2 Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit, oksijen aracılığı ile doku hasarında rol oynayan oksijen metabolitlerinden biridir. Hidrojen peroksit, süperoksit anyonlarının dismutasyonu sırasında, ksantin-ksantin oksidaz reaksiyonunda, mitokondriyal elektron transportunda ve nötrofillerde üretilir (Chance ve ark. 1979; Halliwell ve Chirico 1993). Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit meydana gelir. H_2O_2 , küçük ve yüksüzdür; kolaylıkla hücre membranından difüze olur ve bu nedenle üretildiğinden uzak bölgelere de yayılabilir. H_2O_2 , membranlardan geçebilen uzun ömürlü oksidandır. Hidrojen peroksit, gerçek bir serbest radikal olmamasına rağmen, hidroksil radikali oluşumuna yol açabildiğinden önemli bir oksidandır. Geçiş

metallerinin varlığında Haber-Weiss veya Fenton reaksiyonları ile hidroksil radikaline ($\cdot\text{OH}$) indirgenir (Reiter 1998).



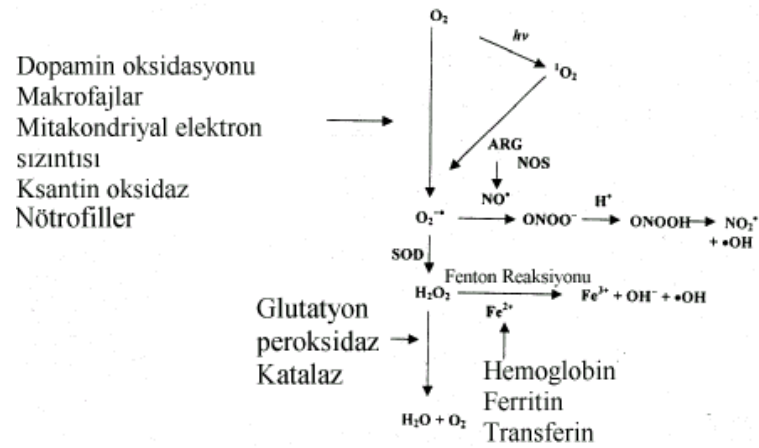
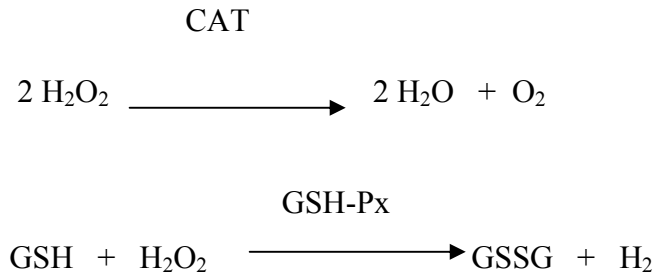
Bu reaksiyona Haber- Weiss reaksiyonu adı verilir. ‘‘Haber- Weiss’’ reaksiyonu katalizörlü veya katalizörsüz oluşabilir. Fakat, katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Katalizör olmayınca ortamdaki H_2O_2 ve $\text{O}_2^{\cdot-}$ antioksidanlar tarafından kolayca kaldırılır (Ünal, 1999; Dikici, 1999). Demir gibi geçiş metalleri ile katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır (Akkuş, 1995; Fırat, 1997; Yanbeyi, 1999). Bu reaksiyonda önce ferri demir (Fe^{+3}), süperoksit tarafından ferro demire (Fe^{+2}) indirgenir. Sonra bu ferro demir kullanılarak ‘‘Fenton Reaksiyonu’’ ile hidrojen peroksitten OH^{\cdot} ve OH^- üretilir. Reaksiyon mekanizması aşağıdaki gibidir.



(Akkuş, 1995; Bast ve ark., 1997; Fırat, 1997; Yanbeyi, 1999).

H_2O_2 üretimi, birçok bakteri türünde, fagositik hücrelerde, spermatozoda olduğu gibi hücrelerde de mitokondride, mikrozoamlarda ve kloroplastlarda olur. Mitokondride H_2O_2 bol miktarda bulunur. Aynı zamanda metal iyonları da çoktur ve dolayısıyla çok fazla hidroksil radikali üretimi söz konusudur. Bu metal katyonları, DNA veya hücre zarlarına bağlanırsa bu bölgelerde hidroksil radikali oluşumuna yol açabilir. Aynı zamanda H_2O_2 , hem gruplarını yıkarak demir açığa çıkarabilir (Reiter, 1998). Hücrelerin çoğunda H_2O_2 , iki önemli antioksidan enzimin fonksiyonuyla zararsız ürünlere dönüştürülebilir. Bunlar, katalaz (CAT) ve selenyum bağımlı glutatyon peroksidazdır (GSH-Px). GSH-Px, katalazın merkezi sinir sisteminin birçok bölgesindeki düşük aktivitesinden dolayı beyin için daha önemlidir

(Jain ve ark. 1991). GSH-Px, indirgenmiş glutatyonun (GSH) disülfidine (GSSG) dönüşümü süresince hidrojen peroksit ve hidroperoksitleri substrat olarak kullanır (Guemouri ve ark. 1991).

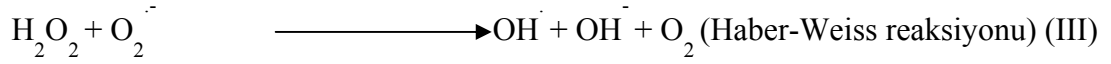
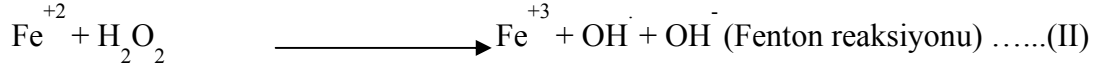
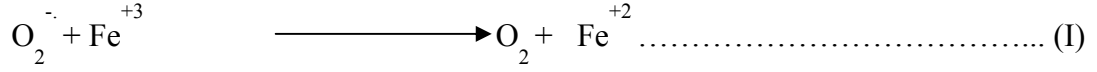


Şekil 1.2 Oksijenin kısmi indirgenmesiyle oluşan toksik türler.

1.3.3 Hidroksil Radikali (OH[•])

Hidroksil radikali, kimyada en aktif radikal olarak bilinir. Bu nedenle in vivo oluşan bir OH[•] radikali hemen her moleküle saldırır ve oluştuğu yerde de büyük hasara neden olur. Nonradikal biyolojik moleküllerle zincirleme reaksiyonları başlatır (Halliwell, 1987; Cheeseman ve Slater, 1993; Jialal ve Fuller, 1993; Akkuş, 1995; Yanbeyi, 1999). Hidroksil radikali, hidrojen peroksitin geçiş metalleri varlığında indirgenmesi ile (Fenton reaksiyonu) oluşan son derece reaktif bir radikaldir. Ayrıca hidrojen peroksitin süperoksit radikali ile reaksiyonu sonucunda da (Haber-Weiss reaksiyonu) meydana gelir. Bu reaksiyon katalizörsüz çok yavaş

olduğu halde Fe^{+3} katalizörlüğünde çok hızlı oluşur (Cheeseman ve Slater, 1993; Akkuş, 1995; Dikici,1999).



Hidroksil radikali oluşur oluşmaz üretildiği yerin birkaç Å uzaklığındaki herhangi bir molekülle reaksiyona girer. Yüksek reaktivliğinden dolayı, 37°C'da beklenen yarılanma ömrü 1×10^{-9} sn'dir. OH^{\cdot} , nükleer ve mitokondrial DNA'ya, membran lipidlerine ve karbonhidratlara zarar verir. Memeli hücrelerinde OH^{\cdot} üretildiğinde, DNA ürünlerine zarar vererek ayrılır (Karbownik ve Reiter, 2000).

DNA hasarının gerçekleştiği en az iki yol vardır. H_2O_2 , DNA yakınındaki moleküllere bağlı olan Fe^{2+} veya Cu^{+} ile reaksiyona girdiği için bozulmuş DNA oluşabilir; bu nedenle toksik OH^{\cdot} radikali oluştuğunda, onun ilk hedefi komşu nükleik asitlerdir (Arouma ve Halliwell, 1987). Bu yarı-indirgenmiş oksijen türü, lipid peroksidasyonunu başlatmak üzere membran lipitleriyle etkileşir. Bu etkileşim, OH^{\cdot} 'nin PUFA dan allelik bir H^{\cdot} 'yi uzaklaştırmasıyla gerçekleşir ve bir radikalik zincir reaksiyonuyla sonuçlanır. Depo proteinlerden salıverilen demir lipid hidroperoksitlerle reaksiyona girdiğinde, onları peroksil ve alkil radikallerine dönüştürür ve bunun sonucunda lipid yıkımı gerçekleşir (Reiter, 1998). Bir hidroksil radikali, yüzlerce yağ asidini ve yan zincirini lipid hidroperoksitlere çevirebilir. Bu oluşan hidroperoksitler birikerek membran bütünlüğünü bozarlar.

1.3.4 Singlet Oksijen (O_2^1)

Singlet oksijen, ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Oksijenin yüksek enerjili ve mutajenik formudur (Yanbeyi, 1999). Oksijenin eşleşmemiş elektronlardan birinin verilen enerji sonucu bulunduğu orbitalden başka bir orbitale veya kendi spininin ters yönünde yer değiştirmesiyle

oluşur (Cross ve Halliwell, 1987; Ames ve ark., 1993; Fırat, 1997; Yanbeyi, 1999; Dikici, 1999). Singlet oksijen in vivo ortamda sitokrom P₄₅₀, endoperoksit sentetaz ve myelo peroksidaz reaksiyonlarıyla oluştuğu gibi iyonize radyasyonla da oluşabilir. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olur (Di Mascio ve ark., 1991; Kuzuya ve ark., 1993; Akkuş, 1995; Yanbeyi, 1999). Singlet oksijen, serbest radikal olmamasına rağmen çok reaktif olması ve üretimi sırasında bazı radikalik tepkimeler oluşması nedeniyle aynı aileden sayılmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1989).

1.4 Serbest Radikallerin Kaynakları

Biyolojik sistemlerde serbest radikal oluşumu, normal metabolik olayların seyri sırasında gelebildiği gibi, organizmada bazı yabancı maddelerin (ksenobiyotikler) metabolize edilmesi sırasında ve organizmanın radyasyon gibi dış etkenlere maruz bırakılmasıyla da meydana gelebilir (Yanbeyi, 1999). Bu nedenle serbest radikal oluşturan mekanizmalar endojen ve ekzojen olarak ikiye ayrılmaktadır (Fırat, 1997; Yanbeyi, 1999)

Tablo 1.2 Hücredeki serbest oksijen radikali kaynakları (Cross ve ark.,1987)

Endojen Kaynaklar	Eksojen Kaynaklar
Mitokondriyal elektron transport zinciri	İlaç oksidasyonları (Ör. Parasetamol, CCl ₄)
Kloroplast elektron transport zinciri	İyonize radyasyon
Oksidan enzimler: Ksantin oksidaz	Güneş ışığı
İndolamin dioksijenaz	X- ışınları
Triptofan dioksijenaz	UV- ışınları
Galaktoz oksidaz	Isı şoku
Siklooksijenaz	Glutasyonu okside eden maddeler
Lipooksijenaz	Sigara dumanı
Mono aminooksidaz	Ozon
Fagositik hücreler	Kükürtdioksit
Nötrofiller, monosit ve makrofajlar	Egzos gazları

Son yıllarda yapılan çalışmalar, önemli endüstriyel ve çevresel kirleticilerden olan Pb ve Al gibi esansiyel olmayan toksik ağır metallerin oksidatif hasarda etkin rol oynadığını göstermektedir.

Tablo 1.3 Farklı sanayi kuruluşlarından kaynaklanan metal kirlilikleri

Endüstri	Cd	Cr	Cu	Hg	Pb	Ni	Sn	Zn	Al
○ Kağıt Endüstrisi	-	+	+	+	+	+	-	-	+
○ Petrokimya	+	+	-	+	+	-	+	+	-
○ Klor-alkali Üretimi	+	+	-	+	+	-	+	+	-
○ Gübre Sanayi	+	+	+	+	+	+	-	+	+
○ Metal Sanayi	+	+	+	+	+	+	+	+	+
○ Enerji Üretimi (Termik)	+	+	+	+	+	+	+	+	-
○ Gıda	+	-	+	+	+	-	-	+	+

Çok eski çağlardan beri kullanılan metaller, organizmanın fonksiyonlarını yerine getirmeye çalışır. Bunlara esansiyel metaller denir. (Co, Zn, Fe, Mn, Cu). Esansiyel metallerin bir kısmı enzim, hormon, hücre zarı geçirgenliği ve su dengesini düzenlerler.

Birçok metal içme sularıyla alınır. Bazı metaller ise kirliliklerle ve gıdalarla alınabilir. Yeraltı suları mineral yataklarından geçerken metaller suda çözünür ve zararlı hale gelirler. Ağır metaller konsantrasyon sınırını aştıkları zaman toksik etki gösterirler. Ağır metallerin, elektron paylaşım afinitesi yüksektir ve kovalent bağ yapma yeteneğine sahiptirler. Bu bağ, ağır metallerle sülfidril bağı içeren proteinler arasında oluşur. Metallerin toksik etkilerinin asıl nedeni de budur.

Her metale göre toksik etki değişir. Her metalin bir hedef organı vardır. Örneğin Pb hematopoetik sistemi etkiler. Böbrekler ve karaciğer de diğer hedef organlardır. Metallerin toksisitesine az çok etki eden bir diğer faktörde sudaki çözünürlükleridir. Suda çözünebilir metaller daha fazla toksik etkiye sahiptir. Bazı metal iyonları organizmada anyonlarla etkileşip çözünmez tuzlar oluştururlar. Çok fazla besinsel

fosfat alınması, Pb tuzlarının suda çözünmez Pb-fosfat oluşumu nedeniyle kurşunun gastro sistemden atılımını engeller.

Kurşun (Pb), insan ve laboratuvar hayvanları üzerinde fizyolojik, biyokimyasal ve davranışsal bozukluklara neden olan çevresel bir kirleticidir. Endüstrideki kullanım nedeniyle biyosferde yoğun olarak bulunmaktadır. Özellikle kuzey yarım kürede havada 1000 ton civarında kurşun sirkülasyonu söz konusudur (Dündar ve Aslan, 2005). Yaşadığımız ortamda kurşunun çok fazla bulunması, kurşun toksisitesinin halk sağlığı ile birincil dereceden ilgili olmasına neden olmaktadır. Kurşun, mavimsi gri renkte olup çok eskiden beri kullanılmaktadır. Başlıca boya, akümülatör, seramik, porsenel, vulkanize kauçuk endüstrisinde de, metal alanlarında, matbaa dizgilerinde kullanım alanları mevcuttur. Ayrıca kurşun vurutuyu azaltmak için benzine alkil kurşun bileşikleri olarak katılır. Tetra etil kurşun ya da tetra metil kurşun en önemli kurşun kaynaklarından. Et, balık ve yumurtada da belli oranlarda kurşun bulunur. Kurşun başlıca sindirim ve inhalasyon ile alınır. Genel olarak yetişkinlerde oral yolla alınan kurşunun %10'u, çocuklarda ise %40'ı gastrointestinal yoldan absorbe olur. Kurşunun gastrointestinal yoldan absorpsiyonunda çeşitli faktörler etkilidir. Günlük oral yolla alınan kurşun miktarı 300 ile 500 mg arasındadır, inhalasyon ile alınan miktar havadaki partikül büyüklüğü ve kimyasal yapıya bağlı olarak değişir. Organizmada kurşun bileşiklerinin deri yolu ile absorpsiyonu da önemlidir. Absorblanmış kurşunun atılımı da oldukça yavaştır. Bu nedenle hayat boyu vücutta birikir. Absorbe olan kurşun kana geçerek dengeye ulaşır ve dolaşım yolu ile tüm vücuda dağılır. Genç ve orta yaşlarda kurşun yumuşak dokuda, daha ileri yaşlarda kemikte toplanır. Kemikler dışında böbrek ve karaciğer kurşun birikimi açısından önemlidir. Böbrek ve bazı dokularda kurşunun proteinlere bağlanmasıyla yoğun ve kurşunca zengin hücre içi cisimcikleri oluşur.

Düşük seviyedeki kurşunun bile, öğrenme ve duymada kayıplara neden olduğu bilinmektedir. Çalışmalar Pb aracılı toksisitede çok çeşitli mekanizmaların yer aldığını göstermektedir. Pb, oksidatif, genetik, metabolik, ve enzimatik hasar oluşturarak vücudun tüm yaşamsal organlarına zarar verebilir (Bagchi ve Preuss, 2005). Son yıllardaki çalışmalar, oksidatif stresin Pb' nun temel toksik etki

mekanizmalarından biri olduğunu ileri sürmektedir. Kurşuna maruz kalma sonrasında hidroksil (OH[•]), hidrojen peroksit (H₂O₂), süperoksit anyon (O₂^{•-}) ve lipid peroksit (LPO[•]) gibi reaktif oksijen türlerinin üretiminin arttığı çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. Bu çalışmalarda Pb'a maruz bırakılan ratların karaciğer ve böbrek dokularında lipid peroksidasyonunun bir indikatörü olan MDA konsantrasyonunun arttığı ve antioksidan enzim aktivitelerinde de düzensizliklerin gözlemlendiği belirtilmektedir (Adonaylo ve Oteiza, 1999; Thurman ve ark., 1999; Husain ve ark., 2001; Patra ve ark., 2001; Tandon ve ark., 2002). Pb direkt olarak serbest radikal oluşturamaz, ancak dolaylı olarak koruyucu antioksidan bariyerlere zarar vererek lipid peroksidasyonunu uyarır (Gurer ve ark., 1999; Patra ve ark., 2001; Gordon ve ark., 2002). Kadmiyum (Cd) ve civa (Hg) gibi Pb da aminoasitlerin tiyol gruplarına yüksek bir afinite gösterir. Pb, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glukoz-6-fosfat dehidrataz (G6PD) gibi enzimlerin -SH gruplarını inhibe ederek antioksidan bariyere zarar verebilmekte, glutatyon (GSH) konsantrasyonunu azaltmaktadır.

Pb, insanlar üzerinde toksisiteye yol açabilecek üç önemli biyokimyasal özelliğe sahiptir. Birincisi, kurşun, sülfidril gruplarına yüksek afinite gösteren elektropozitif bir metaldir ve bu nedenle sülfidril içeren enzimleri inhibe eder. İkincisi, divalent kurşun kalsiyum gibi davranır ve kalsiyum ile yarışarak mitokondriyal fosforilasyon gibi önemli mekanizmalarda onun yerini alır. Kurşun, normalde kalsiyum tarafından düzenlenen hücre içi ileti sistemini bozar ve böylece endokrin ve nöronal fonksiyonlara zarar verir. Son olarak kurşun, nükleik asite bağlı proteinlerle etkileşerek DNA'nın genetik transkripsiyonunu ve dolayısıyla gen regülasyonunu bozabilmektedir (Gordon ve ark., 2002).

1.5 Vücutun Antioksidan Savunma Mekanizmaları

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Bu mekanizmalardan bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önler. Bu işlevleri yapan maddelerin tümüne birden genel olarak antioksidanlar denir (Ames ve ark., 1993; Frei, 1994; Akkuş, 1995; Bast ve ark., 1997; Yanbeyi, 1999; Dikici, 1999). Antioksidanlar;

intrasellüler ve ekstrasellüler olmak üzere iki grupta incelendikleri gibi ayrıca enzimetik ve non-enzimatik olarakta sınıflandırılabilirler.

Tablo 1.4 Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma sistemi (Yanbeyi, 1999; Dikici, 1999)

Enzimatik	Nonenzimatik	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon (GSH)	Albümin
Katalaz (KAT)	α -Tokoferol (vit E)	Seruloplazmin
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	Askorbat (vit C)	Transferrin
Fosfolipid hidroperoksit glutasyon	β -Karoten	Ferritin
Peroksidaz (PLGSH-Px)	Flavonoidler	Laktoferrin
Glutasyon S-transferaz (GST)	Ürat	Melatonin
Glutasyon redüktaz (GSSG-R)	Bilirubin	Sistein

Antioksidanlar etkilerini, şimdiye kadar tespit edilebilen altı değişik mekanizma ile gösterirler (Cross ve Halliwell, 1987; Gueumori ve ark., 1991; Ames ve ark., 1993; Yanbeyi, 1999). Bu mekanizmalar, birbirinden bağımsız veya bir arada işleyebilmektedirler.

1. Oksijen ile reaksiyona girerek ya da onun yerini alarak lokal oksijen konsantrasyonunu azaltabilirler.

2. Hidroksil (OH \cdot) radikali yapısında yer alan hidrojen atomları bağ oluşturabilecek yapıdaki ürünleri temizleyerek peroksidasyonun başlamasını önleyebilirler.

3. Membran lipidlerine direkt etkiyerek peroksit oluşturabilen singlet oksijeni (O_2^1) baskılayabilir ya da temizleyebilirler (Yanbeyi, 1999).

4. Metal iyonlarını bağlamak yoluyla reaktif grupların (OH \cdot , ferril ya da $Fe^{+2}/Fe^{+3}/O_2$ kompleksleri gibi) ve /veya lipid peroksitlerden peroksil ve alkoksil radikallerinin oluşumunu önleyebilirler. Membranlarda LPO'nun başlamasına hangi reaktif ürünlerin neden olduğu tartışılmaktadır, ancak hem başlangıç için ve hem de oluşan lipid peroksitlerinin dekompozisyonu için transisyonel metal iyonlarına ihtiyaç olduğu konusunda genel bir kanı vardır.

5. Peroksitleri, alkol gibi nonradikal ürünlere çevirebilirler. Örneğin; GSH-Px, peroksitleri bu yolla temizleyen bir antioksidandır.

6. Zinciri kırabilirler yani; zincir oluşumuna neden olabilen serbest radikallerle reaksiyona girebilirler ve yağ asidi zincirlerinden sürekli hidrojen iyonu salınımını önleyebilirler. Zincir kırıcı antioksidanlar için de fenoller, aromatik aminler ve en yaygın olanı α -tokoferol yer almaktadır (Halliwell, 1990; Yanbeyi, 1999).

Bir oksidatif zincirde antioksidanlar, farklı basamaklarda etki gösterirler. Lipit peroksidasyonunu yukarıdaki mekanizmalardan ilk dört tanesi ile önleyenler “Koruyucu Antioksidanlar” olarak kabul edilmektedir. Dördüncü mekanizma ile etki edenler reaksiyon sırasında tüketilemezler. Beşinci mekanizma ile etki eden antioksidanlar ise koruyucu olmakla birlikte reaksiyon sırasında kimyasal karakterlerine göre, tüketilebilir ya da tüketilemezler. Altıncı mekanizma ile etki eden zincir kırıcı antioksidanlar ise zincir uzama reaksiyonlarına neden olan radikallerle kompleks yaptıklarından kırma reaksiyonu sürecinde tüketilirler. Antioksidanların pek çoğunun tek bir mekanizma üzerinden etki etmediği, birden fazla mekanizma ile asıl etkisini oluşturduğu farklı araştırmacılar tarafından ifade edilmektedir (Craig ve ark., 1986; Halliwell, 1987; Halliwell ve Gutteridge, 1990; Jialal ve Fuller, 1993; Halliwell, 1994; Akkuş, 1995; Yanbeyi, 1999). Bu mekanizmalar normal biyokimyasal olaylar sırasında az miktarda oluşan radikalleri nötralize edebilirler. Ancak hiperoksi, iskemiden sonra reperfüzyon, dokularda reaktif oksijen radikalleri oluşturan ksenobiyotiklere maruz kalma ve bu radikalleri bol miktarda oluşturan aktive edilmiş nötrofillerle diğer fagositlerin dokuda toplanması gibi durumlar, oksidan/antioksidan dengesinin bozulmasına, antioksidan mekanizmaların tükenmesine (deplezyon) ve sonuçta sitotoksik radikal etkinliğinin artmasına bağlı olarak hücre zedelenmesine ve ölümüne yol açar (Yanbeyi, 1999).

1.5.1 Enzimatik Antioksidanlar

1.5.1.1. Süperoksit Dismutaz

Süperoksit dismutaz (SOD, E C. 1.15.1.1), süperoksit anyon radikalinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler (Mc Cord ve Fridovich, 1969; Beauchamp ve Fridovich, 1971; Fridovich, 1997; Heikkila ve Cabbat, 1976; Shimuzu ve ark., 1984; Reddy ve Venkaiah, 1988).



SOD'un fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalinin lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı fazla olan dokularda fazladır. SOD enzimi kofaktör olarak içerdiği metal iyonu tipine göre üç sınıfta toplanır (Fridovich, 1975; Asada, 1976; Asada ve ark., 1980; Allen ve ark., 1984; Rousseau, 1990; Smirnov ve Palanca, 1995; Çakır, 1997; Yanbeyi, 1999).

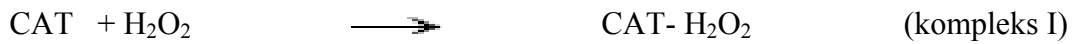
İnsanda SOD'nin iki tipi bulunmaktadır; sitozolde bulunan, dimerik, Cu ve Zn içeren izomer (Cu-Zn SOD) ile mitokondride bulunan tetramerik Mn içeren izomerdir (Mn-SOD). Cu,Zn-SOD, beyin hasarı ve nöronal ölüme karşı hem hücre içi hem de hücre dışı koruyucu özellik gösterir. Prokaryotlarda bulunan ve Fe içeren bir izomeri daha vardır (Fe-SOD). Ayrıca 1982 yılında glikoprotein yapısında olan ekstrasellüler SOD (EC-SOD) tanımlanmıştır (Marklund, 1984; Dikici, 1999). Cu-Zn SOD; ilk kez 1969 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanmıştır. Cu-Zn SOD, hayvansal hücrelerin sitozolünde yer alan enzimin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 32000 Dalton'dur. Birbirinin aynı olan iki alt ünitelerden meydana gelir. Her subünitede bir Cu atomu, bir Zn atomu, bir zincir içi disülfür köprüsü, bir sülfidril grubu ve bir asetilenmiş terminal amino grubu bulunduğu tespit edilmiştir (Freeman ve Crapo, 1982; Fırat, 1997). Mn-SOD; prokaryotik hücreler molekül ağırlığı 40000 olan, birbirinin aynı olan iki alt birimden oluşan ve enzimin alt birimi

başına birer atom Mn bağlı olan bir dismutaz içerirler. Mitokondri dismutazı da diğer prokaryotik hücrelerdeki dismutaza benzer, ancak 80000 molekül ağırlığında tetramer yapıdadır. Mitokondri ve diğer prokaryotların dismutazlarının pek çok ortak özelliği primer yapıları da birbirine çok benzer. Mitokondri dismutazının bu özelliği, mitokondrinin prokaryotik orjinli olup, ökaryotik hücre içine girerek simbiyotik bir yaşam oluşturduğuna kanıt olarak kabul edilir. Aynı tepkimeyi katalizlemeleri dışında Mn-SOD ile Cu-Zn SOD arasında hiçbir ortak yapısal özellik yoktur (Halliwell, 1990; Yanbeyi, 1999).

Fe-SOD; bazı bakteriler birden fazla SOD içerirler. Bunlardan biri bütün prokaryotlarda bulunan Mn-SOD olup, hücre sitoplazmasında bulunur. Bazı bakteriler periplazmik bölgelerinde demir içeren bir SOD bulundurlar (Çakır, 1997). Bu dismutaz kofaktörü dışında Mn-SOD'a benzer. Bu tip mikroorganizmalarda matriks enziminin (Mn-SOD) endojen O_2^- radikallerine karşı demir içeren dismutazın ise çevreden gelen radikallere karşı koruyucu fonksiyon gördüğü kabul edilmektedir (Kılınç, 1985; Çakır, 1997). Mn-SOD ve Fe-SOD enzimlerinin biri ya da her ikisi birden prokaryotlarda bulunur (Çakır, 1997).

1.5.1.2 Katalaz

Katalaz (CAT; EC 1. 1. 1. 6), hidrojen peroksidin oksijen ve suya dönüşümünü katalizler (Shimuzu ve ark.,1984).

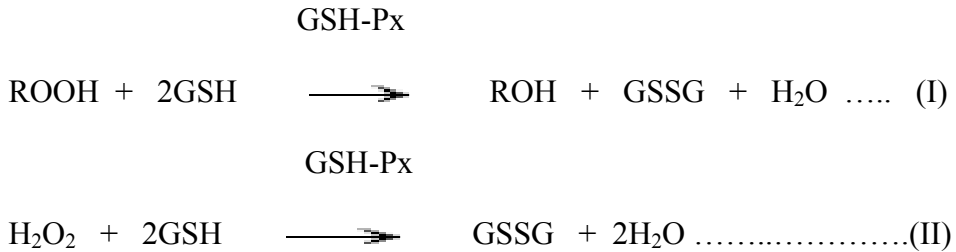


Katalaz (CAT), tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan dört tane hem grubu içeren bir hemoproteindir. Molekül ağırlığı 248,000 Dalton'dur. Hidrojen peroksidin moleküler oksijen ve suya dönüşümünü katalizler (Tudhope, 1967; Akkuş, 1995; Yanbeyi, 1999; Dikici, 1999).

Daha çok peroksizomlarda lokalizedir. CAT'ın indirgeyici aktivitesi, hidrojen peroksit ile metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine etki etmez. Kan, kemik iliği, mukoz membranlar, karaciğer ve böbreklerde yüksek miktarda bulunmaktadır (Tudhope, 1967; Gonzales ve ark., 1984; Rice-Evans ve ark., 1991; Rachmilewitz ve ark., 1994; Akkuş, 1995; Bast ve ark., 1997; Yanbeyi, 1999; Dikici, 1999).

1.5.1.3 Glutasyon Peroksidaz

Hücrelerde oluşan hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasından sorumlu olan bir enzimdir. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px; EC. 1.11.1.9), hem hidrojen peroksidi detoksifiye eder hem de lipid hidroperoksitlerin toksik olmayan alkollere indirgenmesini katalizler (Wheeler ve Salzman., 1990; Guemouri ve ark., 1991).



GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar.

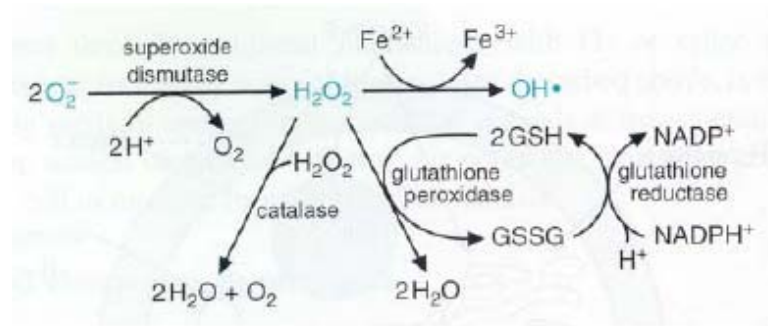
Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 85,000 Dalton'dur. Birbirinin aynı dört alt birimden oluşan tetramerik bir enzimdir. Her alt birim bir selenyum atomu içerir. Bu nedenle hücreleri çeşitli hasarlara karşı koruyan bir selenoenzim olduğu düşünülür (Paglia ve Valentine, 1967; Mannervik, 1985; McMillan ve Stell, 1993; Akkuş, 1995; Mungan, 1996; Fırat, 1997; Yanbeyi, 1999; Dikici, 1999). Enzim aktivitesinin

en fazla olduğu dokular ise eritrositler ve karaciğerdir (Firat, 1997). Hidroperoksitlerin redükte olması ile meydana gelen GSSG, glutatyon redüktazı (GSSG-R) katalizlediği reaksiyon ile tekrar GSH'ya dönüşür.

GSSG-R



GSH-Px'in, hücredeki dağılımı, GSSG-R'a bağımlıdır. Her iki enzim de sitozolde en yüksek konsantrasyonlarda bulunur (Yanbeyi, 1999).



Şekil 1.3 Glutatyon Redüktazın metabolizmadaki görevinin gösterimi.

1.5.1.4 Glutatyon S-Transferaz

“Selenyuma bağlı olmayan GSH-Px” olarak adlandırılır. Glutatyon-S-transferaz (GST; EC 2. 5. 1. 18), antioksidan özelliği olan bir diğer enzimdir. Glutatyon-S-transferaz, her biri iki alt birimden oluşan bir dimerik enzimdir ve başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksidlerine karşı bir savunma mekanizması oluşturur (Ceballos-Picot ve ark., 1992).

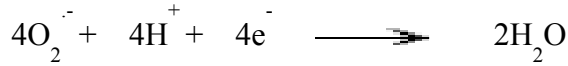
Glutatyon S-transferazlar (GST) katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptirler. Bunlar hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. GST' lar, karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi tarafından reaktif ara ürünler dönüşürülen yabancı maddelerin daha az reaktif konjugatlara dönüşümünü katalizlerler.

GST



1.5.1.5 Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz

Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz, aşağıdaki reaksiyonla süperoksidi detoksifiye eden enzimdir.

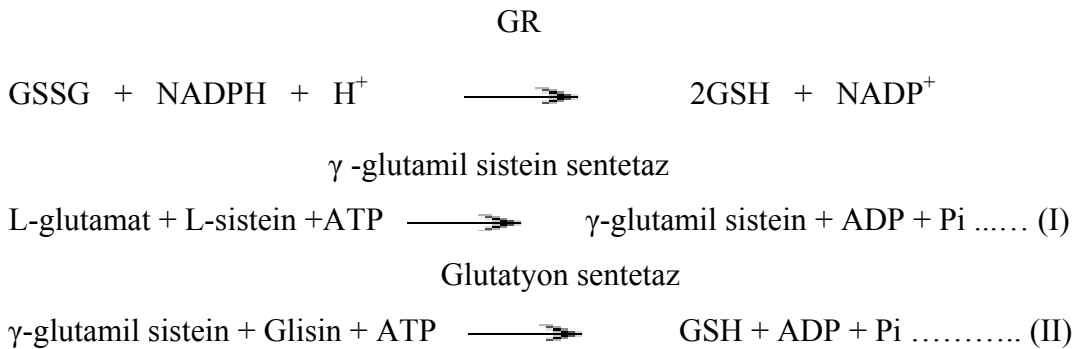


Bu reaksiyon, fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden normal bir reaksiyon olup, bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi sağlanır (Frei, 1994; Halliwell, 1994; Akkuş, 1995; Smirnov ve Palanca, 1995; Bast ve ark., 1997; Yanbeyi, 1999; Dikici, 1999). Ancak çoğu zaman süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$) üretimi mitokondriyal sitokrom oksidaz enziminin kapasitesini aşar ve bu durumda diğer antioksidan enzimler devreye girerek süperoksidin ($\text{O}_2^{\cdot-}$) zararlı etkilerine engel olurlar.

1.5.2 Nonenzimatik Antioksidanlar

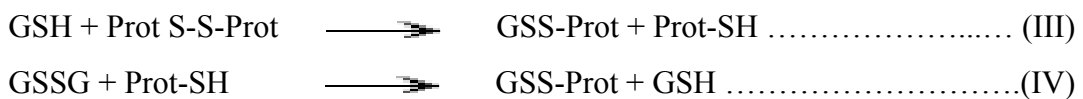
1.5.2.1 Glutatyon

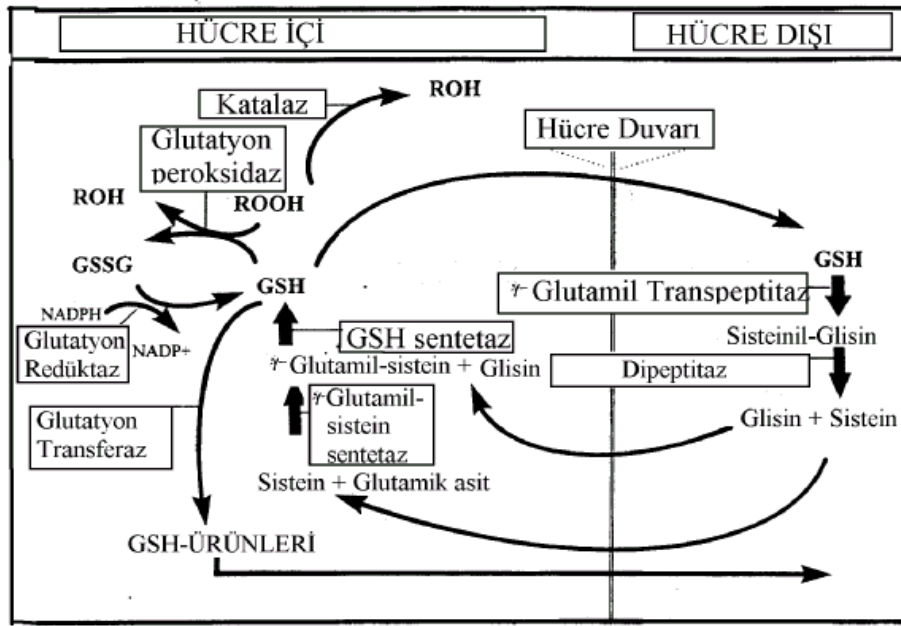
Karaciğerde genetik bilgiye gereksinim olmadan sentezlenebilen ve bir tripeptid olan glutatyon (γ -Glu-Cys-Gly; GSH), hem indirgenmiş (sülfidril) hem de yükseltgenmiş (disülfid) formda bulunabilir. Ancak, glutatyon redüktaz (GR) enziminin fonksiyonu nedeniyle in vivo'da baskın olarak indirgenmiş formda bulunur. (Beutler ve Duron, 1963; Akkuş, 1995; Fırat, 1997; Champe ve Harvey, 1997; Dikici, 1999; Yanbeyi, 1999).



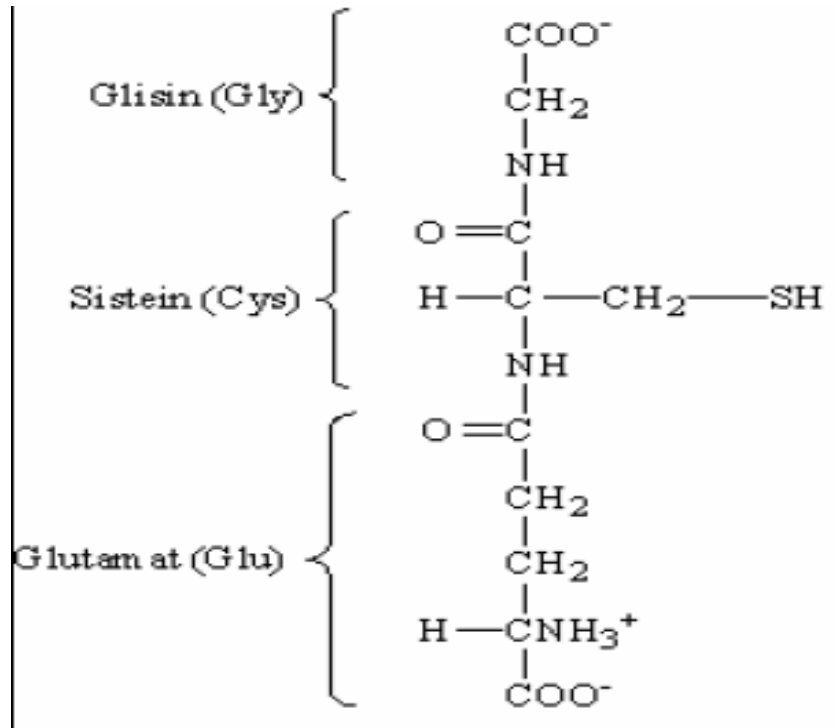
γ -Glutamil sistein sentaz, GSH sentezinde yer alan ilk ve hız sınırlayıcı enzimdir. Enzim, ATP varlığında, L-glutamat ve L-sisteinden L-glutamil-L-sistein ara ürününün oluşumunu katalizler. Glutasyon sentetaz da, γ -glutamil sistein ve glisinden GSH oluşumunu katalizler (Peuchen ve ark. 1997).

Vücutta enzimatik olmayan önemli bir antioksidan olan GSH, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur (Beutler ve Duron, 1963; Akkuş, 1995; Fırat, 1997; Dikici, 1999; Yanbeyi, 1999). Ayrıca hem nükleofilik hem de indirgen özellik göstermesi nedeniyle, elektrofilik ve oksitleyici moleküllerle reaksiyona girerek nükleik asit ve proteinleri radikal hasarına karşı korur (Bump ve Brown 1990, Cereser ve ark. 2001). Proteinlerdeki -SH gruplarını indirgenmiş formda tutarak fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSH, yabancı bileşiklerin detoksifikasyonunu ve amino asitlerin membrandan transportunu sağlar. Hemoglobinin yükseltgenerek methemoglobine dönüşmesini önlemede önemli rolü vardır. Glutasyon ayrıca, eritrositleri, lökositleri ve göz lenslerini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir. Eritrosit zarını hidrojen peroksitten, lökositleri fagositozda kullanılan yükseltgen maddelerden, lens proteinlerini de radikal hasarından korur (Akkuş, 1995). En önemli görevi, enzim ve proteinlerin tiyol gruplarının (-SH) indirgenmesi ile redükte formlarının yeterli düzeylerde kontrolünü sağlamaktır. Tiyol grubuna sahip birçok enzim düşük hızda fakat okside olarak ya da O_2 'nin direkt etkisiyle hızla aktivitelerini yitirirler. GSH kendisi okside olup tiyol gruplarını tekrar indirgeyerek bunların aktivasyonunu sağlar. Özellikle H_2O_2 'nin elimine edilmesinde de GSH'ın oksitlenebilirliğinden faydalanılır (Carlberg ve Mannervik, 1985; Akkuş, 1995; Yanbeyi, 1999).





Şekil 1.4 Glutasyon metabolizması.



Şekil 1.5 Glutasyonun yapısı (Champe, 1997).

1.5.2.2 Vitamin E (α -Tokoferol)

E vitamini ‘‘Tokoferoller’’ ve ‘‘Tokotrienoller’’ olarak iki ana grupta toplanabilen, 6 kromonal turevleri olan 8 dogal bileşigi içerir. Bu bileşikler molekülün kromonal halkasındaki metil gruplarının sayı ve pozisyonuna göre α , β , γ ve δ tokoferoller olarak adlandırılır (Fritsma ve ark., 1983; Yanbeyi, 1999). Yapısında bulunan fenolik hidroksil grubuna ait aromatik halka, vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır. α –Tokoferol dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunur. En yüksek vitamin E konsantrasyonları, mitokondri ve mikrozomlar gibi membrandan zengin hücre fraksiyonlarında bulunur. E vitamini, süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksi radikallerini ve diğer radikal örneklerini indirger (Rice–Evans ve ark., 1991; Akkuş, 1995; Tanakol, 1998; Dikici, 1999; Yanbeyi, 1999).

E vitamini dokularda en önemli zincir kırıcı antioksidandır. Alfa tekoferolün hidrofobik kısmı hidrojen atomunun kolayca ayırabileceği bir hidroksil grubudur. Bu nedenle peroksil radikali ve alkoksil radikalleri öncelikli olarak E vitamini ile birleşirler. Çok güçlü bir antioksidan olan E vitamini, hücre membran fosfolipidlerinde bulunan polidoymamış yağ asitlerini serbest radikal hasarından koruyan ilk savunma hattını oluşturur. (Horwitt, 1986; Ames ve ark., 1993; Akkuş, 1995; Çakır, 1997; Yanbeyi, 1999).



Glutasyon peroksidaz ile E vitamini serbest radikallere karşı birbirlerine tamamlayıcı etki gösterirler. Enzim, oluşan peroksitleri ortadan kaldırırken E vitamini peroksitlerin sentezini engeller (Fritsma ve ark., 1983; Halliwell, 1987; Fırat, 1997; Yanbeyi, 1999). Vitamin E, selenyum metabolizmasında da önemli rol oynar. Vitamin E selenyumun organizmadan kaybını önleyerek veya onu aktif şekilde tutarak selenyum ihtiyacını azaltır. Serbest radikallerin kanserin başlamasında rol aldığı ve vitamin E ile diğer antioksidanların antikanserojen etki

göstererek kanserin yayılmasını ve tümörün büyümesini önlediği kaydedilmiştir. Vitamin E eksikliğine bağlı hücrel hasarlara, lipid peroksidasyonunun yol açtığı kabul edilmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1984; Riemersma ve ark., 1991; Yanbeyi, 1999).

1.5.2.3 Vitamin A

A vitamini, ön maddesi β -karoten olan lipofilik bir antioksidandır. Singlet oksijeni ve peroksil radikalini tutar. Beta karotenin bu antioksidan aktivitesi rezonansla stabilize karbon merkezli radikal oluşumuna dayanır ve membranın lipid peroksidasyonundan korunmasına yardımcı olur.

1.5.2.4 Vitamin C

Suda eriyen vitaminlerden olan C vitamini (askorbik asit), kapalı formülü $C_6H_8O_6$ olan bir ketolaktondur. Hücre dışı ortamın en önemli antioksidanı olan C vitamini, biyolojik ortamlarda askorbat olarak bulunur. Askorbat etkili olarak hidrojen peroksit, süperoksit, hidroksil ve peroksil radikallerini tutar. Antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller, tokoferoksil radikalinin α -tokoferole indirgenmesini sağlar. L-askorbik asit ve L-dehidroaskorbik asit gibi iki aktif formu olan askorbik asit iyi bir redüktan maddedir. Bununla birlikte, askorbik asit; serbest radikal kaynağı gibi hareket edebilen çeşitli işlevli bir bileşimdir (Yanbeyi, 1999). Ferri demiri, ferro demire indirgeyen süperoksit anyon radikali dışındaki tek hücrel ajandır. Askorbat, proteine bağlı olan ferri demiri uzaklaştırarak veya doğrudan ferri demiri indirgeyerek ferro demire dönüştürür. Böylece Fenton reaksiyonunu tetikler ve hidroksil radikali oluşturur. Bu özelliğinden dolayı C vitamini, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalizörü veya pro-oksidan olarak değerlendirilir (Akkuş, 1995).



Bunların dışında, C vitamininin yükseltgenmesiyle doğrudan H_2O_2 meydana gelebilir.



Böylece C vitamini, hem H₂O₂ oluşumuyla hem de Fenton reaksiyonu yoluyla radikal oluşumuna katkıda bulunur. Ancak bu olumsuz etkisi, sadece düşük konsantrasyonlarda (< 0,2 mM) geçerlidir.

1.5.2.5 Flavonoidler

Lipidlerde çözünen antioksidanlar sınıfından olan flavonoidler bitkilerdeki kırmızı, mavi ve sarı renk pigmentlerini oluşturan polifenollerdir. İki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan difenil propan yapısındaki fenolik bileşiklerdir. Başlıca besinsel kaynakları elma, portakal, limon gibi meyveler ile patates, karnabahar gibi sebzelerdir. Şarap, üzüm suyu ve çay gibi bitkisel kaynaklı içeceklerde de bulunurlar (Dikici, 1999). Flavonoidler, 3'-4' dihidroksi konfigürasyonu ile antioksidan aktiviteye sahiptir. Flavonoidler ve diğer bitki fenoliklerinin süperoksit (O₂^{-•}), lipid alkoksil (RO[•]) ve peroksil (ROO[•]) ile nitrik oksit (NO[•]) radikallerini sönmleme özellikleri söz konusudur. Ayrıca bakır iyonlarıyla kompleks oluşturabilirler; bu durum antioksidan etkilerine bağlanabilir (Feredioon ve ark., 1992; Avcı, 2001).

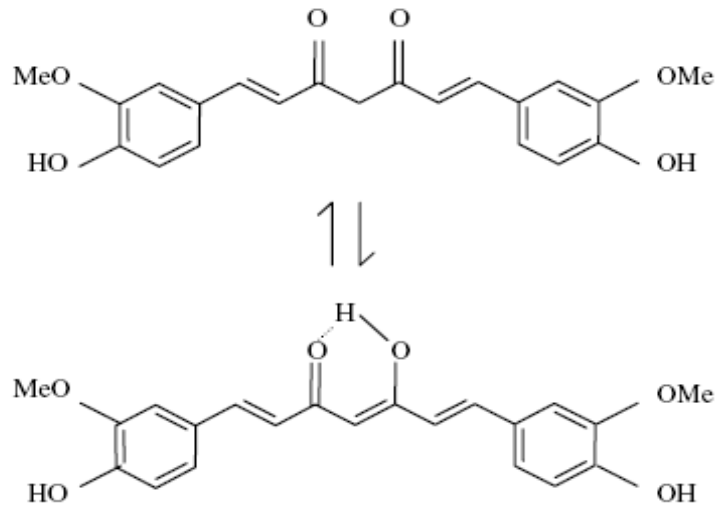
Günümüzde sentetik kökenli maddelerin yan etkilerinin daha fazla olması, özellikle antimikrobiyal olarak kullanılan sentetik ilaçlara karşı bu organizmaların direnç oluşturmaları gibi sebepler, doğal bitkisel kaynakların ve bu maddeleri taşıyan tıbbi bitkilerin önemini daha da artırmıştır. Flavonoidler dışında hiçbir bitki bileşik grubu farmasötik bakımdan bu kadar geniş spektrumlu bir potansiyel oluşturmamıştır. Flavonoidler, birçok radikal türünü içeren güçlü serbest radikal sönmleyicilerdir ve yükseltgenme-indirgenme reaksiyonları, karbonil reaksiyonu, serbest radikal reaksiyonları, metal iyonlarıyla kompleks oluşum reaksiyonları, hidrofobik etkileşimler, tautomeri ve izomerizasyon gibi çeşitli organik reaksiyonlarda yer alırlar. Birçok flavonoid metal şelatörler özellik taşır. Flavonoidler, hücre membranlarıyla etkileşir ve akışkanlığını artırır. Böylece onları

lipid peroksidasyonundan korurlar (Blaylock, 1998). Ayrıca flavonoidler, anti-alerjik, anti-karsinöjik, anti-hipertansif, anti-artirik aktiviteler gibi çeşitli fizyolojik aktiviteler gösterirler. Flavonoidler, kan-damar etkileşimi ve geçirgenliği, tümörlerin hücrede yayılımı ve antiviral etkiler gibi bir çok kronik hastalığın ilerlemesini engelleyen terapötik etkilere sahiptirler (Das, 1994).

Flavonoidleri antioksidan olarak kullanışlı kılan iki özellik vardır. Birincisi, singlet oksijen, süperoksit, peroksil, hidroksil ve peroksinitrit gibi birçok radikal türüne karşı sönmüleyici özellik göstermeleridir. Flavonoidlerin serbest radikal sönmüleme yetileri, elektron transferi için gerekli olan enerji ve yükseltgenme-indirgenme potansiyeline bağlıdır (Bent, 2002). Birçok flavonoid bitkide glikozidler halinde bulunur. Barsaklarda bu birimler flavonoidlerin aglikanlarına dönüşürler. Biyolojik sistemlerde güçlü antioksidan aktivite gösteren bu aglikan formlarıdır. İkincisi ise, oldukça etkin metal şelatörleri olmalarıdır (Blaylock, 1998). Bazı çalışmalarda, flavonoidlerin şelatör aktivitelerinin DNA için toksik olabileceği ifade edilmiş (Sahu ve Gray, 1993; 1994); ancak birçok çalışmada (tüm biyolojik sistemleri içeren) albuminin fenolik bileşiklerin pro-oksidan fonksiyonunu önlediği gösterilmiştir (Smith ve ark., 1992). Flavonoidlerin diğer bir önemli özelliği, kılcal damarların dayanıklılığını artırmaları ve böylece serebral damarları kronik serbest radikal hasarından korumalarıdır.

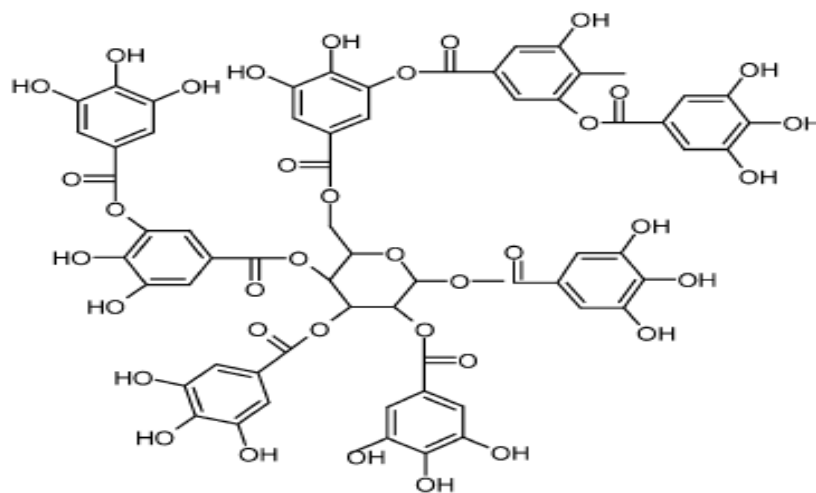
1.5.2.5.1 Kürkimin. Kürkimin (1,7-bis(4-hidroksi-3metoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion), zerdeçal bitkisinin sarı pigmentlerinden izole edilen ve doğal olarak bulunan fenolik bir bileşiktir (Şekil 1.6). Açık sarı renkli ve pudra biçimindedir. Bu parlak renginden dolayı besin boyası olarak da ticari kullanımı vardır. Kürkimin (diferuloilmetan), düşük moleküler ağırlıklı bir polifenoldür ve aktif yapısının çoğunu zerdeçal içeriğine borçludur. Bu bileşik antioksidatif, anti-inflamatuar, antikarsinöjenik, antidiabetik, anti-HIV gibi çeşitli biyolojik ve farmakolojik özelliklere sahiptir. Kürkiminin kanser önleyici veya diğer terapötik özelliklerinin, antioksidan etkinliğine bağlı olduğu düşünülmektedir, antioksidant özelliği de fenolik yapısından ileri gelir. Kürkimin, süperoksit anyon, hidroksil ve nitrik oksit radikallerini sönmüleyebilmektedir. Kürkimin quinolinik asit-aracılı lipid

peroksidasyon ve CN-aracılı süperoksit anyon radikali üretiminin inhibisyonunu sağlamaktadır. Böylelikle nöro korumada yeni bir rol sağlamaktadır. Kürkimin, beyindeki beta amiloid plaka oluşumunu engellediğinden dolayı Alzheimer hastalığında da tedavi edici bir rol oynar. Ayrıca kürkimin, büyümesi inhibe edilmiş hücreleri restore ederek apoptozisi engeller. Kürkiminin toksik metallerle olası etkileşimi, demir-indüklü oksidatif doku hasarına karşı koruyucu etkisi ile ilgilidir (Ebyl ve ark., 2004; Wei ve ark., 2006). Bu nedenle son yıllarda kürkiminin antioksidan özellikleri üzerine çalışmalar yoğunlaşmaktadır. Kürkimin, bis- α,β -doymamış β -diketondur ve enol tautomer dengesinde bulunur. Bis-keto formu asidik, nötral çözeltilerde ve hücre membranında baskındır. pH 3-7 aralığında kürkimin, sıra dışı olarak potansiyel proton alıcısıdır. Bu nedenle, kürkiminin keto formu aktif karbon atomu içeren iki metoksifenol halkası arasındaki heptadienon köprüsünü içerir ve bu karbondaki komşu oksijendeki eşleşmemiş elektronların delokalizasyonu nedeniyle C-H bağı çok zayıftır. pH 8'in üzerinde ise heptadienol zincirinin enolat formu baskın olup bu özellik kürkiminin fenolik antioksidan aktivitesini sağlayan elektron alıcısı olarak rol oynamasına neden olur (Sharma ve ark., 2005).



Şekil 1.6 Fizyolojik şartlar altında kurkiminin tautomerisi.

1.5.2.5.2 Tannik Asit. Tannik asitler (tanninler), molekül ağırlıkları 500 ile 3000 Da arasında değişen çoğu bitkide olan suda çözülebilir polifenollerdir (Şekil 1.7). Fenol gruplarından dolayı zayıf asidik bir özellik gösterirler. Tannik asit, maun, ceviz ve meşe ağacında bulunan ve tahtaya rengini veren bileşimdir. Tannik asit genelde demir ve alüminyumla kombine olarak bulunur. Sarı renkli pudra şeklindedir. Çözünürlüğü 0,35 ml suda 1g'dır. Antimutajenik ve antikanserojenik aktivitelerine karşın hepatotoksisite ve kanser oluşumlarında yer alabilmektedirler. Tanninlerin antimikrobiyal aktiviteleri çok iyi bilinmektedir. Tanninler mikrobiyal enfeksiyonlara karşı doğal bir savunma mekanizması gösterirler. *Aeromona hydrophila*, *A. sobria*, *E. tarda*, *E. coli* ve *P. fluorescens* mikroorganizmaları tanninlerce kolaylıkla inhibe edilir (Chung ve ark.,1993; 1995). Tanninlerin de diğer flavonoidler gibi oksidatif hasarı önleyebildiği, serbest radikalleri sönmüleyici antioksidan özellik gösterebildiği bilinmektedir. Bazı tanninlerin stres uygulanmış balıkların eritrositlerindeki oksidatif stresi azaltmada pozitif rol oynadığı belirlenmiştir (Fedeli ve ark., 2004). Tannik asitlerin, lipit peroksidasyonunda E vitaminine göre daha güçlü inhibitör etkileri bulunur. Yapılan çalışmalarda tannik asidin bazı antioksidan enzim aktivitelerini de arttırdığı belirtilmektedir (Park ve ark., 2002). Polimerik tanninler, kateşin, kuerçetin ve kampferol gibi küçük moleküllü polifenollere göre radikallere karşı daha güçlüdürler. (Ono ve ark., 2004).



Şekil 1.7 Tannik Asidin Molekül Yapısı

Sunulan çalışmada, Pb stresine maruz bırakılan ratların karaciğer dokularında oluşabilecek oksidatif strese bağlı hasarın giderilmesinde veya yıkımın geciktirilmesinde kürkimin ve tannik asidin etki mekanizmalarının araştırılması amaçlanmıştır. Bu etkisizleştirme mekanizmalarında; serbest radikallerin zararlı etkilerini gideren antioksidan etkiye sahip süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin aktivite değişimleri ile membran hasarının göstergesi olan LPO seviyelerindeki değişimler tayin edilmiştir.

BÖLÜM İKİ

MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

2.1.1 Deney hayvanlarının gruplandırılması:

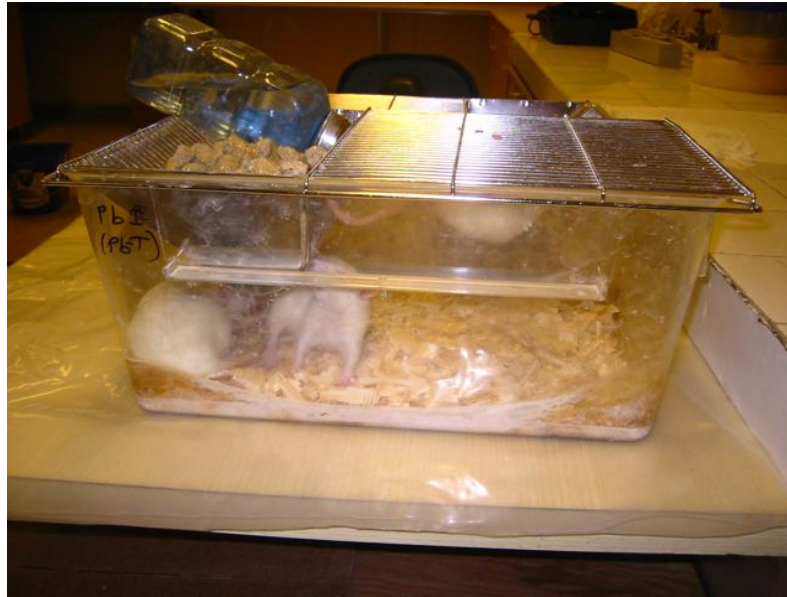
Literatürde farklı metal ve flavonoid derişimleri ile yapılan çalışmalar mevcuttur (Adonaylo ve Oteiza, 1999; Wang ve ark., 2002; Eybl ve ark., 2004; Fedeli ve ark., 2004). Çalışmada, metallerin oksidan/antioksidan denge üzerindeki etkileri ile flavonoidlerin koruyucu/önleyici özelliklerinin karşılaştırılması amacıyla eş derişimlerle çalışılmıştır. Bunun üzerine Wistar Albino türü ratlar (2-3 aylık, erkek, dişi) aşağıdaki şekilde gruplandırılmış ve öngörülen hayvan modeli uygulanmıştır:

1. **Grup:** Kontrol grubu (Standart diyet ve distile su ile beslenen)
2. **Grup:** Pb toksisite grubu (Standart diyet ve 1000 ppm Pb çözeltisi ile beslenen)
3. **(PT)Grup:** Pb + tannik asit grubu (Standart diyet ve 1000 ppm Pb çözeltisi ile beslenen ve 50 mg/kg/gün olacak şekilde nazogastrik sonda ile tannik asit (1 mL/100g rat) uygulanan)
4. **(PK)Grup:** Pb + kurkimin grubu (Standart diyet ve 1000 ppm Pb çözeltisi ile beslenen ve 50 mg/kg/gün olacak şekilde nazogastrik sonda ile kurkimin (1 mL/100g rat) uygulanan)

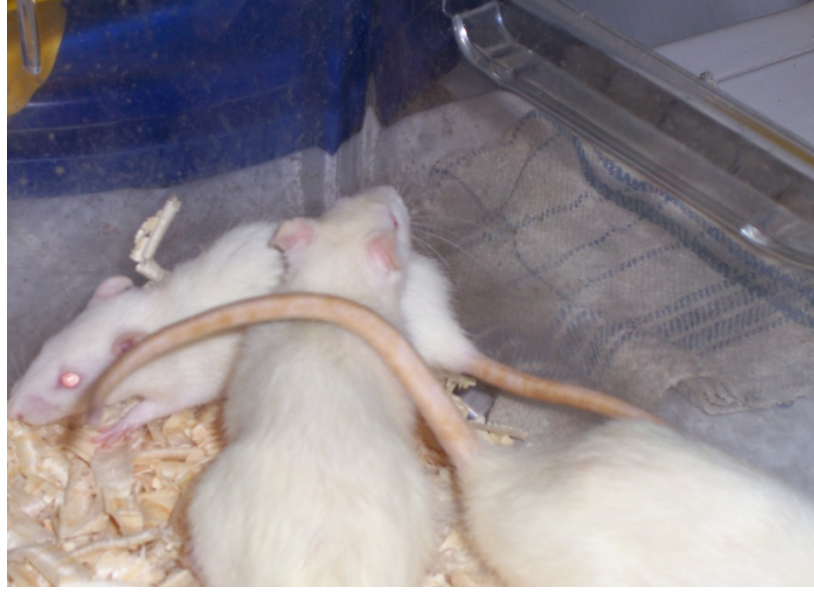
Tüm gruplar ortalama 8'er rat içermektedir. Kurkimin ve tannik asidin nazogastrik sonda ile uygulaması haftada 2 kez yapılmıştır. Nazogastrik sonda ile uygulama için kurkimin fındık yağında ve tannik asit tamponda (pH=7.4) çözülmüştür.



Şekil.2.1 a) Nazogastrik sonda uygulaması.



Şekil.2.1 b) Hayvan modelinin uygulanması



Şekil.2.1 c) Ratların görünümü

2.1.2 Doku numunelerinin hazırlanması

Ratların karaciğer dokuları, doku ağırlıklarının yaklaşık 5 kat oranında 50 mM fosfat tamponu (pH= 7,4) ile soğuk zincire uygun bir şekilde Ultra Turrax (8000 devir/dk'devir hızında) homojenizatör kullanılarak 1 dakika süreyle homojenize edilmiştir. Homojenizasyondan sonra +4°C'da 15 dakika süreyle soğutmalı 15000 rpm de santrifüjlemenin ardından süpernatant kısmı ölçümlere kadar -80°C'da muhafaza edilmiştir (CAT için 3000 rpm, SOD için 2500 rpm devir hızında). Dokuların protein içeriği, Bradford yöntemiyle belirlenmiştir (Bradford, 1976).

2.1.3 Kullanılan malzeme ve cihazlar:

Tablo 2.1 Deneylerde kullanılan cihazlar

Malzeme/Cihaz	Markası
UV-Visible Spektrofotometre	Shimadzu 1601
Hassas terazi	Scaltec SBC21
Manyetik karıştırıcı	Nüve
Santrifüj	Nüve, Eppendorf, Hereaus
Soğutmalı santrifüj	Hettich 32 R
Vorteks	Heidolph
Mikropipet	Eppendorf, Biohit, Gilson
Derin dondurucu	Uğur, Facis, Snijders Scientific
pH- metre	Hanna
Homojenizatör	IKA
Magnetik karıştırıcı	Heidolph

2.1.4 Kullanılan kimyasal maddeler:

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup kullanıldıkları yönetime göre gruplandırılarak aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir.

Tablo 2.2 SOD tayini için kullanılan kimyasal maddeler

Adı	Markası
6-Hidroksidopamin	Chemicadam
Pirogallol çözeltisi	Sigma

Tablo 2.3 GSH-Px tayininde kullanılan kimyasal maddeler

Adı	Formülü	Markası
Glutasyon	$C_{10}H_{17}N_3O_6S$	Sigma
Glutasyon redüktaz	GR	Sigma
β -Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (β -NADPH)	$C_{21}H_{26}N_7O_{17}P_3Na_4$	Sigma
Kümen hidroperoksit	$C_9H_{12}O_2$	Sigma
Potasyum siyanür	KCN	Sigma
Potasyum ferrisiyanür	$K_3Fe(CN)_6$	Sigma
Potasyum bikarbonat	NaHCO₃	Sigma

Tablo2.4 CAT tayininde kullanılan kimyasal maddeler

Adı	Formülü	Markası
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Sigma
Potasyum dihidrojenfosfat	KH_2PO_4	Merck
Disodyum hidrojenfosfat	Na_2HPO_4	Merck

Tablo 2.5 LPO tayininde kullanılan kimyasallar maddeler

Adı	Formülü	Markası
Trikloroasetik asit	$C_2HCl_3O_2$	Merck
Tiyobarbitürik asit	$C_4H_4O_2N_2S$	Sigma

2.1.5 Kullanılan çözeltiler

H₂O₂ çözeltisi (10,5 mM): % 30'luk H₂O₂ çözeltisinden 107 μ L alınır ve hacmi 50 mM fosfat tamponu (pH= 7,00) ile 100 mL'ye tamamlanır.

Kümen hidroperoksit çözeltisi (0,18 mM): Kümen hidroperoksit standardından 10 µL alınır, 10 mL bidistile su ile seyreltilir. Çözelti, günlük hazırlanır.

Glutasyon çözeltisi (4mM): 0,307 g glutasyon tartılır ve hacmi 50 mM fosfat tamponu (pH=7,2 olan ve 4,3 mM EDTA içeren) ile 250 mL'ye tamamlanır.

Glutasyon redüktaz (0,5 U/L): 3,4 µL glutasyon redüktaz standardından alınır, 50 mM fosfat tamponu (4,3 mM EDTA içeren ve pH=7,2 olan) ile 1L'ye seyreltilir. Çözelti, günlük hazırlanır.

β-NADPH çözeltisi (0,28mM): 0,058g β-NADPH tartılıp hacmi 50 mM fosfat tamponu (pH=7,2 olan ve 4,3 mM EDTA içeren) ile 250 mL'ye tamamlanır.

Drabkin çözeltisi (Double Drabkin): 50 mg potasyum siyanür, 1 g sodyum bikarbonat ve 200 mg potasyum ferrisiyanür tartılır, bir miktar bidistile suda çözülür ve son hacim 500 mL olacak şekilde bidistile suyla tamamlanır.

Fosfat tamponu (50 mM): 6,81g KH₂P₀₄ ve 7,1 g Na₂HP₀₄ tartılıp bir miktar bidistile suda çözülerek son hacim bir litreye tamamlanır ve pH 7,00'ye ayarlanır.

Fosfat tamponu (10 mM): 1,362 g KH₂P₀₄ ve 1,42 g Na₂HP₀₄ tartılıp bir miktar bidistile suda çözüldükten sonra hacim bir litreye tamamlanır ve pH 7,00'ye ayarlanır.

TCA çözeltisi (%30): 30 g TCA tartılıp bir miktar bidistile suda çözülür ve son hacim 100 mL'ye tamamlanır.

TBA çözeltisi (% 0,67): 0,67 g TBA tartılıp bir miktar bidistile suda çözüldükten sonra hacim 100 mL'ye tamamlanır.

2.2 Method

2.2.1 Süperoksit Dismutaz Aktivite Ölçümü:

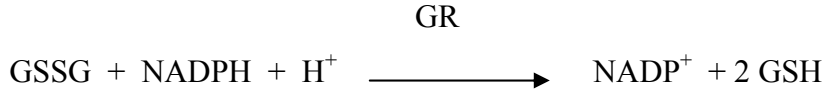
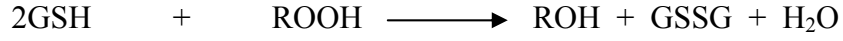
Süperoksit dismutaz aktivitesi 6-Hidroksidopamin (6-OHDA) yöntemiyle ölçülmüştür (Crosti ve ark., 1987). 6-OHDA' nın stok çözeltisi 1mM KCl pH 2.0 de hazırlanmıştır. Çözeltideki oksijen, progallol çözeltiden saf N₂ gazı geçirilerek uzaklaştırılmıştır. Denemeler süresince stok çözelti +4°C de N₂ gaz ortamında korunarak kullanılmış ve stok çözeltiler denemeden önce taze olarak hazırlanmıştır.

Hava-O₂ (8.2 mg L⁻¹) ile doyurulan 0.1M fosfat tamponu pH 7.4 deki 6-OHDA (4×10⁻⁴M) in otooksidasyon hızı 20°C de 15 s. aralıklarla 3 dakika 490nm de gözlenen absorbans değişimleriyle saptanmıştır. SOD aktivite ölçümleri toplam 1ml lik reaksiyon hacminde standart koşullar altında 90. sn deki absorbans değişimi izlenerek gerçekleştirildi. IU; 6-OHDA otooksidasyonunu %50 inhibe eden SOD miktarı olarak tanımlanır. SOD aktiviteleri, seyrelme faktörleri de kullanılarak U mL⁻¹ olarak hesaplanmış ve takiben aşağıdaki bağıntı ile U mg⁻¹ protein olarak ifade edilmiştir.

$$\text{SOD U mg}^{-1} \text{ protein} = \frac{\text{SOD U mL}^{-1}}{\text{mg protein dL}^{-1}}$$

2.2.2 Glutasyon Peroksidaz Aktivite Ölçümü:

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi, Paglia ve Valentine metoduna dayalı olarak tayin edilmiştir (Paglia ve Valentine, 1967). Glutasyon peroksidaz, kümen hidroperoksitin glutasyon (GSH) varlığında indirgenmesini katalizler. Kümen hidroperoksidin indirgenmesiyle oluşan glutasyonun yükseltgenmiş formu (GSSG), glutasyon redüktaz (GR) ve NADPH varlığında NADPH'ın NADP⁺ye yükseltgenmesiyle indirgenir. Enzim aktivitesi, 340 nm'de absorbanstaki değişim izlenerek tayin edilir.

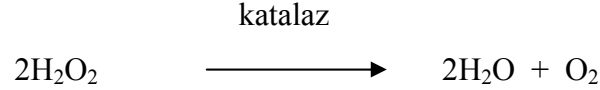
GSH-Px

Doku GSH-Px aktivitelerinin tayini amacıyla, 0.050 mL homojenata 1.000 mL seyreltici reaktiften ilave edilmiştir. 5 dakikalık inkübasyon sonrasında ortama 1.000 mL Double Drabkin çözeltisinden ilave edilip karışım vortekslenmiştir. Ayrı bir deney tüpünde 1.000 mL glutatyon (4mM), glutatyon redüktaz (0.5U L⁻¹) ve β-NADPH (0.28mM) çözeltilerini içeren reaktif ile 0.020 mL numune karıştırılıp ölçümden hemen önce 0.040 mL kümen hidroperoksit (0.18mM) ilave edilmiştir. Enzim aktivitesi, 340 nm'deki absorbans değişimi ve seyrelme faktörleri kullanılarak U L⁻¹ olarak hesaplanmıştır ve aşağıdaki bağıntı kullanılarak U mg⁻¹ protein şeklinde ifade edilmiştir.

$$\text{GSH-Px U/mg protein} = \frac{\text{GSH-Px U L}^{-1}}{10 \times \text{mg protein dL}^{-1}}$$

2.2.3 Katalaz Aktivite Ölçümü:

Katalaz tayini, kinetik ölçüme dayalı Aebi metoduna dayanmaktadır (Aebi, 1974). Katalaz, hidrojen peroksidin (H_2O_2), su ve moleküler oksijen vermek üzere bozunmasını katalizler.



Çalışmada, katalaz aktivitesi, H_2O_2 konsantrasyonunda birim zamandaki azalmanın 240 nm'de spektrofotometrik olarak izlenmesiyle tayin edilmiştir. Doku katalaz aktivitesinin tayini amacıyla, daha önce hazırlanan homojenizatlar, 50 mM fosfat tamponu (pH=7.00) ile 1:10 oranında seyreltilmiştir. 2.00 mL 0,005mL homojenizat üzerine 1.00 mL H_2O_2 çözeltisi (30 mM) ilave edilip 240 nm'deki absorbans değişimleri 15'şer saniye aralıklarla kaydedilmiştir. Benzer işlemler, kör denemeyle de tekrarlanıp enzim aktivitesi, absorbans değişimi ve seyrelme faktörleri kullanılarak $U L^{-1}$ olarak hesaplanmış ve elde edilen sonucun protein miktarına bölünmesi ile $U mg^{-1}$ protein şeklinde ifade edilmiştir (1 IU, mg enzim tarafından dönüşüme uğratılan H_2O_2 miktarı olarak tanımlanmıştır.).

2.2.4 Lipid Peroksidasyonunun (MDA Konsantrasyonunun) Belirlenmesi:

Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan malondialdehit (MDA) tayini, tiyobarbitürik asit metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneyin prensibi, Draper ve Hadley yöntemine dayanmaktadır (Draper ve Hadley, 1990). MDA, lipid peroksidasyonun güvenilir bir indikatörüdür. MDA, biyolojik materyallerde farklı kovalent bağlı formlarda ve bir dereceye kadar da serbest halde bulunur. Asit veya bazla sıcakta muamele ile kovalent yapıdan ayrılması sağlanır. Polidoymamış yağ asidi (PUFA) peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'nın tayini, TBA ile reaksiyona girerek oluşturduğu renkli kompleksin spektrofotometrik olarak

izlenmesine dayanır. Çalışmada 0,5 mL homojenat üzerine 2,5 mL %10'luk TCA eklenip, tüpler vortekste karıştırılmıştır. 15 dakika süreyle kaynar suda bekletilip derhal soğutulmuş ve 5000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüjlemenin ardından her bir süpernatandan 2'şer mL başka bir tüpe aktarılmıştır. Üzerine 1 mL %0,67'lik TBA eklenip vortekste karıştırılmıştır. Numuneler tekrar 15 dakika süreyle kaynar suda bekletilip hemen soğutulduktan sonra 532 nm'deki absorbansları kaydedilmiştir. MDA miktarı, oluşan MDA-TBA kompleksine özgü 532 nm'deki absorbans değerlerinden ($\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) yararlanılarak hesaplanmıştır.

$$A = \epsilon \times l \times c \Rightarrow c = A / \epsilon \times l$$

$$c = \frac{A}{\epsilon \times l} = \text{nmol /mg protein}$$

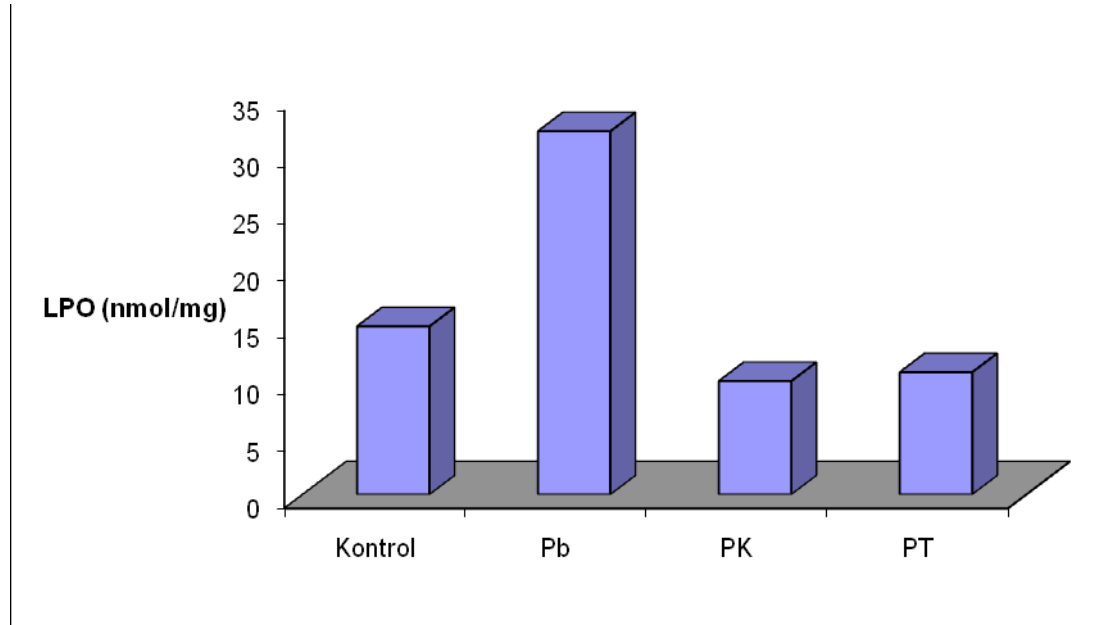
A : Absorbans
 ϵ : Molar soğurma katsayısı
 l : ışık yolu, cm
 c : konsantrasyon

Sonuçlar, Bonferonni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile SPSS paket program kullanılarak istatistiki olarak değerlendirilmiştir.

BÖLÜM ÜÇ

DENEY SONUÇLARI

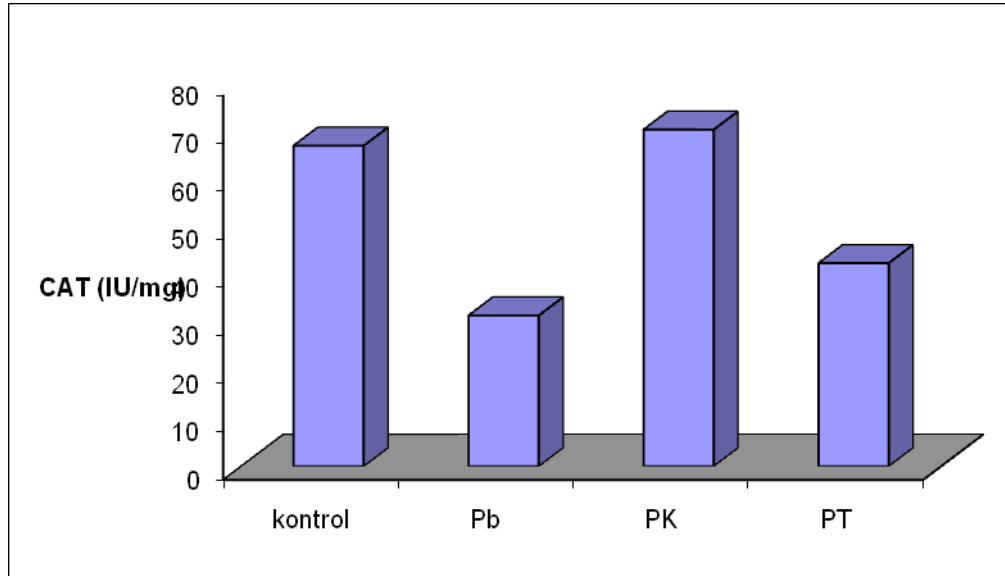
Pb stresine maruz bırakılan ratların karaciğer dokularındaki oksidatif strese bağlı membran hasarının göstergesi olan LPO düzeyleri ile serbest radikallerin zararlı etkilerini gideren antioksidan etkiye sahip SOD, CAT ve GSH-Px enzimlerinin aktivite değişimleri materyal-metotta belirtilen koşullarda tayin edilmiştir. Şekil 3.1’da lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA düzeyleri verilmiştir.



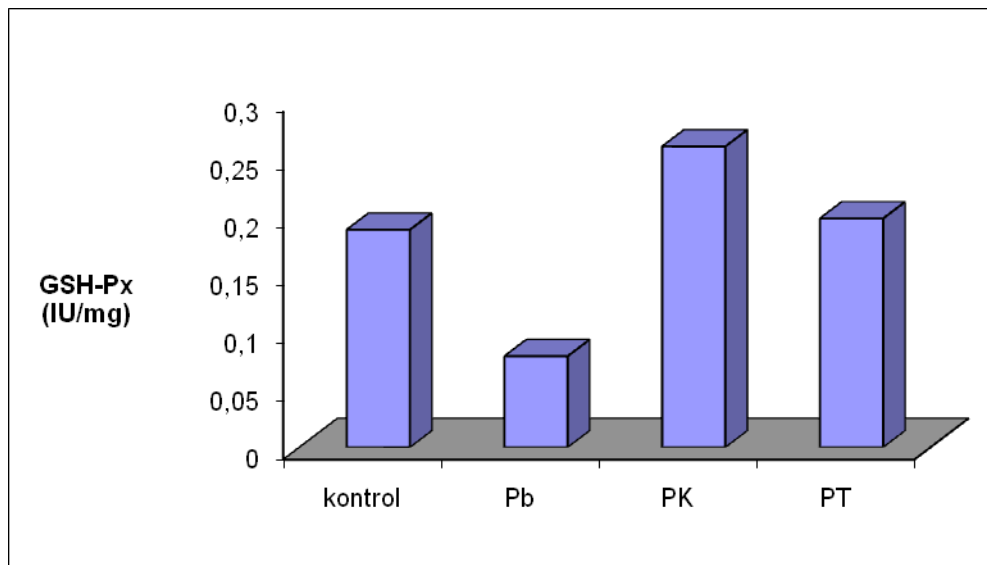
Şekil 3.1 Pb stresi ile flavonoid yüklemesinin lipid peroksidasyonuna etkisi.

Şekil 3.1’den görüleceği üzere, lipid peroksidasyonu, Pb stresi uygulanan ratların karaciğer dokularında kontrole kıyasla anlamlı düzeyde ($p=0.000$) artarken, Pb stresinin yanı sıra hem tannik asit, hem de kürkimin uygulanan örneklerde lipid peroksidasyonu, sadece Pb stresi uygulanan gruba kıyasla anlamlı düzeyde (p değerleri sırasıyla 0.000 ve 0.000) azalmıştır.

Şekil 3.2 ve 3.3’de antiperoksidatif enzim sınıfında yer alan katalaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri verilmiştir.



Şekil 3.2 Pb stresi ile flavonoid yüklemesinin CAT aktivitesine etkisi.

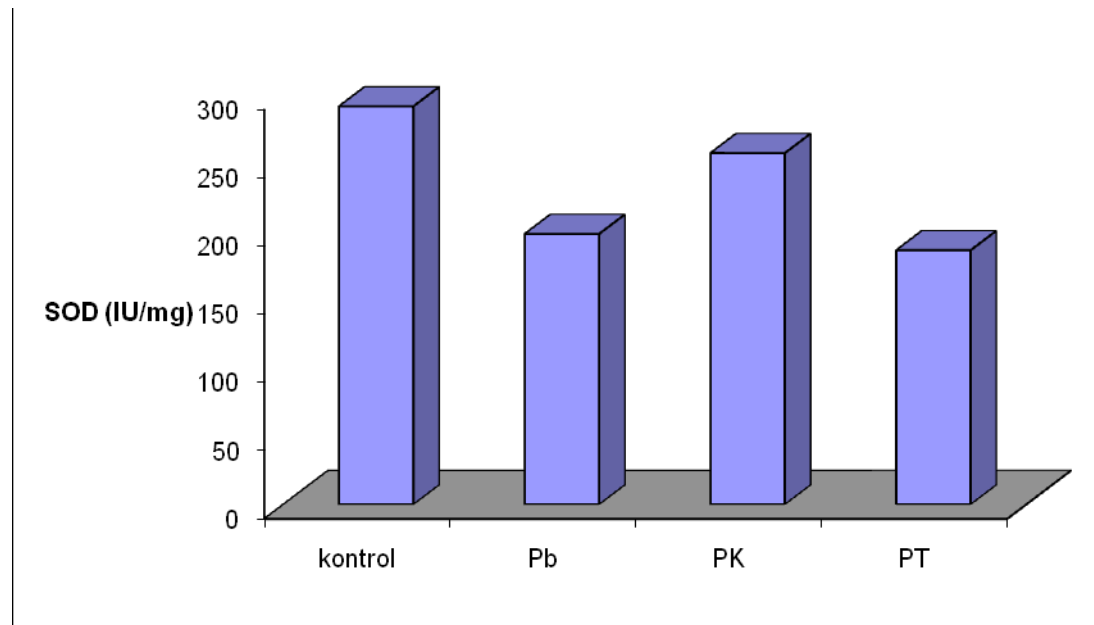


Şekil 3.3 Pb stresi ile flavonoid yüklemesinin GSH-Px aktivitesine etkisi

Şekil 3.2’de görüldüğü gibi, Pb stresi uygulanan ratların karaciğer dokularındaki katalaz aktivitesi anlamlı düzeyde ($p=0.000$) düşmüş, Pb stresinin yanı sıra hem tannik asit, hem de kürkimin uygulanan örneklerde CAT aktivitesi, sadece Pb stresi uygulanan gruba kıyasla anlamlı düzeyde (p değerleri sırasıyla 0.000 ve 0.038)

artmıştır, ancak tannik asit yüklemesi CAT aktivitesini kontrol düzeyinde koruyamamıştır. Şekil 3.3.'den görüleceği üzere Pb stresi uygulanan ratların karaciğer dokularındaki glutatyon peroksidaz aktivitesi anlamlı düzeyde ($p=0.000$) düşmüş, Pb stresinin yanısıra kürkimin uygulanan örneklerde hem kontrole hem de Pb stresi uygulanan gruba kıyasla glutatyon peroksidaz aktivitesi anlamlı düzeyde (p değerleri sırasıyla 0.048 ve 0.000) yükselmiştir. Oysa, Pb stresinin yanısıra tannik asit uygulanan grupta, sadece Pb stresi uygulanan gruba kıyasla glutatyon peroksidaz aktivitesi anlamlı düzeyde ($p=0.000$) yükselmiştir.

Şekil 3.4'de süperoksit anyon radikalinin sönmüleyicisi olan süperoksit dismutaz enzim aktivitesi yer almaktadır.



Şekil 3.4 Pb stresi ile flavonoid yüklemesinin SOD aktivitesine etkisi.

Şekilden de görüleceği üzere SOD aktivitesi, Pb stresi uygulanan ratların karaciğer dokularında kontrole kıyasla anlamlı düzeyde ($p=0.000$) düşmüş, metal stresinin yanısıra kürkimin uygulanan örneklerde ise Pb stresi uygulanan gruba kıyasla SOD aktivitesi anlamlı düzeyde ($p=0.040$) yükselmiş, ancak metal stresinin yanı sıra tannik asit yüklemesinin SOD aktivitesine olumlu yönde bir katkısı olmamıştır.

BÖLÜM DÖRT

TARTIŞMA

Kurşun, faydalı biyolojik bir role sahip olmayan, yayılım gösteren çevresel ve endüstriyel kirleticidir. Bu biyotoksik metale kronik olarak maruz kalmak organlarda birikim ve hasara yol açar. Kurşun aracılı toksisite için çeşitli mekanizmalar önerilmesine rağmen, hiçbir mekanizma tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. Son çalışmalar, oksidatif stresin kurşun toksisitesindeki önemli mekanizmalardan biri olduğunu öne sürmektedir (Ercal ve ark., 1996; Gurer ve ark., 1998). Oksidatif stresin karaciğer, böbrek, beyin ve diğer organlardaki kurşun aracılı doku hasarına katkıda bulunduğu da literatürde ifade edilmektedir (Halliwell, 1994; Adonaylo ve Oteiza, 1999).

Redoks düzensizliğinin, ROS oluşumu aracılığıyla vücut sistemini negatif yönde etkilediği bilinmektedir. Karaciğer, kurşun birikimi dolayısıyla kurşun toksisitesi açısından hedef organlardan biridir. Kurşunun lipit peroksidasyonunu artırarak karaciğerde oksidatif hasar oluşturduğu bilinmektedir. Lipit peroksidasyonunun bütün ürünleri, yükseltgenme veya radikal zincir reaksiyonları aracılığıyla oksidatif stres oluşturarak hücre bileşenlerini inaktive eder ve bu durum, membran bütünlüğünün bozulmasına yol açar. Kurşun maruziyeti sonrası LPO' da gözlenen artış, serbest radikal oluşumuna ve antioksidanların tükenmesine bağlı olabilir. Ancak, kurşun yükseltgenme-indirgenme döngüsüne girmediğinden kurşunun lipit peroksidasyonu üzerindeki etkisi direk değildir. Bu değişiklikler, kurşunun serbest radikal sönmüleyici enzimler ve GSH düzeyleri üzerindeki dolaylı etkisine bağlı olabilir. Literatürde flavonoidlerin metal iyonlarıyla şelat oluşturduğu ve böylece ROS' larca başlatılan lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği ifade edilmektedir (Blaylock, 1998). Sunulan çalışmada, lipid peroksidasyonu, Pb stresi uygulanan ratların karaciğer dokularında kontrole kıyasla anlamlı düzeyde (p=0.000) artarken, Pb stresinin yanı sıra hem tannik asit, hem de kürkimin uygulanan örneklerde lipid peroksidasyonu, sadece Pb stresi uygulanan gruba kıyasla anlamlı düzeyde (p değerleri sırasıyla 0.000 ve 0.000) azalmıştır. Lipid peroksidasyonu, oksidatif hasarın temel göstergelerinden biridir ve birçok ksenobiyotiğin toksisitesinde önemli rol

oyun. Çalışmada anlamlı olarak artan MDA düzeyleri, uygulanan dozda kurşunun serbest radikal aracılı oksidatif doku hasarına neden olabileceğini göstermektedir.

Çalışmada, metal stresi uygulanan gruba kıyasla, gerek kürkürkür kimin gerek tannik asit uygulanan gruplardaki (PbK ve PbT) MDA düzeylerinin anlamlı bir düşüş göstermesi, söz konusu flavonoidlerin metal şelatör özellik göstererek Fe²⁺-aracılı Fenton reaksiyonunu önlediğini ve böylece •OH radikali oluşumunu inhibe ederek lipid peroksidasyonunu azalttığını düşündürmektedir.

CAT, SOD ve GPx gibi antioksidan enzimler ROS' lara karşı ilk savunma hattını oluştururlar ve dokulardaki yıkımı azaltırlar. CAT prostetik grup olarak hem içeren temel antioksidan enzimdir ve hidrojen peroksidi hızla su ve moleküler oksijene dönüştürerek biyolojik sistemleri reaktif oksijen türlerine karşı korur. Ancak kurşuna maruz bırakılan hayvanlarda CAT'ın aktivitesinde doz ve işlem süresine bağlı olarak azalma (Chaurasia ve Kar,1997; Mahaffey,1991), artma (Gurer ve Ercan, 2000; Masso ve ark., 2007), ya da sabit kalma (Patra ve ark., 2001) gibi farklı yanıtlar gözlenmiştir. Bu çalışmada, 4 hafta süreyle uygulanan sub-kronik kurşun maruziyetinin katalaz aktivitesinde anlamlı bir düşüşe (p=0.000) neden olduğu belirlenmiştir. Kurşunun gastrointestinal sistemde demir absorpsiyonunu indirdiği ve hem biyosentezini inhibe ettiği bilinmektedir (Sivaprasad ve ark., 2004). Kurşuna maruz kalan hayvanlarda gözlenen düşük CAT aktivitesi, kurşunun yukarıda belirtilen her iki sürece de etki ettiğini göstermektedir (Sanghir ve Gill, 1995). Oksidatif stres süresince CAT aktivitesi azalır, hidrojen peroksit birikir ve bu nedenle lipid peroksidasyonu istemli hale gelir. Pb stresinin yanı sıra hem tannik asit, hem de kürkürkür kimin uygulanan örneklerde CAT aktivitesi, sadece Pb stresi uygulanan gruba kıyasla anlamlı düzeyde (p değerleri sırasıyla 0.000 ve 0.038) artmıştır, ancak tannik asit yüklemesi CAT aktivitesini kontrol düzeyinde koruyamamıştır. Bu durumda, flavonoidlerin metal ile şelat oluşturarak önerilen etkinliği giderdiği ve söz konusu gruplarda gözlenen CAT aktivitesi artışının buna bağlı olduğu söylenebilir.

SOD, süperoksit radikalinin dismutasyon reaksiyonunu katalizleyerek toksik etkilerini önlemede önemli bir role sahiptir. Bu çalışmada, 4 hafta süreyle kurşuna maruz bırakılan ratlarda aktivitesi için bakır ve çinkoya gereksinim duyan SOD'nin kontrole kıyasla anlamlı ölçüde ($p=0.000$) azaldığı belirlenmiştir. Mylorie ve arkadaşları (1986) bu durumun kurşun aracılı bakır eksikliğine bağlı olabileceğini öne sürmüşlerdir (Mylorie ve ark., 1986). Sivaprasad ve grubu, metaller tarafından oluşturulan oksidatif stresin süperoksit anyon radikali üretiminde artışa neden olduğunu göstermişlerdir (Sivaprasad ve ark., 2004). Oksidatif stres durumunda SOD, iki farklı yol izleyebilir. İlk olarak stres hafifletildiğinde hücreler SOD'yi baskılar ancak stres uzun süre devam ederse, ROS üretiminde artış tetiklenir; enzim tüketilir ve konsantrasyonu azalır (Berrahal ve ark., 2007). Çalışmada belirlenen azalan SOD aktivitesi, aşırı süperoksit anyon radikali üretimiyle açıklanabilir. Ayrıca, düşük SOD aktivitesinin DNA hasarı nedeniyle oluşan enzim inaktivasyonuna bağlı olabileceğini de öne sürmektedir (Berrahal ve ark., 2007). Metal stresinin yanı sıra kürkimin uygulanan örneklerde ise Pb stresi uygulanan gruba kıyasla SOD aktivitesi anlamlı düzeyde ($p=0.040$) yükselmiş, ancak metal stresinin yanı sıra tannik asit yüklemesinin SOD aktivitesine olumlu yönde bir katkısı olmamıştır. Kürkimin, süperoksit anyon, hidroksil ve nitrik oksit radikallerini sönmüleyebilmektedir. Kurşun yanı sıra kürkimin uygulanan gruplarda SOD aktivitesinin artması, demir-indüklü oksidatif doku hasarına karşı koruyucu etkisi ile ilgili olabilir.

Hidroperoksit indirgeyici bir enzim olan ve aktivitesi için selenyuma gereksinim duyan GPx, kurşun uygulanan ratlarda azalmıştır. Pb stresi uygulanan ratların karaciğer dokularındaki glutatyon peroksidaz aktivitesi anlamlı düzeyde ($p=0.000$) düşmüş, Pb stresinin yanı sıra kürkimin uygulanan örneklerde hem kontrole hem de Pb stresi uygulanan gruba kıyasla glutatyon peroksidaz aktivitesi anlamlı düzeyde (p değerleri sırasıyla 0.048 ve 0.000) yükselmiştir. Oysa, Pb stresinin yanı sıra tannik asit uygulanan grupta, sadece Pb stresi uygulanan gruba kıyasla glutatyon peroksidaz aktivitesi anlamlı düzeyde ($p=0.000$) yükselmiştir. Schrauzer tarafından önerildiği gibi, GPx aktivitesindeki kayıp, kurşun ve selenyum arasındaki antagonistik etkilere bağlı olabilir (Sivaprasad ve ark., 2004). Kürkimin uygulanan grupta (PbK) enzim

aktivitesinin artması, bu flavonoidin metal şelatör özellik göstererek Fe²⁺-aracılı Fenton reaksiyonunu önlediğini ve böylece •OH radikali oluşumunu inhibe ederek hidroperoksit oluşumunu azalttığını düşündürmektedir.

Sonuç olarak, kurşunun uygulanan doz ve dolayısıyla üzerindeki dozlarda, serbest radikal oluşumunu tetikleyerek oksidatif karaciğer hasarına yol açabileceğini söyleyebiliriz. Bozulan oksidan/antioksidan denge, kurşunun toksik etkilerinden kısmen sorumlu tutulabilir. Hücrelerin antioksidan kapasitesinin restorasyonu, kurşun aracılı oksidatif strese karşı kısmi bir çözüm üretebilir. Kürkimin ve tannik asit kurşun duyarlı biyokimyasal değişkenleri restore ederek oksidatif hasarı azaltabilir. Dolayısıyla, bu çalışmanın ışığında, uygulanan flavonoidlerin radikalik hasarı önleme/gidermede etkin olabileceğini ve bu nedenle de söz konusu metallerin toksisitesini azaltmak için flavonoidlerce zengin besinlerin tüketilmesinin faydalı olabileceğini söyleyebiliriz. Ancak bu flavonoidlerin faydalı etkilerinin mekanizmalarının aydınlatılması için ilave çalışmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Adonaylo, V.N., Oteiza, P.I., (1999). Lead Intoxication: Antioxidant Defense And Oxidative Damage In Rat Brain. *Toxicology*, 135, 77–85.
- Aebi, H., 1974, "Catalase", In Methods of Enzymatic Analysis (Bergemeyer, H U., ed) Academic Press, 673-684, New York-London Akkuş, İ. (1995). *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*. Mimoza Yayınları, Konya
- Akkuş, İ., (1995). "Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri", Mimoza Yayınları, Konya
- Allen, R. G., Farmer, K. J., Newton, R. K., Sohal, R. S. (1984). Effects of paraquat administration on longevity, oxygen consumption, lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides and glutathione in the adult housefly. *Comp Biochem Physiol C*, 78(2):283-8.
- Ames, B.N., Shigenaga, M. K., Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 1;90(17):7915-22.
- Aroumo, O. I., Halliwell, B., (1987). Action Of Hypochlorous Acid On The Antioxidant Protective Enzymes Superoxide Dismutase, Catalase And Glutathione Peroxidase. *Biochem. J.*, 248, 973- 976
- Asada, K., Kanematsu, S., Okada, S., Hayakawa, T. (1980). Chemical and biological aspects of superoxide and superoxide dismutase, elsevier. *Amsterdam*, pp. 136-153.
- Asada, K. (1976). Method Of Plant Enzyme And Protein . *Kyoritsu Pres Tokyo*, pp. 373-378.

- Atlante, A., Calssano, P., Bobba, A., Giannattasio, S., Marra, E., Passarella, S. (2001). Glutamate Neurotoxicity, Oxidative Stress And Mitochondria. *FEBS Letters*, 497, 1- 5
- Asada, K. (1976). Method of Plant Enzyme And Protein . Kyoritsu Pres Tokyo, pp. 373-378.
- Avcı, A. (2001). Diyabet Oluşturulmuş Ratlarda Böbrek Antioksidan Savunma Sistemi Ve E Vitaminin Etkileri. *Ankara Üni. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 56s (yayınlanmamış)*
- Bagchi, D., Preuss, G.H. (2005). Effects Of Acute And Chronic Oval Exposure Of Lead On Blood Pressure And Bone Mineral Density In Rats. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99, 1155–1164.
- Basaga, H. S. (1990). Biochemical Aspects Of Free Radicals. *Biochem. Cell Biol.*, 68:989-998.
- Bast, A., Haenen, G. R. M. M., Cees, J. A. D. (1997). Oxidants and antioxidants: State of the art. *The American Journal of Medicine*, 91,(Suppl 3C),30,3C-2S_3C-13S.
- Beauchamp, C., Fridovich, I. (1971). Superoxide Dismutase: Improved Assays And An Assay Applicable To Acrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*, 44, 276-287.
- Beckman, K B., Ames, B N. (1997). Oxidative decay of DNA. *J. Biological Chemistry*, 272(32), 19633- 19636.
- Bent, H. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96, 67– 202.

- Berrahal, A.A., Nehdi, A., Hajjaji, N., Gharbi, N., El-Fazaa, S. (2007). Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead. *C. R. Biologies*, 330, 581-588.
- Beutler, E., Duron, O., Kelly, B.M. (1963). Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab Clin Med. May*, 61:882-8.
- Blaylock R.L. (1998). Neurodegeneration and aging of the central nervous system: Prevention and treatment by phytochemicals and metabolic nutrients. *Integrative Med.*, 1(3), 117-133,
- Bourg, E L. (2001). Oxidative stress, aging and longevity in drosophila melanogaster. *FEBS Letters*, 498, 183-18
- Bradford, M.M.,. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–252, 1976.
- Breckta A., Greenstock C.L., Tambo, M. (1984). Advances on oxygen radicals, and radioprotectors: Mavelli, I: Ratiolo, G: *Enzymatic Protection Against Intracellular Oxidative Processes*, p. 65-80.
- Bump, A. E., Brown, J. M., (1990). Role of glutathione in the radiation response of mammalian cells in vitro and in vivo. *Pharmac. Ther.*, 47, 117- 136
- Carlberg, I., Mannervik, B. (1985). Glutathione reductase. *Methods Enzymol*, 113:484-90.
- Ceballos- Picot, I., Triver, J M., Nicole, A., Sinet, P M., Thevenin, M., (1992), "Age-correlated modification of copper- zinc superoxide dismutase and glutathione related enzyme activities in human erythrocytes", *Clin. Chem.*, 38 (1), 66- 70

- Cereser, C., Guichard, J., Drai, J., Bannier, E., Garcia, I., Boget, S., Parvaz, P., Revol, A. (2001). Quantitation of reduced and total glutathione at the femtomole level by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to red blood cells and cultured fibroblasts. *J. Chromatography B*, 752, 123- 132
- Champe, P. C., Harvey, R. A. (1997). Glikozaminoglikanlar. Tokullugil, A., Dirican M., Ulukaya, E. *Lippincott's Illustrated Reviews Serisi, Biyokimya*. İkinci baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, s. 147-156.
- Chaurasia, S.S., Kar, A. (1997). Protective effects of vitamin E against lead induced deterioration of membrane associated type-I iodothyronine 5'-monodeiodinase (5'D-I) activity in mal emice. *Toxicology*, 124, 203-209.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A.(1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 59(3), 527-605
- Cheeseman, K. H., Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Free Radicals in Medicine*, 481- 493
- Chung, K. T., Stevens, S. E. Jr., Lin, W. F., Wei, C. I. (1993). Growth inhibition of selected food-borne bacteria by tannic acid, propyl gallate and related compounds. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1, 29-32
- Chung, K. T., Zhao, G., Stevens, S. E. Jr., Simco, B. A., Wei, C. I. (1995). Growth inhibition of selected aquatic bacteria by tannic acid and related compounds. *J. Aquat. Anim. Health* 7, 46-49.
- Craig ve Aust, e.t., aust, s.d. (1986). Free radicals and environmental toxins. *Annals of Emergency Medicine*, 15,9.

- Cross, C. E., Halliwell, B., Borish, E., Pryor, W., Ames B. N., Saul, R., McCord, J. M., Harman, D. (1987). Oxygen radicals and human disease. *Annals of Internal Medicine*, 107, 526-545.
- Crosti N, Servedi T, Bajer J, Serra A (1987) Modification of 6-hydroxydopamine technique for the correct determination of superoxide dismutase. *J Clin Chem Clin Biochem* 25:265–267.
- Çakır, M. (1997). Aspirin ve vitamin E (-Tokoferol)'nin farelerde (*Mus musculus*) karaciğer total süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerine etkileri. *Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Samsun, 50s (yayınlanmamış)*.
- Das, D. K. (1994). Naturally occurring flavonoids: Structure, chemistry and high performance liquid chromatography methods for separation and chracterization. *Methods in Enzymo.*, 234, 410-419.
- Di Mascio, P., Murphy, M. E., Sies, H. (1991). Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols and thiols. *Am J Clin Nutr. Jan*; 53(1 Suppl):194S-200S.
- Dikici, İ. (1999). Akut viral hepatitlerle interferon tedavisi görmüş kronik viral hepatitlerde oksidatif stresin araştırılması. *Selçuk Üni. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Konya, 73s (yayınlanmamış)*.
- Donnelly, J. K., McLellan, K. M., Walker, J. L., Robinson, D. S. (1989). Superoxide dismutases in foods. *Food Chemistry*, 33, 243- 270.
- Draper, H., Hadley, M., (1990), "Malondialdehyde determination as index of lipidperoxidation", *Methods in Enzymology*, 186, 421-431

- Dünder, Y., Aslan, R.. (2005). Yaşamı Kuşatan Ağır Metal Kurşunun Etkileri Effects of Lead as a Life Surrounding Heavy Metal *Kocatepe Tıp Dergisi The Medical*
- Ebyl, V., Kotyzova, D., Bludovska, M. (2004). The effects of curcumin on cadmium-induced oxidative damage and trace elements level in the liver of rats and mice. *Toxicology Letters*, 151, 79-85.
- Ercal, N., Treratphan, P., Hammond T.C., Mathews, R.H., Grannemann, N.H., Spitz, D.R. (1996). In vivo indices of oxidative stres in lead-exposed C57BL/6 mice are reduced by treatment with meso-2, 3-dimercaptosuccinic acid or N-acetyl cysteine. *Free Rad. Biol. Med.* 21, 157-161.
- Feredioon, S., Janitha, P. K., Wanasundara, P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 32(1):67-103.
- Fırat, S. (1997). Kobaylarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında doku glutatyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon- S-transferaz düzeyleri ve N-asetil sistein'in bu sistem üzerindeki etkisi. *Gazi Üni. Tıp Fak. Biyokimya A.B.Dalı, Uzm.Tezi, Ankara, 95s (yayınlanmamış).*
- Fedeli, D., Berrettini, M., Gabryelak, T., Falcioni, G.,(2004). The effect of some tannins on trout erythrocytes exposed to oxidative stress. *Mutation Research* 563, 89–96.
- Floyd, R. A. (1999). Antioxidants, oxidative stress and degenerative neurological disorders. *Experimental Biology and Medicine*, 222, 236- 245.
- Freeman, B. A., Crapo, J.D. (1982). Free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, 47:412-425.

- Frei, B. (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of Action. *The American Journal of Medicine*, 97(Suppl 3A),26,3A-5S-3A-12S.
- Fridovich, I. (1975). Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*, 44:147-59.
- Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical, superoxide dismutases and related matters. *J. Biological Chemistry*, 272(30), 18515-18525
- Fristma, G. A., George, A., Fristma, M. S. (1983). Vitamin E and autoxidation. *American Journal of Medical Technology*, 49,6,453-456.
- Gonzales, R., Auclair, C., Voisin, E., Gautero, H., Dhermy, D., Boivin, P. (1984). Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in red blood cells from patients with malignant diseases. *Cancer Res. Sep*, 44(9):4137-9.
- Gordon J.N., Taylor, A., Bennett, P. N. (2002). Lead poisoning: case studies. *J Clin Pharmacol*, 53, 451–458.
- Guemouri, L., Artur, Y., Herbeth, B., Jeandel, C., Cuny, G., Siest, G. (1991). Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood. *Clin. Chem.*, 37 (11), 1932- 1937, (1991).
- Gurer, H., Ozgunes, H., Neal, R., Spitzland, D.R., Ercal, N. (1998). Antioxidant effects of N-acetylcysteine and succimer in red blood cells from lead exposed rats. *Toxicology*, 128, 181-189.
- Gurer, H., Neal, R., Yang, P., Oztezcan, S., Ercal, N. (1999). Captopril as an antioxidant in lead-exposed Fischer 344 rats. *Hum. Exp. Toxicol*, 18, 27–32, (1999).
- Gurer, H., Ercan, N. (2000). Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning. *Free Radical Biol. Med.*, 29(10), 927-945.

- Halliwell, B., Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am. J Clin. Nutr.*, 57, 715S-725S, (1993).
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (1984). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet*. Jun 23; 1(8391):1396-7.
- Halliwell, B. (1987). Free radicals and metal ions in health and disease. *Proc Nutr Soc*. Feb; 46(1):13-26.
- Halliwell, B., Gutteridge, J M C., (1989), "Metabolism of transition metals in the human body", *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon, 111-150
- Halliwell, B., (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence. *Lancet*. Sep 10; 344(8924):721-724.
- Heikkila, R.E., Cabbat, F. A. Sensitive assay for superoxide dismutase based on the autoxidation of 6-hydroxydopamine. *Analytical Biochemistry*, 75, 356-362, (1976).
- Held, K. D., Slyvester, F. C., Hopcia, K. L., Biaglow, J. E. (1996). Role of Fenton chemistry in thiol- induced toxicity and apoptosis. *Radiation Research*, 145, 542-553.
- Horwitt, M. K. (1986). Interpretations of requirements for thiamin, riboflavin, niacin-tryptophan, and vitamin E plus comments on balance studies and vitamin B-6. *Am J Clin Nutr.*, Dec; 44(6):973-85.
- Husain, K., Scott, B. R., Reddy, S. K., Somani S. M. (2001). Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defense system. *Alcohol*, 25, 89–97.

- Jain, A., Martensson, J., Stole, E., Auld, P. A. M., Meister, A. (1991). Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 1913-1917
- Jlalat, I., Fuller, C. J. (1993). Oxidized LDL and antioxidants. *Clin Cardiol*. Apr; 16(4 Suppl 1):I6-9.
- Karbownik, M., Reiter, R J., (2000), "Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation", *Experimental Biology and Medicine*, 225, 9-22
- Kılınç, K. (1985). Serbest oksijen radikallerinin biyokimyasal etkileri ve metabolizması. *Biyokimya Dergisi*, Sayı 2,60-89.
- Kökoğlu, E. (1998). Oksidatif stres ve yaşlanma. *Yaşlanmaya Biokimyasal Yaklaşım Uluslararası Sempozyumu*, Ankara.
- Kuzuya, T., Hoshida, S., Kim, Y., Oe, H., Hori, M., Kamada, T., Tada, M. (1993). *Free radical generation coupled with arachidonate lipoxygenase reaction relates to reoxygenation induced myocardial cell injury. Cardiovasc Res*. Jun; 27(6):1056-60.
- Levine S.A., Kidd, P.M.(1996). Antioxidant adaptation: Its role in free radical pathology biocurrents division
- Luza, S. C., Speisky, H. C. (1996). Liver copper storage and transport during development: implications for cytotoxicity. *Am. J. Clin. Nutrition*, 63, 812S-820S
- Mahaffey, K.R., (1991). Biokinetics of lead during pregnancy. *Fund. Appl. Toxicol.*, 16, 15-26.
- Mannervik, B. (1985). Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 113:490-5

- Marklund, S. L. (1984). Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. *Biochem J.* May 15;220(1):269-72.
- Masso, E.L., Corredor, L., Antonio, M.T. (2007). Oxidative damage in liver after *perinatal intoxication with lead and/or cadmium*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 21, 210-216.
- Maxwell, Sr., Thomason, H., Sandler, D., Leguen, C., Baxter, Ma., Thorpe, Gh., Jones, Af., Barnett, Ah. (1997). Poor glycaemic control is associated with reduced serum free radical scavenging (antioxidant) activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Clin Biochem.* Nov; 34 (Pt 6):638-44.
- McCord, J. M., Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. *J. Biological Chemistry*, 244(22), 6049-6055
- McCord, J. M. (1974). Free radicals and inflammation: Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science*, 185, 529-531
- McCord, J. M. (1984). Human disease, free radicals and oxidant balance. *Clin Biochem*, 26:351-357.
- McMillan, T. J., Stell, G. G. (1993). Molecular aspects of radiation biology: Basic Clinical Radiobiology. *Birinci baskı. Steel GG (ed) Edward Arnold Publishers*, London, S: 211-223.
- Mungan, G. (1996). Kan bankalarında CPDA-1 (Citrate Phosphate Dextrose Adenine) ile saklanan kanlarda allopürinölün lipid peroksidasyonu ve biyokimyasal parametrelere etkisinin incelenmesi. *Ankara Hastanesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya. Uzm. Tezi*, 67s (yayınlanmamış).

- Mylorie, A.A., Collins, H., Umbles, C., Kyle, J.(1986). Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicol Appl. Pharmacol.*, 82, 512-520.
- Necheles, T. F., Boles, T. A., Allen, D.M. (1968). Erythrocyte glutathione peroxidase deficiency and hemolytic disease of the newborn infant. *The Journal of Pediatrics*, 72,3,319-324. March.
- Ono, K., Hasegawa, K., Naiki, H., Yamada, M. (2004). Anti-amyloidogenic activity of tannic acid and its activity to destabilize Alzheimer's β -amyloidfibrils in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1690, 193-202.
- Paglia, D.E., Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 70:158-169,
- Palmer, T. (1990). Understanding Enzymes.
- Park, S. Y., Bok, S. H., Jeon, S. M., Park, Y.B., Lee, S.J., Jeong, T.S., Choi, M.S. (2002). Effect of rutin and tannic acid supplements on cholesterol metabolism in rats. *Nutrition Research*, 22, 283-295.
- Patra, R. C., Swarup, D., Dwivedi, S. K. (2001). Antioxidant effects of α -tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. *Toxicology*, 162, 81–88, (2001).
- Peuchen, S., Bolanos, J. P., Heales, S. J. R., Almeida, A., Duchon, M., Clark, J. B. (1997). Interrelationships between astrocyte function, oxidative stress and antioxidant status within the central nervous system. *Progress in Neurobiology*, Vol. 52, 261-281.

- Rachmilewitz, D., Karmeli, F., Ookan, E., Samuni, A. (1994). A novel antiulserogenic stable radical prevents gastric mucosal lesions in rats. *Gut*, 35:1181-1188.
- Reddy, S. V. K, Venkaiah, B., Chemical modification studies on isoenzymes of superoxide dismutase from bajra seedlings. *Phytochemistry*, 27(7), 1959-1960, (1988).
- Reiter, R.J. (1998). Oxidative damage in the central nervous system: Protection by melatonin. *Progress in Neurobiology*, 56, 359-384.
- Reiter, R. J., Pablos, M., Agapito, T. T., Guerrero, J. M. (1996). Melatonin in the context of the free radical theory of aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 786, 362-378
- Rice-Evans, C. A., Diplock, A. T., Symons, M. C. R. (1991). *Techniques in free radicals research*. Elsevier, Amsterdam, vol 22.
- Riemersma, R. A., Wood, D.A., Macintyre, C. C. A., Elton, R. A., Gey, K. F., Oliver, M. F. (1991). Risk of angina pectoris and plasma concentrations of vitamins A,C, and E and carotene. *The Lancet*, 337.
- Robards, K., Antolovich, M. (1997). Analytical chemistry of fruit bioflavonoids 'Critical Review'. *The Analyst*, 122, 1R-34R,
- Rousseau, P., Amstrong, M. (1990). Superoxide Dismutases-Production and Therapeutic Potential Pharmacological Technolooi Loruil.
- Sanghir, R., Gill, K.D. (1995). Efect of lead on lipid peroxidation in liver of rats. *Biol trace Elem Res* 48,91-7.

- Sahu, S. C., Gray, G. C. (1993). Interactions of flavonoids, trace metals and oxygen: nuclear DNA damage and lipid peroxidation induced by myricetin. *Cancer Lett*, 70, 73–79.
- Sahu, S. G., Gray, G.C. (1994). Kaempferol - induced nuclear damage and lipid peroxidation. *Cancer Lett*, 85, 159–164.
- Schmindtmann, S., Baehr, R.V., Precht, K. (1990). Free radicals induce increased lysis of red blood cells after hemodialysis nephrol dial. *Transplant 5*, 600-603.
- Schrauzer
- Sharma, R. A., Gescher, A. J., Steward, W. P. (2005). Curcumin: The story so far. *Eur. J. Cancer*, 41, 1955-1968.
- Shimizu, N., Kobayashi, K., Hayashi, K. (1984). The reaction of superoxide radical with catalase. *J. Biological Chemistry*, 259(7), 4414-4418, (1984).
- Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *European J. Biochemistry*, 215, 213-219
- Sies, H., Stahl, W. (1995). Vitamins E and C, beta- carotene and other carotenoids as antioxidants. *American J. Clinical Nutrition*, 62, 1315S-1321S
- Simonian, N. A., Coyle, J. T. (1996). Oxidative stress in neurodegenerative disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 36, 83-106.
- Sivasparad, R., Nagaraj, M., Varalakshmi, P. (2004). Combined efficacies of lipoic acid and 2,3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15, 18-23.

- Smirnoff, N., Pallanca, J.E. (1995). Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 24, 16.
- Smith, S., Halliwell, B., Aruma, O.I. (1992). Protection by albumin against pro oxidant actions of phenolic dietary components. *Food Chem Toxicol*, 30, 483–489.
- Stahl, W., Sies, H. (2002). Introduction: Reactive oxygen species. *Research Monographs*, 1-2.
- Takahashi, K., Cohen, H. J., (1986). Selenium-dependent glutathione peroxidase protein and activity: Immunological investigations on cellular and plasma enzymes. *Blood*, 68,3,640-645.
- Tanakol, R. (1998). Antioksidan vitaminler: Hastalıkta ve sağlıkta önemleri. *Klinik Gelişim*, 11:347-357.
- Tandon, S.K., Singh, S., Prasad, S., Srivastava, S., Siddiqui, M. K. J. (2002). Reversal of lead-induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant, or their combination in the rats. *Environ. Res., Section A* 90, 61–66.
- Thurman, R. G., Bradford, B. U., Iimuro, Y., Frankenberg, M. V., Knecht, K. T., Connor, H. D., Adachi, Y., Wall, C., Arteel, G. E., Raieigh, J. A., Forman, D. T., Mason, R. P., (1999). Mechanism of alcohol-induced hepatotoxicity: studies in rats. *Front. Biosci.* 4, 42–46.
- Touitou, Y. (2001). Human aging and melatonin. *Clinical relevance, Experimental Gerontology*, 36, 1083-1100
- Tudhope, G. R. (1967). Red cell catalase in health and in disease , with reference to the enzyme activity in anaemia. *Clin. Sci*, 33, 165-182.

Ünal, D. (1999). Serbest radikaller. *Sendrom, Mart*:68-80.

Wang, M., Ruan, D.Y., Chen, J.T., Xu, Y.Z., (2002). Lack of effects of vitamin E on aluminium-induced deficit of synaptic plasticity in rat dentate gyrus in vivo. *Food and Chemical Toxicology* 40, 471–478.

Wei, Q. Y., Chen, W. F., Zhou, B., Yang, L., Liu, Z. L. (2006). Inhibition of lipid peroxidation and protein oxidation in rat liver mitochondria by curcumin and its analogues. *Biochimica et Biophysica Acta* 1760 (2006) 70 – 77.

Wheeler, C. R., Salzman, J. A. (1990). Automated assays for superoxide dismutase, catalase, Glutathione peroxidase and Glutathione reductase activity. *Analytical Biochemistry*. 184,193-199.

Yanbeyi, S. (1999). Aspirin ve antioksidant butylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri. *Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Samsun, 88s* (yayınlanmamış).

EKLER

Tablolar Dizini

Tablo 1.1. Reaktif oksijen türleri

Tablo 1.2. Hücredeki serbest oksijen radikali kaynakları

Tablo 1.3. Farklı sanayi kuruluşlarından kaynaklanan metal kirlilikleri

Tablo 1.4. Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma sistemi

Tablo 2.1. Deneysel cihazlar

Tablo 2.2. SOD tayini için kullanılan kimyasal maddeler

Tablo 2.3. GSH-Px tayininde kullanılan kimyasal maddeler

Tablo 2.4. CAT tayininde kullanılan kimyasal maddeler

Tablo 2.5. LPO tayininde kullanılan kimyasal maddeler

Şekil Dizini

Şekil 1.1 Serbest oksijen radikallerinin oluşumu

Şekil 1.2 Oksijenin kısmi indirgenmesiyle oluşan toksik türler

Şekil 1.3 Glutatyon Redüktazın metabolizmadaki görevi

Şekil.1.4 Glutatyon metabolizması

Şekil 1.5 Glutatyonun yapısı

Şekil 1.6 Fizyolojik şartlar altında kurkiminin tautomerisi

Şekil 1.7 Tannik Asidin Molekül Yapısı

Şekil.2.1 a) Nazogastrik sonda uygulaması

b) Hayvan modelinin uygulanması

c) Ratların görünümü

Şekil 3.1 Kurşun stresi ile flavonoid yüklenmesinin lipid peroksidasyonuna etkisi

Şekil.3.2 Kurşun stresi ile flavonoid yüklenmesinin katalaz aktivitesine etkisi

Şekil.3.3 Kurşun stresi ile flovonoid yüklenmesinin glutatyon peroksidaz aktivitesine etkisi

Şekil.3.4 Kurşun stresi ile flovonoid yüklenmesinin süperoksit dismutaz aktivitesine etkisi

Kısaltmalar

CAT	: Katalaz
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GR	: Glutatyon redüktaz
GSH-S-T	: Glutatyon-S-transferaz
SOD	: Süperoksit dismutaz
β -NADPH	: β -Nikotinamid adenininükleotid fosfat
MDA	: Malondialdehit
GSH	: Glutatyon
GSSG	: Glutatyon disülfid (GSH'ın yükseltgenmiş formu)
ROS	: Reaktif oksijen türleri
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asidi
DHA	: Dehidroaskorbik asit