

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**YÜKSEK KOLESTEROLLÜ DİYETİN
RATLARDA DEĞİŞİK ORGANLARDAKİ
OKSİDAN / ANTİOKSİDAN DENGESİNE ETKİSİ
VE ANTİOKSİDAN VİTAMİNLERİN OLASI
ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Erdinç DEVRİM

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. İlker DURAK

ANKARA

2005

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Biyokimya Anabilim Dalı

Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan “Yüksek kolesterolü diyetin ratlarda değişik organlardaki oksidan / antioksidan dengesine etkisi ve antioksidan vitaminlerin olası rollerinin araştırılması” başlıklı, Dr. Erdinç Devrim’e ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Tıpta Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

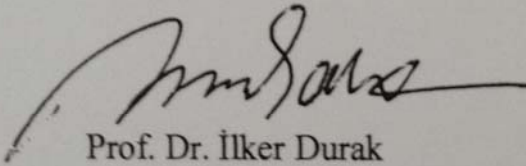
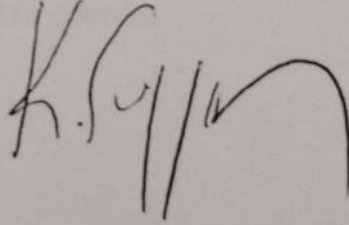
Tez Savunma Tarihi: 04/03/2005

Prof. Dr. Kadirhan Sunguroğlu

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Jüri Başkanı

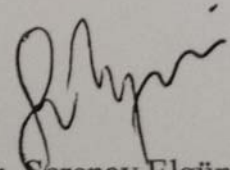


Prof. Dr. İlker Durak

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı



Doç. Dr. Serenay Elgün Ülkar

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Biyokimya Anabilim Dalı

Üye

ÖNSÖZ

Tıpta uzmanlık eğitimim boyunca hiçbir konuda yardımını esirgemeyen ve bana yol gösteren değerli Hocam ve Tez Danışmanım Sayın Prof. Dr. İlker Durak başta olmak üzere, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Kadirhan Sunguroğlu'na, anabilim dalımızın değerli öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Mustafa Akpoyraz ve Sayın Doç. Dr. Serenay Elgün Ülkar ile geçtiğimiz aylarda emekli olan Sayın Prof. Dr. Levent Karaca'ya, tez araştırmamın hayvan çalışmaları aşamasında özveriyle çalışan Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Hanefi Özbek'e, değerli öğretim görevlisi, uzman doktor, tıpta uzmanlık ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma katkı ve desteklerinden ötürü saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez araştırmamın laboratuvar deneyleri aşamasında benimle birlikte çalışan ve katkıda bulunan değerli laborant arkadaşlarıma ve anabilim dalımızın değerli diğer tüm çalışanlarına teşekkürler ederim.

Bugünlere gelmemde karşılığı ödenemeyecek emekleri olan sevgili Anne ve Babama, tanıştığımız günden beri bana her konuda destek olan ve güç veren sevgili Eşim Serpil Batkın Devrim'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	2
Önsöz	3
İçindekiler	4
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	6
Şekiller Dizini	9
Tablolar Dizini	10
1. GİRİŞ	11
2. GENEL BİLGİLER	13
2.1. Ateroskleroz	13
2.1.1. Aterosklerozun Oksidasyon Hipotezi	15
2.2. Kolesterol	16
2.3. Serbest Radikaller	17
2.3.1. Reaktif Oksijen Türleri	18
2.4. Lipit Peroksidasyonu	20
2.5. Antioksidan Savunma Mekanizmaları	21
2.5.1. Enzim Olan Antioksidanlar	22
2.5.1.1. Süperoksit Dismutaz	22
2.5.1.2. Katalaz	22
2.5.1.3. Glutasyon Peroksidaz	22
2.5.1.4. Glutasyon Redüktaz	23
2.5.1.5. Sitokrom Oksidaz	23
2.5.1.6. Glutasyon Transferaz	23
2.5.2. Enzim Olmayan Antioksidanlar	24
2.5.2.1. E Vitamini	24
2.5.2.2. C Vitamini (Askorbik Asit)	25
2.5.2.3. Glutasyon (GSH)	26
2.5.2.4. Karotenoid ve retinoidler	27
2.5.2.5. Melatonin	27
2.5.2.6. Ubikinonlar	27
2.5.2.7. Diğer Antioksidanlar	27

2.6. Oksidatif Stres	28
2.7. Serbest Radikallerin Biyolojik Ortamlarda Ölçümü	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Deney Hayvanları	30
3.2. Gereçler	31
3.2.1. Cihazlar	31
3.2.2. Kimyasal Maddeler	31
3.3. Protein Miktarı Ölçüm Yöntemi (Lowry Yöntemi)	31
3.4. Oksidan ve Antioksidan Parametrelerin Ölçüm Yöntemleri	32
3.4.1. Malondialdehit (MDA) Düzeyi Ölçüm Yöntemi	32
3.4.2. Antioksidan Potansiyel (AOP) Değeri Ölçüm Yöntemi	34
3.4.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçüm Yöntemi	36
3.4.4. Katalaz (KAT) Aktivitesi Ölçüm Yöntemi	37
3.4.5. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi Ölçüm Yöntemi	38
3.4.6. Ksantin Oksidaz (XO) Aktivitesi Ölçüm Yöntemi	39
3.5. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	40
4. BULGULAR	41
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇLAR	54
ÖZET	55
SUMMARY	56
KAYNAKLAR	57
EKLER	
EK 1. Etik Kurul Kararı	64

Not: Tezin basılı kopyasındaki sayfa numaralandırması; ön sayfalarda “i, ii, ..., ix”, “Giriş” bölümünden itibaren “1, 2, ..., 54” şeklinde yapılmıştır.

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AIDS: Edinilmiş bağışıklık yetmezliği sendromu

ALP: Alkalen fosfataz

ALT: Alanin aminotransferaz

ANOVA: Tek yönlü varyans analizi

AOP: Antioksidan potansiyel

AST: Aspartat aminotransferaz

ATP: Adenozin trifosfat

α -TTP: α -tokoferol taşıyıcı protein

Cl: Klor

Cu: Bakır

ÇDYA: Çoklu doymamış yağ asidi

d: Yoğunluk

dk: Dakika

dl: Desilitre

DM: Diabetes mellitus

Δ OD: Absorbans (optik dansite) farkı

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

ESR: Elektron spin rezonans

F: Faktör

Fe: Demir

g: Yerçekimi ivmesi

gr: Gram

GSH: Glutasyon (İndirgenmiş, redükte)

GSH-Px: Glutasyon peroksidaz

GS-SG: Yükseltgenmiş (okside) glutasyon

H₂O: Su

H₂O₂: Hidrojen peroksit

HCl: Hidroklorik asit

HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein

HOCl: Hipoklorik asit

HOO: Hidroperoksil radikali
ICAM: İntersellüler adezyon molekülü
IDL: Ara (*intermediate*) yoğunluklu lipoproteinler
IL: İnterlökin
IU: İnternasyonal ünite
i.m: İntramuskuler (kas içine)
i.p: İnteraperitonyal (periton içine)
KAT: Katalaz
L: Litre
L: Lipit radikali
LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein
Li₂SO₄: Lityum sülfat
LO: Lipit alkoksil radikali
LOO: Lipit peroksil radikali
LOOH: Lipit hidroperoksit
M: Molarite (mol/L); molar
MCP: Monosit kemotaktik protein
MCSF: Makrofaj koloni-stimüle edici faktör
MDA: Malondialdehit
mg: Miligram
mIU: Miliinternasyonal ünite
ml: Mililitre
mM: Milimolar
mmol: Milimol
Mn: Mangan
µl: Mikrolitre
µmol: Mikromol
NBT: Nitroblue tetrazolium
Na₂MoO₄: Sodyum molibdat
Na₂WO₄: Sodyum tungstat
Nm: Numune
nm: Nanometre

nmol: Nanomol
NO $\cdot$: Nitrik oksit radikali
NO $_2\cdot$: Nitrojen dioksit radikali
NOS: Nitrik oksit sentaz
o-fosforik asit: Orto fosforik asit
O $_2$: Moleküler oksijen
O $_2\cdot^-$: Süperoksit radikali
OD: Optik dansite, absorbands
OH $\cdot$: Hidroksil radikali
ONOO $\cdot$: Peroksinitrit
Ort.: Aritmetik ortalama
ROT: Reaktif oksijen türleri
SD: Standart sapma
SOD: Süperoksit dismutaz
TBA: Tiyobarbiturik asit
TBARS: Tiyobarbiturik asitle reaksiyona giren maddeler
TCA: Trikloroasetik asit
TEP: Tetra etoksi propan
TNF: Tümör nekrozis faktör
U: Ünite
VCAM: Vasküler hücre adezyon molekülü
VLDL: Çok düşük yoğunluklu lipoproteinler
v/v: Hacim/hacim
w/v: Ağırlık/hacim
w/w: Ağırlık/ağırlık
XO: Ksantin oksidaz
Zn: Çinko

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Kolesterolün yapısı	16
Şekil 2.2: E vitamininin yapısı	24
Şekil 2.3: C vitamininin yapısı	25

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1: Protein miktarı ölçüm yöntem protokolü	32
Tablo 3.2: MDA düzeyi ölçüm yöntem protokolü	33
Tablo 3.3: AOP değeri ölçüm yöntem protokolü	35
Tablo 3.4: SOD aktivitesi ölçüm yöntem protokolü	37
Tablo 3.5: GSH-Px aktivitesi ölçüm yöntem protokolü	39
Tablo 3.6: XO aktivitesi ölçüm yöntem protokolü	40
Tablo 4.1: Ratların (n=24) çalışma başı kan biyokimya değerleri	41
Tablo 4.2: Ratların gruplara göre çalışma sonu kan biyokimya değerleri	42
Tablo 4.3: Çalışma sonu kan biyokimya değerlerinin istatistiksel değerlendirmesi (ANOVA ve Post hoc Tukey HSD testiyle çoklu karşılaştırmaları).	43
Tablo 4.4: Böbrek dokusunda oksidan-antioksidan parametreler (Ort. $\pm$ SD).	44
Tablo 4.5: Kalp dokusunda oksidan-antioksidan parametreler (Ort. $\pm$ SD)	44
Tablo 4.6: Karaciğer dokusunda oksidan-antioksidan parametreler (Ort. $\pm$ SD)	45
Tablo 4.7: Testis dokusunda oksidan-antioksidan parametreler (Ort. $\pm$ SD)	45
Tablo 4.8: Oksidan-antioksidan parametrelerin çoklu karşılaştırmaları	46

1. GİRİŞ

Ateroskleroz günümüzde gelişmiş ülkelerde en başta gelen ölüm nedenidir (1). Ateroskleroz oluşumu için risk faktörleri arasında lipit bozuklukları, hipertansiyon, insülin rezistansı, sigara kullanımı, yetersiz fiziksel aktivite, obezite, yaş, erkek cinsiyet ve genetik faktörler sayılabilir. Lipit bozuklukları adı altında toplanan durumlar ise yüksek serum total kolesterolü (hiperkolesterolemi), yüksek LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein)-kolesterol ve düşük HDL (yüksek yoğunluklu lipoprotein)-kolesterol düzeyleridir (2).

Kolesterol ve doymuş yağ asitlerinin diyetle yüksek miktarlarda alınması direk olarak LDL kolesterol düzeylerini yükseltir (2). Hiperkolesteroleminin artmış oksidatif stres ve buna bağlı lipit peroksidasyonuna yol açtığı da gösterilmiştir (3). Serbest radikaller ve lipit peroksidasyon ürünleri LDL'nin oksidatif modifikasyonuna yol açarak ateroskleroz patogenezinde sorumlu tutulmaktadırlar. LDL'nin oksidasyonunun ateroskleroz patogenezindeki rolü bir çok *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir ve yoğun araştırmalara konu olmaktadır (4,5). LDL'nin oksidasyonunun ateroskleroz oluşumundaki rolüne dayanarak, çeşitli antioksidanların bu oluşum üzerindeki olası önleyici rollerine yönlendirilmiş çok sayıda çalışmalar vardır. Araştırmalara konu olan antioksidanlar içinde askorbik asit (C vitamini), alfa-tokoferol (E vitamini), beta-karoten, ubikinon (koenzim Q10), bioflavonoidler ve selenyum yer almaktadır (2). Bu antioksidanlar içinde E vitamini yağda çözünen en güçlü antioksidan ajandır. C vitamini de suda çözünen güçlü bir antioksidan olup E vitamininin rejenerasyonunda rol almaktadır. Bu nedenle C ve E vitaminlerinin kombine kullanımının daha yararlı olabileceği söylenmektedir (6-8). Laboratuvar hayvanlarında yapılan çeşitli çalışmalar antioksidanların antiaterojenik özelliklerini desteklemektedir (9,10). Tümü olmamakla birlikte bazı epidemiolojik veriler diyetle alınan antioksidanların KAH (koroner arter hastalığı) riskini düşürdüğü görüşüne destek vermektedir (10).

Bu çalışmada yüksek kolesterollü diyetle beslenmenin çeşitli organlardaki oksidan-antioksidan sistem üzerinde ne gibi etkilere yol açığının ve antioksidan vitaminler olan C ve E vitaminlerinin birlikte kullanımının bu etkiler ve hiperkolesterolemi üzerindeki olası rollerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla normal beslenen, yüksek kolesterolli diyetle beslenen ve yüksek kolesterolli diyetle beslenip C ve E vitaminleriyle desteklenen ratlardan (sıçanlardan) kan alınarak biyokimyasal parametreleri çalışılmış ve bu hayvanlardan çıkarılan böbrek, kalp, karaciğer ve testis dokularında, lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak kabul edilen malondialdehit (MDA) düzeyleri, endojen süperoksit üretiminde rol oynayan ksantin oksidaz (XO) enzim aktivitesi, antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (KAT) aktiviteleri ile antioksidan potansiyel (AOP) değerleri ölçülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ateroskleroz

Ateroskleroz orta ve büyük çaplı arterlerin kan akımını azaltabilen veya tıkalayabilen subintimal kalınlaşmalarıyla (aterom) karakterize bir arterioskleroz formudur. Gelişmiş ülkelerdeki en sık ölüm nedeni aterosklerozdur (1). Aterosklerotik lezyonun bulunduğu yere göre klinik sonuçlar değişkenlik gösterir, örneğin koroner arterin aterosklerozu miyokard enfarktüsü ve anjina pectorise yol açarken, merkezi sinir sistemini besleyen arterlerin aterosklerozunda felç ya da geçici iskemik atak görülebilir. Aterosklerotik lezyonlar sıklıkla kan akımının bozulduğu yer olan arterlerin ayrım noktalarında oluşur (1).

Aterosklerotik plak, birikmiş intrasellüler ve ekstrasellüler lipitler, düz kas hücreleri, bağ dokusu ve glukozaminoglikanlardan oluşur. Aterosklerozun belirlenebilen en erken lezyonu lipit yüklü köpük hücrelerinin oluşturduğu yağlı çizgilenmedir. Bu daha sonra, bağ dokusuyla çevrilmiş intimal düz kas hücreleri ile intrasellüler ve ekstrasellüler lipitten oluşan fibröz plağa dönüşür.

Ateroskleroz oluşumunun majör risk faktörleri arasında lipit bozuklukları, hipertansiyon, diabetes mellitus (DM), sigara kullanımı, obezite, yetersiz fiziksel aktivite, aterojenik diyet, yaş, erkek cinsiyet ve genetik faktörler yer almaktadır. Lipit bozuklukları adı altında yüksek serum total kolesterol, yüksek serum LDL-kolesterol ve düşük serum HDL-kolesterol düzeyleri tanımlanmaktadır. Majör risk faktörü olmaya aday diğer lipit bozuklukları arasında hipertrigliseridemi, artmış lipoprotein artıkları, artmış lipoprotein a ve küçük LDL partikülleri bulunmaktadır. Majör risk faktörü olmaya aday lipit dışı durumlarsa hiperhomosisteinemi, trombojenik-hemostatik faktörler, inflamatuvar belirteçler ve bozulmuş açlık glukozudur (2).

Aterosklerozun başlangıcı lipoprotein birikimi ve modifikasyonu ile başlar. Yağlı çizgilenme aterosklerozun başlangıç lezyonudur. Bu erken lezyonların oluşumu en sık olarak arter duvarının intima bölgesindeki lipoprotein içeriğinin artmasından kaynaklanıyor görünmektedir. Bu lipoproteinlerin, lipitten zengin yapıların arter duvarında kalmasını uzatan ekstrasellüler matriks yapılarına

bağlandıkları ve böylece intimada biriktikleri düşünülmektedir. İntimanın ekstrasellüler boşluğunda bulunan özellikle matriks makromoleküllerine bağlı olan lipoprotein partikülleri kimyasal modifikasyonlara uğrayabilirler. Lipoproteinlerin böyle modifikasyonlara uğramasının ateroskleroz patogenezinde önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir. İntimanın ekstrasellüler boşluğunda plazma antioksidanlarından ayrılmış bulunan lipoproteinler oksidatif modifikasyonlara özellikle duyarlıdır. LDL'nin oksidasyonu sonucu, lipid ve protein yapıları oksidatif modifikasyona uğrarlar. Lipitlerin oksidasyonu ile hidroperoksitler, lizofosfolipitler, oksisteroller ve yağ asitlerinin aldehidik yıkım ürünleri oluşur. Apoprotein yapılarının modifikasyonu sonucu peptid iskeletinde yıkım ve bazı amino asit kalıntıları oluşur. Diyabetik hastalarda hiperglisemi sonucu lipoproteinlerin non-enzimatik glikasyonunun da aterogeneizde rolü olduğu düşünülmektedir (1).

Ekstrasellüler lipid birikiminden sonra lökositlerin (monosit ve lenfositler) bölgeye toplanması yağlı çizgilenme oluşumunun ikinci basamağıdır. Arter endotel hücrelerinin yüzeylerinde bulunan lökositler için adezyon molekül ya da reseptörle bu toplanmadan sorumludurlar. Bu moleküller; vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1), intersellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve P-selektindir. Lizofosfatidilkolin (LDL oksidasyon ürünü) VCAM-1 ekspresyonunu artırabilir. *Laminar shear* güçleri VCAM-1'i baskırlar, aynı zamanda endotel tarafından üretilen nitrik oksiti (NO) artırır. NO düşük düzeylerde lokal antiinflamatuvar etki göstererek lokal VCAM-1 ekspresyonunu sınırlar. Arter ayrım noktalarında genellikle laminar akım bozuklukları olmaktadır, bu durum aterosklerozun ayrım noktalarında daha sık görülmesini açıklayabilir. Lökositler arter endoteline yapıştıktan sonra endotel katmanına penetre olur ve intimaya yerleşirler. İnterlökin-1 (IL-1) ve tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) gibi sitokinler endotel hücrelerindeki VCAM-1 ve ICAM-1'i artırır. Modifiye lipoproteinler damar duvar hücrelerinden sitokin salınımını indükledikleri için, bu olay lipoproteinlerin birikmesi ve modifikasyonu ile lökosit toplanması arasında bir bağlantı kurulmasını sağlayabilir. Ayrıca okside LDL lökositlerin kemotaksisini de artırabilir.

İntimaya yerleştikleri zaman mononükleer fagositler makrofajlara farklılaşırlar ve lipid yüklü köpük hücrelerine dönüşürler. Mononükleer fagositlerin köpük hücrelerine dönüşümü lipoprotein moleküllerinin reseptör bağımlı endositozunu

gerektirir. İyi tanımlanmış LDL reseptörlerinin bu alımı gerçekleştirdiği düşünülebilir. Ancak genetik değişiklikler nedeniyle efektif LDL reseptörlerinden yoksun hastaların ve hayvanların da yaygın arteriyel lezyonlara sahip oldukları ve ayrıca da makrofajdan türemiş köpük hücrelerinden zengin ekstraarteriyel ksantomaları olduğu görülmüştür. Dahası, ekzojen kolesterol alımı ve hücre içi yüksek kolesterol düzeyleri LDL reseptörlerini baskılamaktadır. Böyle yüksek kolesterol düzeylerinde hücre yüzeyindeki LDL reseptörleri azalabilir. Makrofaj *scavenger* (çöpçü, temizleyici) reseptörleri ise, hücre içi kolesterol düzeyleriyle kontrol edilemezler ve okside LDL'yi tanıyarak endositozu gerçekleştirirler. Çöpçü reseptörlere sahip olan makrofajlar ekstrasellüler boşluktaki lipitleri emerek lipoproteinleri, gelişmekte olan lezyon bölgesinden uzaklaştırabilirler. Bazı lipit yüklü makrofajlar arter duvarını terk edebilir ve arterden lipitin temizlenmesinde işlev görebilirler. Lipit birikimi ve sonucunda aterom oluşumu, eğer arter duvarına giren lipit miktarı maktofajlarca ya da başka yollarla uzaklaştırılan lipit miktarını aşarsa gerçekleşir. Bazı lipit yüklü makrofajların zamansız ölümü veya *apoptosis* sonucu *necrotik core* denilen lipitten zengin merkezli bir aterosklerotik plak oluşur. Mononükleer fagositler tarafından üretilen çok sayıda büyüme (*growth*) faktörü veya sitokinler aterosklerotik plakta biriken düz kas hücre çoğalmasını ve ekstrasellüler matriks üretimini uyarabilirler (1).

Özetleyecek olursak; yağlı çizgilenme köpük hücreleri olarak da bilinen kolesterol yüklü makrofajları içerir. Düz kas hücrelerinin lezyonda çoğalmasıyla daha ileri bir lezyon olan fibröz plak oluşur. Kalsifikasyon, aşırı ekstrasellüler lipit birikimi ve *necrotik core* oluşumuyla da gelişmiş lezyon meydana gelir.

2.1.1. Aterosklerozun Oksidasyon Hipotezi

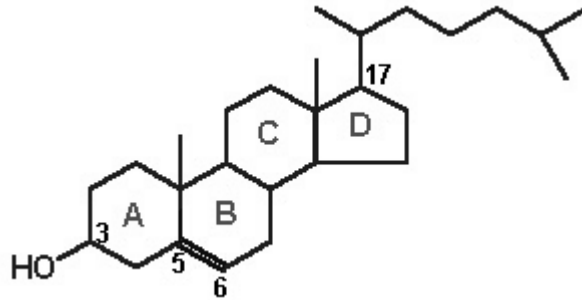
LDL, damarda aterosklerozun erken evrelerinde önemli rol oynadığı düşünülen okside-LDL'ye dönüşmek üzere oksitlenir. Okside-LDL birçok biyolojik özelliklere sahiptir; örneğin, dolaşımdaki monositler için kemoattraktandır, hücre çoğalmasını ve sitotoksiteyi indükler. Endotel hücreleri ve makrofajları uyararak monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1) ve makrofaj koloni-stimüle edici faktör (MCSF) gibi çeşitli sitokinlerin üretimini de indükler. Dahası, okside LDL endotel hücreleri ve

monositleri uyarak hücre yüzeyinde adezyon moleküllerinin ekspresyonuna yol açar. Monositlerden türemiş makrofajlar okside-LDL'yi çöpü reseptörler yoluyla tanıyarak alır ve köpük hücrelerine dönüşürler. Arter duvarındaki kalınlaşmayı artıran düz kas hücre çoğalması da sitokinler ve okside-LDL'nin indüklemesiyle gerçekleşir (11).

LDL oksidasyonunun olası mekanizmaları arasında serbest radikaller, reaktif oksijen türleri (örneğin; süperoksit), bakır ve demir iyonları, lipooksijenazlar, homosistein, miyeloperoksidaz ve reaktif nitrojen türleri suçlanmaktadır (11).

2.2. Kolesterol

Vücuttaki temel lipitlerden biri olan kolesterol yüksek molekül ağırlıklı doymamış bir steroid alkol olup, bir perhidrosiklopentanrolin halkası ve 8 karbonlu bir yan zincir içerir.



Şekil 2.1: Kolesterolün yapısı.

Kolesterol tüm hücre zarlarının yapım ve onarımında, safra asit ve D vitaminin sentezinde kullanılır, ayrıca tüm steroid hormonların öncülüdür. Ester formunda üçüncü karbondaki OH grubu yerini bir yağ asidi alır. Dolaşımdaki kolesterolün üçte ikisi kolesterol esteri halindedir. Kolesterolün eksojen (diyetle) ve endojen (özellikle karaciğerde sentezlenir) kaynakları vardır (12).

Kolesterol dolaşımda lipoproteinler içinde taşınır. Lipoproteinler yoğunluklarına göre aşağıdaki gibi sınıflandırılırlar:

- Şilomikronlar
- Çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL)
- Ara (*intermediate*) yoğunluklu lipoproteinler (IDL)
- Düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL)
- Yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL)

LDL'nin ağırlığının yaklaşık % 50'si kolesterolden oluşur ve kolesterolden en zengin lipoproteindir. Ultrasantrifüj yöntemleri kullanılarak değişik büyüklük ve kompozisyona sahip LDL parçacıkları saptanmıştır. Daha küçük ve yoğun LDL parçacıklarının daha yüksek KAH riskine yol açtığı gösterilmiştir (12).

HDL en küçük lipoprotein türüdür ve toplam plazma kolesterolünün yaklaşık % 20-35'ini taşır. Ancak kolesterolü dokulara taşıyan LDL'nin tersine, HDL dokulardaki fazla kolesterolü karaciğere geri taşır (*reverse transport*) (12).

2.3. Serbest Radikaller

Son yörüngesinde bir veya daha çok sayıda eşlenmemiş elektron bulunan atom ya da moleküle serbest radikal denir (13). Çok reaktif maddelerdir, çeşitli tepkimelerde oksidan ve redüktan olarak görev yapabilirler. Lipit peroksidasyonunda da rol alırlar.

Serbest radikallere süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil ($OH^{\cdot}$), peroksil ($LOO^{\cdot}$), alkoksil ($LO^{\cdot}$), hidroperoksil ($HOO^{\cdot}$), nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) ve nitrojen dioksit ($NO_2^{\cdot}$) radikalleri örnek gösterilebilir.

Serbest radikaller 3 değişik yolla oluşabilirler (14):

- Bir molekülün kovalent bağının molekülün her bir parçasında eşleşmiş elektronlardan bir tanesinin kalacak biçimde (homolitik) bölünmesiyle;

$$(A \cdot B \rightarrow A^{\cdot} + B^{\cdot})$$
- Bir molekülden tek bir elektron kaybı ya da bir molekülün kovalent bağındaki iki elektronun bir atomda kalacak biçimde (heterolitik) bölünmesiyle;

$$(A \rightarrow A^{+} + e^{-}) \text{ ya da } (A \cdot B \rightarrow A^{\cdot-} + B^{+})$$
- Bir moleküle tek bir elektron eklenmesiyle;

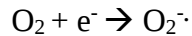
$$(A + e^{-} \rightarrow A^{\cdot-})$$

Biyolojik ortamlarda serbest radikal oluşumunda en sık görülen yol moleküle bir elektron eklenmesidir. Serbest radikaller pozitif ya da negatif yüklü olabilecekleri gibi yüksüz (*nötr*) de olabilirler.

2.3.1. Reaktif Oksijen Türleri

Oksijenin tamamlanmamış indirgenmesiyle ya da elektron düzeninin değişmesiyle oluşan reaktif oksijen türleri (ROT) süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) ve hidroksil ($OH^{\cdot}$) radikali ile radikal olmayan ancak çok reaktif bir molekül olan hidrojen peroksit (H_2O_2), *singlet* oksijen, hipoklorik asit ($HOCl$), peroksinitrit ($ONOO^{\cdot-}$), hidroperoksil ($HO_2^{\cdot}$), lipid hidroperoksit ($LOOH$), nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) ve nitrojen dioksiti ($NO_2^{\cdot}$) kapsamaktadır (15).

Moleküler oksijen (O_2) dış yörüngesinde eşlenmemiş 2 elektron içerdiği için bir diradikaldır. Bu elektronlar birbirine paralel iki farklı spinde yer alırlar. Termodinamik olarak oksijen kararlı hale geçebilmek için, daha az serbest enerji içeren suya dönüşmek amacıyla (atom başına 2, molekül başına 4) ek elektron almak ister. Ancak, oksijen molekülündeki elektronların dağılımı nedeniyle spin uyumlu bir elektron çifti alamaz. Bunun yerine elektronları birer birer alır ve böylece süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) anyon radikali oluşur (15).



O_2 : 16 proton, 16 elektron, yüksüz, diradikal.

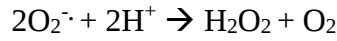
$O_2^{\cdot-}$: 16 proton, 17 elektron, negatif yüklü, süperoksit anyon radikali.

Süperoksit anyon radikalinin hücre içi en önemli kaynağı elektron transport zincirindeki kaçak elektronlar olmakla birlikte (15), moleküler oksijenden çeşitli yollar aracılığıyla oluşabilir (13,16-18):

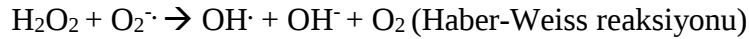
- NADPH'ın NADPH oksidaz ile oksitlenmesi sırasında,
- Ksantin ve hipoksantin'in ksantin oksidaz tarafından oksitlenmesi sırasında,
- İndirgeyici ajanların mitokondriyal elektron transport sistemi tarafından oksitlenmesiyle,

- Geçiş metallerinin varlığında monoaminler, flavinler ve hemoglobinin otooksidasyonuyla,
- Moleküler oksijenin P-450 enzim sisteminde tek elektronla indirgenmesiyle ve
- Moleküler oksijenin nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından arjinin ya da tetrahidrobiopterin eksikliğinde tek elektronla indirgenmesi sırasında.

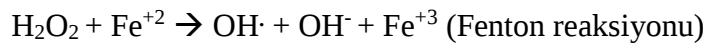
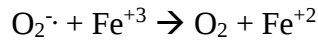
Eğer moleküler oksijene 2 elektron taşınırsa hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşur (15). Biyolojik sistemlerde bu genellikle süperoksit dismutaz (SOD) enzimince katalizlenen ya da kendiliğinden oluşan 2 süperoksit molekülünün girdiği reaksiyonla gerçekleşir:



Bu reaksiyon bir dismutasyon reaksiyonudur ve süperoksit anyon radikallerinden biri oksidan (yükseltgeyici) diğeri redüktan (indirgeyici) rol oynamaktadır (15). Sitokrom P-450, D-amino asit oksidaz, asetil koenzim A oksidaz ve ürik asit oksidaz enzimleri de moleküler oksijene 2 elektron taşıyarak H_2O_2 oluşumuna yol açabilirler. Hidrojen peroksit molekülü bir radikal değildir, ancak halen 2 elektron daha alma isteğinde olan kararsız bir yapıdadır. Geçiş metalleri olan ferröz demir (Fe^{+2}) ve kuprik bakır (Cu^{+1}) H_2O_2 'ye bir elektron vererek O-O bağının açılmasına, böylece de hidroksil ($OH^{\cdot}$) radikali oluşturma kapasitesine sahiptir (15).



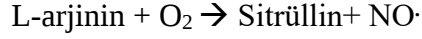
Bu reaksiyon yukarıdaki gibi kendiliğinden olabilir ancak geçiş metalleri tarafından katalizlendiğinde daha hızlı gerçekleşir.



Hidroksil radikali yarı ömrü oldukça kısa ancak çok tahrip edici bir moleküldür. Ayrım göstermeksizin her türlü organik molekülü oksitleyebilir (19).

Moleküler oksijende eşlenmemiş ancak paralel spinlerde bulunan elektronların spinlerinin anti paralel hale geçmesiyle daha kararsız olan *singlet* oksijen oluşur. Bu molekül de bir diradikaldır.

Nitrik oksit (NO $\cdot$) L-arjinin amino asidini moleküler oksijeni kullanarak oksitleyen NOS enzimi tarafından katalizlenen bir reaksiyonla sentezlenir (20).



Nitrik oksit moleküler oksijenle reaksiyona girerek nitrojen dioksiti (NO $_2\cdot$) oluşturabilir. Bu radikal de H $_2$ O $_2$ ile reaksiyon vererek hidroksil radikalini meydana getirebilir. Nitrik oksit H $_2$ O $_2$ ya da O $_2\cdot$ ile reaksiyona girerek onlardan daha oksidan bir ajan olan peroksinitriti (ONOO $\cdot$) oluşturabilir. Bununla birlikte, nitrik oksitin antiaterojenik etkileri olduğuna yönelik ciddi bulgular da vardır (11).

Güçlü bir oksidan ajan olan HOCl, genellikle immünolojik olarak aktive edilmiş fagositlerde, miyeloperoksidaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla H $_2$ O $_2$ ve Cl $^-$ (klorür) anyonundan oluşur (11).

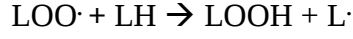
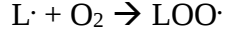
2.4. Lipit Peroksidasyonu

Reaktif oksijen türlerinden biri çoklu doymamış yağ asidi (ÇDYA) molekülünden bir hidrojen atomu kopardığı zaman karbon merkezli bir lipit radikali (L $\cdot$) oluşur. Bu lipit radikaline bir oksijen molekülü katılarak lipit peroksil radikali (LOO $\cdot$) meydana getirir. Lipit peroksil radikali başka bir ÇDYA'den bir hidrojen atomu alıp kendisi lipit hidroperoksite (LOOH) dönüşürken yeni bir lipit radikali oluşturur. Oluşan lipit hidroperoksit kolaylıkla dekompoze olarak lipit alkoksil (LO $\cdot$) radikali haline gelir. Bu başlangıç ve ilerleme (*propagasyon*) evrelerini yıkım (*degradasyon*) evresi izler ve lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA oluşur. Bu zincirleme reaksiyonlar E vitamini gibi bir antioksidan ajanın devreye girerek fenolik hidrojenini vermesi ya da iki peroksil radikalinin birleşmesiyle sonlanır. Ateroskleroz oluşumunda suçlanan LDL oksidasyonu da bir lipit peroksidasyon sürecinin sonucudur (21).

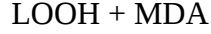
Başlangıç:



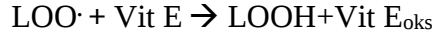
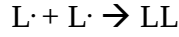
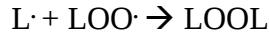
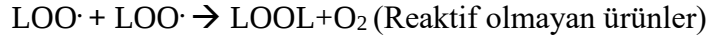
İlerleme:



Yıkım:



Sonlanma:



2.5. Antioksidan Savunma Mekanizmaları

Antioksidan savunma mekanizmaları serbest radikallere karşı etkilerini başlıca 4 yolla gösterirler (19):

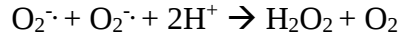
- Radikal reaksiyonlarının sonlandırılması
- Radikal oluşumunun sınırlandırılması
- Oluşan radikallerin detoksifiye edilmesi
- Oksidatif hasara uğramış yapıların onarımı veya ortamdan uzaklaştırılması

Oksitlenebilecek bir maddeyle aynı ortamda ancak ona göre çok daha düşük konsantrasyonda bulunup, o yapının oksitlenmesini önleyen ya da geciktiren maddeye antioksidan denir (22). Antioksidanlar yapılarına, yerleşimlerine, kaynaklarına, çözünürlüklerine ve etkilerine göre sınıflandırılabilirler. Antioksidanlar yapılarına göre enzim olanlar ve enzim olmayanlar olarak ikiye ayrılırlar.

2.5.1. Enzim Olan Antioksidanlar

2.5.1.1. Süperoksit Dismutaz

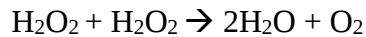
Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi süperoksit anyonunun H_2O_2 ve moleküler oksijene çevrildiği reaksiyonu katalizler (15). SOD enziminin Cu-Zn, Mn ve Fe içeren 3 tip izoenzimi vardır. İnsanda ise SOD enziminin 2 izoenzimi bulunur. Bakır ve çinko içeren CuZn-SOD sitozolde, mangan içeren Mn-SOD mitokondride çalışır. Demir içeren Fe-SOD ökaryotlarda bulunmaz.



Bu reaksiyonda SOD enzimi süperoksit anyon radikalinden birini kullanarak diğerini oksitlemektedir. Bu enzimin temel görevi hücre yapılarını süperoksitin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Reaksiyon SOD tarafından katalizlendiği zaman spontan reaksiyona göre yaklaşık olarak 4000 kat daha hızlı gerçekleşmektedir. Bu da SOD enziminin antioksidan savunmadaki önemini göstermektedir.

2.5.1.2. Katalaz

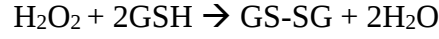
Katalaz (KAT) enzimi H_2O_2 'nin su ve moleküler oksijene çevrildiği reaksiyonu katalizleyen bir hemoproteindir. Dört tane hem grubu içerir. Hücre içindeki asıl yerleşimi peroksizomdur. Bu enzim de SOD'ye benzer biçimde 2 hidrojen peroksit molekülünden birini kullanarak diğerini oksitler (14,15).



2.5.1.3. Glutatyon Peroksidaz

İndirgenmiş glutatyon (GSH) varlığında H_2O_2 ve lipid peroksitlerin parçalanmasında rol alır. Aktif bölgesinde 4 tane selenyum atomu içerir. Enzim

sitozolde bulunur. Bu enzim lipid peroksitleri de indirgeyebilir ve bu nedenle lipid peroksidasyonunun önlenmesinde önemli role sahiptir (15).



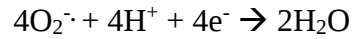
2.5.1.4. Glutasyon Redüktaz

Hidrojen peroksitin indirgenmesi sırasında GSH oksitlenir. GSH-Px'in etkisinin sürebilmesi için oksitlenmiş glutasyonun (GS-SG) yeniden indirgenmesi gerekir. Bu reaksiyon NADPH bağımlı bir flavoprotein olan GSH redüktaz tarafından katalizlenir.



2.5.1.5. Sitokrom Oksidaz

Mitokondride elektron taşıma (solunum) zincirinin son basamağında yer alan ve bakır içeren bu enzim süperoksit anyonunun suya dönüşümünü sağlar.



2.5.1.6. Glutasyon Transferaz

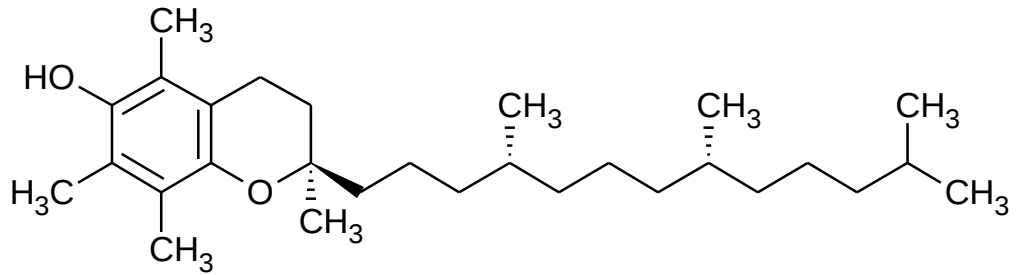
Araşidonik ve linoleik asit hidroperoksitleri başta olmak üzere lipid peroksitlerine karşı selenyumdan bağımsız GSH-Px aktivitesi gösterir.



2.5.2. Enzim Olmayan Antioksidanlar

2.5.2.1. E Vitamini

Yağda çözünen bir vitamin olan E vitamini yalnızca bitkilerce sentezlenen tokoferol ve tokotrienollerin bir karışımıdır (α -, β -, γ -, δ -tokoferol ve α -, β -, γ -, δ -tokotrienol). Tümü kromanik bir çekirdek ve alifatik bir yan zincire sahiptir. İçlerinde α -tokoferol en yüksek antioksidan güce sahiptir. Bitkisel yağ ve tohumlar zengin E vitamini kaynaklarıdır. İnsanlarda E vitamini besinsel yağlarla birlikte ince bağırsağın proksimal kısmından emilerek şilomikronların içinde lenf sıvısına, ardından da sistemik dolaşıma geçer. Burada endotelyal lipoprotein lipaz etkisiyle şilomikronlar hidrolize uğrar, E vitaminin bir bölümü plazmaya salınır ve hücreler tarafından alınır. Karaciğere gelen şilomikron artıklarındaki tokoferoller LDL reseptörleri aracılığıyla alınır, hepatositlerde yüksek miktarda bulunan α -tokoferol taşıyıcı protein (α -TTP) özel olarak α -tokoferölü VLDL'nin sentezlendiği organellere gönderir. Kana salınan VLDL lipoprotein lipaz tarafından LDL'ye dönüştürülürken, α -tokoferol de kanda en çok LDL ve HDL fraksiyonlarında (% 90), özellikle de LDL'de bulunur (6).



Şekil 2.2: E vitamininin yapısı.

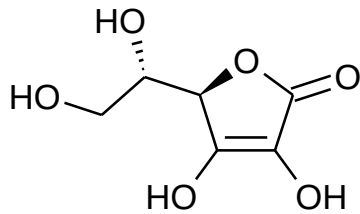
E vitamini yağda çözünen en güçlü antioksidandır. Peroksinitritten türeyen serbest radikalleri temizler, ÇDYA'den lipit hidroperoksitlerinin oluşumunu önler (zincir reaksiyonunu kırıcı özellik), LDL'nin yapısında yüksek konsantrasyonlarda bulunması itibarıyla LDL'yi oksidasyona karşı korur. Aterosklerotik süreçte hücre

adezyonunu, düz kas hücre çoğalmasını, plateletlerin adezyon ve agregasyonunu inhibe ettiğine yönelik bilgiler vardır (6).

Bunlarla birlikte E vitaminin prooksidan özellikleri olduğunu gösteren yayınlar da vardır. Bu durum α -tokoferoksil radikali C vitamini ya da ubikinol-10 tarafından indirgenmezse olabilmektedir (23). Ancak *in vivo* fizyolojik koşullarda prooksidan etki gösterip göstermediği henüz netlik kazanmamıştır.

2.5.2.2. C Vitamini (Askorbik Asit)

Suda çözünen bir vitamin olan C vitamini organizmanın normal metabolik işlevleri için gerekli bir moleküldür. İnsanlar C vitaminini sentezleyecek enzimin geninden yoksun oldukları için diyetle alınması zorunludur. Taze meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunur. C vitamini kollajen, karnitin ve nörotransmitterlerin biyosentezinde görev yapan bir çok enzimin kofaktörüdür. Bu reaksiyonlarda C vitaminin temel rolü çeşitli mono- ve di-oksijenazların aktif merkezlerindeki metal iyonlarını indirgemektir. Bu özellik C vitamininin indirgeyici potansiyelinden kaynaklanmaktadır (24).



Şekil 2.3: C vitamininin yapısı.

C vitamini biyolojik sıvılarda önemli bir suda çözünen antioksidandır; H_2O_2 'ye karşı çok etkili olmamakla birlikte reaktif oksijen ve nitrojen türlerini temizleyici (*scavenging*) özelliğe sahiptir. Böylece diğer yapıları oksidatif hasara karşı korur. E vitaminini α -tokoferoksil radikalinden rejenere ederek bir ko-antioksidan olarak davranma özelliği de vardır. Bu önemli bir işlevdir, çünkü *in vitro* çalışmalarda C

vitaminin yokluğunda E vitaminin prooksidan gibi davrandığı gösterilmiştir (25,26). Ancak bu ilişkinin *in vivo* nasıl sonuçlar verdiği henüz açık değildir.

İki ana özelliği C vitaminini ideal bir antioksidan kılar (24). Birincisi; hem askorbat hem de ondan türeyen askorbil radikalının düşük tek-elektron indirgeyici potansiyele sahip olmasıdır. Bu düşük indirgeyici potansiyelleri fizyolojik koşullarda tüm radikal ve oksidanlarla reaksiyona girerek onları indirgemelerini sağlar. Bu nedenle biyolojik ortamlarda oksidan reaksiyonları sonlandırıcı görev yapan bir antioksidan olarak bilinir. İkinci temel özelliği ise, kendisinden türeyen askorbil radikalının kararlı yapısı (stabilitesi) ve düşük reaktivitesidir. C vitamini redoks aktif bir madde olduğu için geçiş metal iyonlarının varlığında prooksidan özellikler de gösterebilir. Ancak, bu olay serbest ve redoks aktif metal iyonlarının varlığı ve C vitamini konsantrasyonunun bu metallere oranla çok az olduğu durumlarda gerçekleşebilir ki, normal koşullarda biyolojik ortamlarda beklenmez.

2.5.2.3. Glutasyon (GSH)

Glutasyon hücrede en çok bulunan tiyol içeren bir bileşik olup; glutamat, sistein ve glisinden sentezlenir. N-asetilsistein hücre içi GSH sentezinde kullanılan sisteinin stabil ve etkili bir öncülüdür. Diyetle alınan glutamatın hemen tamamı ince bağırsaktan ilk geçişte katabolize olur. Bu nedenle glutaminin glutaminazla hidrolizi ve α -ketoglutarat ile dallı-zincirli amino asitlerin transaminasyonu GSH sentezinde kullanılan glutamatın temel kaynaklarıdır. Hücresel antioksidan sistemin temel bir elemanı olan GSH'ın özellik ve görevleri aşağıda özetlenmiştir (27):

- Ekzojen ve endojen bir antioksidandır,
- GSH'tan oluşan glutasyon radikali ($GS\cdot$) bir prooksidan olmakla birlikte başka bir $GS\cdot$ ile birleşerek yükseltgenmiş (okside) glutasyonu (GSSG) oluşturur, o da NADPH bağımlı GSH redüktaz tarafından GSH'a indirgenir,
- Çeşitli ksenobiyotiklerle GSH transferazın katalizlediği reaksiyonlara girer,
- GSH doğrudan (GSH-Px) ya da dolaylı enzimatik reaksiyonlarla ROT'ni temizler,

- Hücresel oksidasyon-redüksiyon dengesinin düzenlenmesinde önemli roller oynayan tiyol proteinleriyle etkileşime girer.

2.5.2.4. Karotenoid ve retinoidler

Çeşitli sebze ve meyvelerde bitkisel pigment olarak bulunan karotenoidlerin, flavin ve porfirinlerin zararlı etkilerini ve *singlet* oksijeni baskılayıcı, peroksil radikallerini temizleyici özelliği vardır. Likopen ve β -karoten (A vitamini öncülü) LDL'nin yapısında bulunan ve antioksidan özellikleri bilinen retinoidlerdir (27).

2.5.2.5. Melatonin

En zararlı radikallerden olan $\text{OH}^\cdot$ radikalini ortadan kaldırabilen çok güçlü bir antioksidandır. Lipofilik özelliğiyle geniş bir alanda antioksidan aktivite gösterebilir.

2.5.2.6. Ubikinonlar

İnsanlarda bulunan temel ubikinon yapısı ubikinon 10 (koenzim Q) dur. Elektron taşıma zincirinde görev yapmasının yanı sıra E vitamininin rejenerasyonunda rol almaktadır (23).

2.5.2.7. Diğer Antioksidanlar

Antioksidan olarak bilinen diğer ajanlar aşağıda sıralanmıştır (27):

- Ürik asit
- Mannitol
- Bilirubin
- Flavonoidler
- Seruloplazmin
- Albumin
- Ferritin

- Transferrin
- Haptoglobin
- Hemopeksin
- Sistein
- Salisilatlar
- Arjinin
- Sitrüllin
- Glisin
- Taurin
- Histidin
- Fitat
- Polifenoller
- α -lipoat

2.6. Oksidatif Stres

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu aerobik (oksijenli) ortamda yaşamın kaçınılmaz sonucudur. Sağlıklı bir organizmada ROT oluşumu ile enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri arasında bir denge vardır. Bu dengenin, ROT üretiminin artması ve/veya antioksidan savunma sistemlerinin zayıflaması nedeniyle, bozulması durumunda oksidatif stres denilen durum ortaya çıkar (29). Oksidatif stres aşağıda örnekleri verilen bir çok patolojik duruma katkıda bulunmaktadır (11,30-48):

- Ateroskleroz
- İskemik hastalıklar (Kalp hastalığı, inme, barsak iskemisi)
- Hipertansiyon
- Preeklampsi
- Nörolojik hastalıklar (Multiple skleroz, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, amyotropik lateral skleroz, müsküler distrofi)
- İnflamatuvar hastalıklar (Vaskülit, artrit, glomerulonefrit, sistemik lupus eritematosuz, erişkin solunum distress sendromu)
- Hemokromatosiz

- AIDS
- Amfizem
- Gastrik ülser
- Alkolizm
- Sigara içimiyle ilişkili hastalıklar

Böylesine geniş bir hastalık grubunda serbest radikallerin aşırı üretiminin nedeni oksidatif metabolizmanın her hücre için gerekli bir kaynak olmasıdır. Eğer bir hücre herhangi bir şekilde hasara uğrarsa bu mitokondriyal hasara ve bunun sonucunda da süperoksit üretimine yol açacaktır (15). Bu nedenle antioksidan savunma mekanizmalarının desteklenmesi bir çok patolojik durumda ortaya çıkabilecek zararların azaltılmasına katkıda bulunabilir.

2.7. Serbest Radikallerin Biyolojik Ortamlarda Ölçümü

Serbest radikallerin biyolojik ortamlardaki aktivitelerini ölçen altın standart bir yöntem olmamakla birlikte, kullanılan ve kabul gören bir çok yöntem vardır. Bunlar 3 grup altında toplanabilir (49):

1. Endojen antioksidan düzeylerinin ölçümü (antioksidan enzim aktiviteleri, C ve E vitamin konsantrasyonları)
2. Serbest radikal aktivitesinin dolaylı göstergeleri (lipit peroksidasyon ürünleri-MDA, DNA oksidasyon ürünleri, protein oksidasyon ürünleri),
3. Serbest radikal aktivitesinin direk belirleyicisinin ölçümü (elektron spin rezonans (ESR) çalışmaları).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Bu araştırma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (Ek 1). Bu çalışmada 24 adet Sprague Dawley ırkı albino, erkek cinsiyette rat (sıçan) kullanıldı. Deney hayvanları Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden sağlandı. Ratlar, 12 saat ışık 12 saat karanlık ritminde ışıklandırılan, $22\pm2^{\circ}\text{C}$ 'de ısıtılan odalarda, çeşme suyu ve standart pelet rat yemiyle (Van Yem Fabrikası, Van) beslendiler, su ve yem alımları serbest bırakıldı ve standart plastik kafeslerde (Değişim Ltd., İstanbul) barındırıldılar. Çalışmanın başlangıcında hayvanlar 275 ± 35 (Ort. $\pm$ SD) gram ağırlığındaydılar. Deney hayvanları, her birinde sekizer adet rat olacak şekilde, rasgele 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubu (Grup-1) 3 ay boyunca standart pelet rat yemiyle beslenirken, grup-2 ve grup-3'teki hayvanlar standart pelet rat yemiyle hazırlanmış % 4 kolesterol, % 1 kolik asit ve % 0,5 tiourasil içeren yüksek kolesterolü yemle beslendiler (50,51). Grup-3'teki hayvanlara çalışma süresince haftada 3 kez C ve E vitamini verildi (C vitamini 100 mg/kg i.p; E vitamini 60 mg/kg i.m) (52,53). Gruplardan çalışma başı ve sonunda, hafif eter anestezisi altında, kalp içi (intrakardiyak) girişimle kan alınarak biyokimyasal parametreleri ölçüldü. Biyokimyasal parametrelerin ölçümünde Roche Modular otoanalizör ve kitleri kullanıldı. Üç ayın sonunda hayvanlar derin eter anestezisi altında kurban edilerek böbrek, kalp, karaciğer ve testis dokuları çıkarıldı. Çıkarılan dokular -20°C sıcaklıkta derin dondurucuda saklandıktan sonra çalışma gününde dondurucudan alınarak ağırlıklarının 5 katı hacimde (% 20 w/v) serum fizyolojik içinde homojenize edildi. Doku homojenatları $4000 \times g$ 'de 20 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlarda protein konsantrasyonları Lowry yöntemiyle belirlendi ve uygun seyreltmelerle aynı doku türü için tüm süpernatantların protein konsantrasyonları eşitlendi. Bu süpernatantlarda oksidan ve antioksidan parametreler (MDA düzeyi, AOP değeri ve SOD, KAT, GSH-Px ve XO enzim aktiviteleri) ölçüldü.

3.2. Gereçler

3.2.1. Cihazlar

B. Braun Melsungen marka homojenizatör,
Heraus marka Labofur 200 model soğutmalı santrifüj,
Spektrofotometre; Unicam marka, Helios- α model,
Ayarlanabilir ve sabit otomatik pipetler, cam pipetler,
Vestel marka derin dondurucu (-20°C) ve Arçelik marka soğutucu (+4°C),
Hassas elektronik tartı (Sartorius Basic marka),
Roche Modular otoanalizör.

3.2.2. Kimyasal Maddeler

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler Sigma firmasından sağlanmıştır.

3.3. Protein Miktarı Ölçüm Yöntemi (Lowry Yöntemi)

Doku homojenatlarından elde edilen süpernatantların protein konsantrasyonlarının belirlenmesinde Lowry'nin protein ölçüm yöntemi kullanıldı (54). Bu yöntem fosfotungstik asit ve fosfomolibdik asitin, Cu^{+2} -protein kompleksi ile proteinlerin triptofan ve tirozin içeren rezidüleri tarafından, molibden mavisi ve tungsten mavisi oluşturmaları prensibine dayanır. Oluşan kompleksin absorbansı 700 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Sonuç protein konsantrasyonuyla doğru orantılıdır. Analizde kullanılan reaktiflerin hazırlanışı aşağıdadır:

A reaktifi: 0.5 gr $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 1 gr sodyum sitrat 100 ml distile suda çözülür.

B reaktifi: 20 gr Na_2CO_3 1 L 0,1 N NaOH içinde çözülür.

C reaktifi: 50 ml B reaktifine 1 ml A reaktifi eklenir.

D reaktifi: 10 ml Folin-Ciocalteu reaktifine 10 ml distile su eklenir.

Folin-Ciocalteu Fenol Reaktifinin hazırlanışı: 100 gr sodyum tungstat ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ve 25 gr sodyum molibdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 700 ml distile suda çözüldü. Üzerine 50 ml % 85'lik o-fosforik asit ve 100 ml derişik HCl eklendi. 10 saat süreyle hafif ateş altında reflux aparatında kaynatıldı. 150 gr lityum sülfat (Li_2SO_4) ve 50 ml H_2O eklendi, 3 damla brom damlatıldı. Karışım 15 dakika süreyle kondenser (yoğunlaştırıcı) olmadan kaynatıldı (fazla bromu buharlaştırarak uzaklaştırmak için). Soğuyunca distile suyla 1 litreye tamamlandı.

Deneyin yapılışında aşığıdaki protokol kullanıldı.

Tablo 3.1: Protein miktarı ölçüm yöntem protokolü.

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

Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildikten sonra hem kör hem de numune tüplerine 0,25 ml D reaktifi eklenir. Oda sıcaklığında 30 dakika daha inkübe edildikten sonra 700 nm dalga boyunda kör ve numunenin absorbansı (optik dansite, OD) distile suya karşı spektrofotometrik olarak ölçülür. Protein konsantrasyonunun hesaplanması için albümin standardından yararlanıldı. Buna göre faktör değeri 20 alınarak, hesaplama aşığıdaki formülle yapıldı.

$$\text{Protein konsantrasyonu (mg/ml)} = (\text{OD}_{\text{Nm}} - \text{OD}_{\text{Kör}}) \times \text{Faktör (F)}$$

3.4. Oksidan ve Antioksidan Parametrelerin Ölçüm Yöntemleri

3.4.1. Malondialdehit (MDA) Düzeyi Ölçüm Yöntemi

Lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden olan MDA bir oksidasyon göstergesi olarak kullanılmaktadır. Dahle'nin spektrofotometrik yönteminin temeli MDA ile

tiyobarbiturik asitin (TBA) oluşturduğu pembe renkli kompleksin 532 nm dalga boyunda verdiği absorbansın ölçülmesine dayanır (55). Bu yöntemde elde edilen sonuç, MDA dışındaki bazı maddeler de bu reaksiyonu verebildiği için, TBA ile reaksiyona giren maddeler (*substances*) anlamında TBARS olarak da adlandırılmaktadır (56,57). Bu analizde kullanılan reaktifler ve hazırlanışları aşağıdadır:

Fosfat tamponu (pH 6; 100 mM) 2,13 gr Na_2HPO_4 ile 11,56 gr KH_2PO_4 tartılıp distile suda çözülüp hacim 1 litreye tamamlanarak hazırlanır.

TBA çözeltisi (% 2 w/v) hazırlamak için 200 mg katı TBA 10 ml distile suda çözülür.

Trikloroasetik asit (TCA; % 20 w/v) 100 gr katı TCA'nın 500 ml 0,6 N HCl'de çözülmesiyle hazırlanır.

Etil alkol (% 95'lik, v/v).

Ölçüm yönteminde aşağıdaki protokol kullanılır.

Tablo 3.2: MDA düzeyi ölçüm yöntem protokolü.

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

Deney tüpleri 30 dakika kaynar suda inkübe edildikten sonra 20 dakika süreyle 6000 x g santrifüj edilir. Kör tüplerine 1 ml TBA çözeltisi spektrofotometrik ölçüm sırasında konulur ve 532 nm dalga boyunda distile suya karşı, tüm numune ve kör tüplerindeki çözeltilerin absorbansları ölçülür.

MDA'nın hesaplanmasında MDA standardının verdiği absorbanstan yararlanıldı. Bu amaçla tetraetoksipropan (MA: 220,3; d=0,92; % 96) MDA standardı olarak kullanıldı.

Tetraetoksipropanın (TEP) molaritesinin hesaplanması: Yoğunluğu (d) 0,92 olduğuna göre 1 litresi 920 gr eder, % 96'lık bir çözelti olduğu için de bunun 883,2 gramı TEP'dir. MA 220,3 olduğuna göre 1 litre TEP stok çözeltisinde 4 mol TEP vardır, buna göre de molaritesi 4 M'dir. Bu stok çözelti etil alkolle 400.000 kat seyreltilerek 10 µM MDA standardı elde edildi ve bu standart kullanılarak deney protokolü uygulandığı zaman standardın OD'si 0,152 ve standart körünün OD'si de 0,090 ölçüldü. Buna göre $\Delta OD(St)$ 0,062 olarak hesaplandı. Numunenin OD'sinden körün OD'si çıkarılarak $\Delta OD(Nm)$ elde edildikten sonra aşağıdaki formül kullanılarak MDA konsantrasyonu hesaplandı.

$$\Delta OD(St) / \Delta OD(Nm) = C(St) / C(Nm)$$

$$C(Nm) = \Delta OD(Nm) \times C(St) / \Delta OD(St)$$

$$C(Nm) = \Delta OD(Nm) \times 10 \mu M (MDA) / 0,062$$

$$C(Nm) = \Delta OD(Nm) \times 161,3 \mu M (MDA) = nmol/ml (MDA)$$

Elde edilen sonuç, protein konsantrasyonuna (mg/ml) bölünerek nmol/mg cinsinden MDA değerleri bulundu.

3.4.2. Antioksidan Potansiyel (AOP) Değeri Ölçüm Yöntemi

AOP ölçüm yöntemi ksantin-ksantin oksidaz sistemi kullanılarak elde edilen süperoksit radikalinin *in vitro* ortamda balıkyağındaki ÇDYA'ne saldırarak yeni MDA oluşturması temeline dayanır (58). Oluşan MDA ölçümünde Dahle'nin spektrofotometrik yöntemi kullanıldı (55). Ölçülen yeni oluşmuş MDA düzeyleri AOP ile ters orantılı olarak yorumlandı. Buna göre, yüksek MDA oluşumu düşük AOP anlamına gelirken düşük MDA oluşumu yüksek AOP anlamına gelmektedir. AOP değerinin hesaplanmasında 1 ünite (U), MDA oluşumunu % 50 azaltan antioksidan güç olarak tanımlanmıştır.

Fosfat tamponu (pH 6; 100 mM) 2,13 gr Na₂HPO₄ ile 11,56 gr KH₂PO₄ tartılıp distile suda çözülüp hacim 1 litreye tamamlanarak hazırlanır.

TBA çözeltisi (% 2 w/v) hazırlamak için 200 mg katı TBA 10 ml distile suda çözülür.

Trikloroasetik asit (TCA; % 20 w/v) 100 gr katı TCA'nın 500 ml 0,6 N HCl'de çözülmesiyle hazırlanır.

Etil alkol (% 95'lik, v/v).

Ksantin oksidaz (XO) enzim çözeltisinin hazırlanışında 25 µL XO 1 ml 3,2 M amonyum sülfat içinde çözöldü.

Ksantin çözeltisi 7,6 mg katı ksantin 5 ml distile suda (1-2 damla NaOH damlatılarak) çözölerek hazırlandı.

Kullanılan balıkyağı (50 µl) aseton (2 ml) içinde çözölerek hazırlandı.

AOP ölçüm yönteminde aşağıdaki protokol uygulandı.

Tablo 3.3: AOP değeri ölçüm yöntem protokolü.

	NUMUNE	KÖR 1	KÖR 2
SÜPERNATAN	100 µl	---	100 µl
ETİL ALKOL (% 95)	100 µl	100 µl	100 µl
FOSFAT TAMPONU	---	100 µl	10 µl
BALIKYAĞI	10 µl	10 µl	---
KSANTİN	50 µl	50 µl	50 µl
KSANTİN OKSİDAZ	50 µl	50 µl	50 µl

Oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildikten sonra aşağıdaki protokolle devam edilir.

ETİL ALKOL (% 95)	0,9 ml	0,9 ml	0,9 ml
FOSFAT TAMPONU	0,8 ml	0,8 ml	0,8 ml
TCA	1 ml	1 ml	1 ml
TBA	1 ml	1 ml	1 ml

Tüm deney tüpleri 30 dakika kaynatılarak inkübe edildikten sonra, 20 dakika süreyle 6000 x g santrifüj edilir ve 532 nm dalga boyunda distile suya karşı

absorbansları ölçülür. AOP değerlerinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmış ve bu çalışmadaki hesaplamalarda F değeri 20 alınmıştır.

$$\text{AOP (U/mg)} = [(K1_{OD} + K2_{OD} - N_{MOD}) / (K1_{OD} + K2_{OD})] \times F / [\text{Prot. kon. (mg/ml)}]$$

3.4.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

Bu yöntemin temeli ksantin-ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan süperoksit radikalının SOD enzimince ortadan kaldırılamadığında reaksiyon ortamında bulunan *nitroblue tetrazolium* (NBT) bileşiğinin indirgenmesi esasına dayanır (59). İndirgenmiş NBT 560 nm dalga boyunda en iyi absorbans veren menekşe rengi oluşumuna neden olur. Eğer ortamda SOD aktivitesi varsa bu rengin oluşumunu önleyecektir. Buna göre SOD enzim aktivitesi (1 U), NBT'nin indirgenmesini % 50 inhibe eden enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Analizde kullanılan reaktifler ve hazırlanışları aşağıdadır:

Reaktif 1'in hazırlanışı (Toplam hacim 490 ml):

- Ksantin 9,1 mg alınıp toplam hacim 200 ml olacak şekilde distile suda birkaç damla 1 N NaOH ile çözülür.
- NBT 12,3 mg alınır distile su ile 100 ml hacme tamamlanır.
- EDTA (Disodyum tuzu, dihidrat) 25 mg alınıp distile su ile 100 ml hacme tamamlanır.
- Na₂CO₃ 2,54 gr alınıp distile su ile 60 ml hacme tamamlanır.
- Bovin (sığır) albümin 30 mg alınıp distile su ile 30 ml hacme tamamlanarak çözülür.

Ksantin oksidaz (XO) çözeltisi hazırlamak için 10 µl XO 1 ml 3,2 M amonyum sülfatta çözülür.

CuCl₂ çözeltisi 108 mg CuCl₂ tartılıp 100 ml distile suda çözülerek hazırlanır.

Numuneleri çalışmadan önce ölçülebilecek miktardaki aktiviteyi belirlemek için kaç kat seyreltileceğini denemek gereklidir. Analiz aşağıdaki protokole göre yapılır.

Tablo 3.4: SOD aktivitesi ölçüm yöntem protokolü.

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

Oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilir. Aşağıdaki şekilde devam edilir.

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

Kör ve numunenin absorbensları 560 nm dalga boyunda distile suya karşı okunur. Elde edilen absorbens değerleri aşağıdaki formülde yerine konularak SOD aktivitesi hesaplanır.

$$\text{SOD aktivitesi (U/mg)} = [(K_{OD} - N_{MOD}) / K_{OD}] \times F \times \text{Seyreltme fakt.} / [\text{Prt.kon. (mg/ml)}]$$

Bu çalışmadaki hesaplamalarda F değeri 20 alınmıştır.

3.4.4. Katalaz (KAT) Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

Bu yöntem hidrojen peroksitin 240 nm dalga boyunda verdiği absorbens değerinin KAT enziminin katalizlediği reaksiyon sırasında azalma göstermesi ve bu azalmanın spektrofotometrik olarak izlenmesi temeline dayanır (60). Absorbanstaki dakikalık düşme hızı enzim aktivitesiyle doğru orantılıdır. Bu analizde kullanılan reaktifler aşağıda anlatıldığı gibi hazırlanmıştır.

Fosfat tamponu (pH 7; 50 mM) Na₂HPO₄ ve KH₂PO₄ kullanılarak hazırlandı.

H₂O₂ stok çözeltisinden (% 30 v/v) 0,2 ml alındı ve 100 ml fosfat tamponu (pH 7; 50 mM) ile seyreltilerek çalışmada kullanılan H₂O₂ çözeltisi elde edildi.

Deney, kuartz küvete 0,01 ml fosfat tamponu (pH 7; 50 mM); 2,99 ml H₂O₂ çözeltisi ve 0,01 ml süpernatant konularak distile suya karşı 240 nm dalga boyunda absorbanstın 1 dakika izlenmesi protokolüne göre gerçekleştirildi. Bir dakikanın sonundaki absorbanst farkı (ΔOD) ve H₂O₂'in molar absorbsiyon katsayısı kullanılarak KAT aktivitesi hesaplandı. Bu protokole göre yapılan analizlerde KAT enzim aktivitesi aşğıdaki formülle hesaplandı.

$$\text{KAT aktivitesi (IU/mg)} = (\Delta OD/dk.) \times F / [\text{Protein konsantrasyonu (mg/ml)}]$$

Bu çalışmadaki hesaplamalarda F değeri 7320 (bu çalışmada testis dokusu için 732) alınmıştır.

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

Bu yöntem GSH (indirgenmiş glutatyon) ile H₂O₂'in GSH-Px enziminin etkisiyle su ve GSSG'e (yükseltgenmiş glutatyon) dönüşümünü izleyen basamakta GSH redüktaz enziminin NADPH oksidasyonunu, oluşan GSSG miktarına bağlı olarak gerçekleştirmesi temeline dayanır (61). Bu reaksiyonda GSSG ürünü oluştuğça NADPH yükseltgenerek NADP'ye dönüşecektir. Spektrofotometrik olarak 340 nm dalga boyunda NADPH absorbanstının düşmesinin izlenmesiyle GSH-Px aktivitesi belirlenir.

Bu analizde kullanılan reaktiflerin hazırlanışı aşğıda anlatılmıştır.

Fosfat Tamponu (pH 7; 50 mM fosfat; 5,6 mM EDTA) 4,2 gr Na₂HPO₄ ile 2,72 gr KH₂PO₄ ve 2,08 gr EDTA (Disodyum tuzu, dihidrat) 1 litre distile suda çözülerek hazırlanır.

GSH çözeltisi 250 mg katı GSH 5 ml fosfat tamponunda çözülerek elde edilir.

Katı NADPH 15 mg tartılıp 2,5 ml fosfat tamponunda çözülür.

GSH Redüktaz enzim çözeltisinden 10 µl alınıp 1 ml 3,2 M amonyum sülfatta seyreltilir.

Sodyum azid 65 mg tartılıp 5 ml fosfat tamponunda çözülür.

H₂O₂ stok çözeltisinden (% 30 w/w) 15 µl alınıp 5 ml fosfat tamponunda çözülür.

Deney protokolü aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 3.5: GSH-Px aktivitesi ölçüm yöntem protokolü.

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

Spektrofotometre fosfat tamponuyla 340 nm dalga boyunda sıfırlanır, maddeler yukarıdaki miktarlarda kuartz küvete konulduktan sonra 1 dakika süreyle absorbans izlenir ve elde edilen sonuç kör değeri olur. Aynı küvete 100 µl H₂O₂ eklenerek 1 dakika daha izlenir, bu kez elde edilen sonuç numune değeridir. Her iki değer arasındaki fark (ΔOD) GSH-Px aktivitesiyle doğru orantılıdır. Enzim aktivitesinin hesaplanmasında ΔOD ve NADPH'nin molar absorpsiyon katsayısı kullanılır. Buna göre GSH-Px aktivitesinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmış ve F değeri 4800 alınmıştır.

$$\text{GSH-Px aktivitesi (mIU/mg)} = (\Delta OD / dk.) \times F / [\text{Protein kons. (mg/ml)}]$$

3.4.6. Ksantin Oksidaz (XO) Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

Bu yöntemin ilkesi ksantinden ürik asit oluşumunun 293 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesidir (62). Oluşan ürik asitin absorbansı XO aktivitesiyle doğru orantılıdır.

Analizde kullanılan reaktifler ve hazırlanışları aşağıdadır:

Fosfat tamponu (pH 7,5; 50 mM fosfat; 0,5 mM EDTA) 0,5 gr KH₂PO₄, 3 gr Na₂HPO₄ ve 93 mg EDTA (Disodyum tuzu, dihidrat) tartılıp distile suda çözülüp, toplam hacmin 500 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanır.

Ksantin çözeltisi (2 mM) 7,6 mg katı ksantin 25 ml fosfat tamponunda çözülerek hazırlanır.

Deney protokolü aşağıdaki gibi uygulanır.

Tablo 3.6: XO aktivitesi ölçüm yöntem protokolü.

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

Deney tüpündeki çözeltinin absorbansı 293 nm dalga boyunda kuartz küvet kullanılarak distile suya karşı ölçülür. Aynı çözeltiler oda sıcaklığında inkübe edilerek absorbansları 1 ve 24 saat sonra tekrar ölçülür. Ölçüm değerleri arasındaki fark (ΔOD) ve ürik asitin molar absorpsiyon katsayısı kullanılarak enzim aktivitesi hesaplanır. Buna göre XO aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$XO \text{ aktivitesi (mIU/mg)} = (\Delta OD / \text{dakika}) \times F / [\text{Protein konsant. (mg/ml)}]$$

Bu çalışmadaki hesaplamalarda F değeri 3000 alınmıştır.

3.5. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Bulguların istatistiksel analizleri SPSS for Windows (11.5.0; 2002) paket program kullanılarak yapıldı. Sonuçlar aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma (Ort. $\pm$ SD) olarak verildi. Gruplar arası istatistiksel değerlendirmede tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc Tukey HSD testleri kullanıldı. $P < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Ratların çalışma başı ve sonu kan biyokimya değerleri ile çalışma sonundaki böbrek, kalp, karaciğer ve testis dokularına ait oksidan-antioksidan parametreleri, gruplara göre aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma (Ort. $\pm$ SD) değerleri ve istatistiksel analizleriyle birlikte aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Tablo 4.1: Ratların (n=24) çalışma başı kan biyokimya değerleri.

Parametre	Ort.	SD
Glukoz (mmol/L)	6,38	1,48
Total Bilirubin (μ mol/L)	2,56	0,57
Direk Bilirubin (μ mol/L)	0,96	0,39
İndirek Bilirubin (μ mol/L)	1,60	0,67
Trigliserit (mmol/L)	0,93	0,31
Total Kolesterol (mmol/L)	1,54	0,32
HDL Kolesterol (mmol/L)	1,15	0,27
VLDL Kolesterol (mmol/L)	0,43	0,15
ALP (U/L)	450,46	163,26
AST (U/L)	113,59	32,50
ALT (U/L)	51,18	12,60

Tablo 4.2: Ratların gruplara göre çalışma sonu kan biyokimya değerleri.

Parametre	Gruplar	Ort.	SD
Glukoz (mmol/L)	Grup 1	5,81	0,93
	Grup 2	4,59	0,68
	Grup 3	5,24	0,69
Total Bilirubin (μ mol/L)	Grup 1	2,74	0,55
	Grup 2	2,91	0,97
	Grup 3	4,45	0,51
Direk Bilirubin (μ mol/L)	Grup 1	0,86	0,29
	Grup 2	1,61	0,80
	Grup 3	2,53	1,32
İndirek Bilirubin (μ mol/L)	Grup 1	1,92	0,39
	Grup 2	1,01	0,72
	Grup 3	1,97	1,21
Trigliserit (mmol/L)	Grup 1	1,10	0,38
	Grup 2	---	---
	Grup 3	0,32	0,05
Total Kolesterol (mmol/L)	Grup 1	1,44	0,25
	Grup 2	17,12	2,35
	Grup 3	12,95	1,01
HDL Kolesterol (mmol/L)	Grup 1	1,04	0,16
	Grup 2	3,93	0,71
	Grup 3	5,57	0,43
VLDL Kolesterol (mmol/L)	Grup 1	0,51	0,17
	Grup 2	---	---
	Grup 3	0,15	0,03
ALP (U/L)	Grup 1	354,25	59,16
	Grup 2	699,00	215,25
	Grup 3	833,00	143,16
AST (U/L)	Grup 1	193,40	39,87
	Grup 2	143,14	16,34
	Grup 3	199,16	27,37
ALT (U/L)	Grup 1	63,80	9,95
	Grup 2	53,28	8,15
	Grup 3	65,33	5,95

Grup 1: Kontrol grubu (n=8);

Grup 2: Kolesterolde zengin diyetle beslenen çalışma grubu (n=8);

Grup 3: Kolesterolde zengin diyetle beslenen ve C + E vitaminleriyle desteklenen çalışma grubu (n=8).

Tablo 4.3: Çalışma sonu kan biyokimya değerlerinin istatistiksel değerlendirmesi (ANOVA ve Post hoc Tukey HSD testiyle çoklu karşılaştırmaları).

Parametre	ANOVA	Post hoc Tukey HSD Testi		
Glukoz	p<0,05	Grup 1	Grup 2	p<0,05
			Grup 3	p>0,05
		Grup 2	Grup 3	p>0,05
Total Bilirubin	p<0,01	Grup 1	Grup 2	p>0,05
			Grup 3	p<0,01
		Grup 2	Grup 3	p<0,01
Direk Bilirubin	p<0,05	Grup 1	Grup 2	p>0,05
			Grup 3	p<0,05
		Grup 2	Grup 3	p>0,05
İndirek Bilirubin	p>0,05	Grup 1	Grup 2	p>0,05
			Grup 3	p>0,05
		Grup 2	Grup 3	p>0,05
Trigliserit	p<0,01	Grup 1	Grup 2	---
			Grup 3	---
		Grup 2	Grup 3	---
Total Kolesterol	p<0,001	Grup 1	Grup 2	p<0,001
			Grup 3	p<0,001
		Grup 2	Grup 3	p<0,01
HDL Kolesterol	p<0,001	Grup 1	Grup 2	p<0,001
			Grup 3	p<0,001
		Grup 2	Grup 3	p<0,001
VLDL Kolesterol	p<0,01	Grup 1	Grup 2	---
			Grup 3	---
		Grup 2	Grup 3	---
ALP	p<0,01	Grup 1	Grup 2	p<0,05
			Grup 3	p<0,01
		Grup 2	Grup 3	p>0,05
AST	p<0,01	Grup 1	Grup 2	p<0,05
			Grup 3	p>0,05
		Grup 2	Grup 3	p<0,01
ALT	p<0,05	Grup 1	Grup 2	p>0,05
			Grup 3	p>0,05
		Grup 2	Grup 3	p<0,05

Tablo 4.4: Böbrek dokusunda oksidan-antioksidan parametreler (Ort. $\pm$ SD).

Parametre	Grup 1 (n=8)	Grup 2 (n=8)	Grup 3 (n=8)	İstatistik (ANOVA)
MDA (nmol/mg)	0,74 $\pm$ 0,12	0,46 $\pm$ 0,17	0,47 $\pm$ 0,06	p<0,01
AOP (U/mg)	1,17 $\pm$ 0,07	1,15 $\pm$ 0,08	1,29 $\pm$ 0,07	p<0,01
SOD (U/mg)	122,59 $\pm$ 14,83	115,33 $\pm$ 14,59	61,83 $\pm$ 14,48	p<0,001
KAT (IU/mg)	105,02 $\pm$ 21,79	68,37 $\pm$ 12,11	89,09 $\pm$ 9,34	p<0,01
GSH-Px (mIU/mg)	23,89 $\pm$ 3,70	21,64 $\pm$ 7,62	34,20 $\pm$ 6,55	p<0,01
XO (mIU/mg)	0,052 $\pm$ 0,017	0,043 $\pm$ 0,027	0,265 $\pm$ 0,010	p<0,001

Tablo 4.5: Kalp dokusunda oksidan-antioksidan parametreler (Ort. $\pm$ SD).

Parametre	Grup 1 (n=8)	Grup 2 (n=8)	Grup 3 (n=8)	İstatistik (ANOVA)
MDA (nmol/mg)	0,70 $\pm$ 0,09	0,64 $\pm$ 0,09	0,69 $\pm$ 0,20	p>0,05
AOP (U/mg)	1,40 $\pm$ 0,16	1,37 $\pm$ 0,22	2,02 $\pm$ 0,09	p<0,001
SOD (U/mg)	58,82 $\pm$ 9,54	56,30 $\pm$ 7,50	47,13 $\pm$ 3,90	p<0,05
KAT (IU/mg)	25,62 $\pm$ 3,73	27,34 $\pm$ 3,38	28,18 $\pm$ 0,73	p>0,05
GSH-Px (mIU/mg)	7,09 $\pm$ 1,28	8,23 $\pm$ 2,53	13,92 $\pm$ 2,29	p<0,001
XO (mIU/mg)	0,090 $\pm$ 0,023	0,092 $\pm$ 0,022	0,323 $\pm$ 0,098	p<0,001

Tablo 4.6: Karaciğer dokusunda oksidan-antioksidan parametreler (Ort. $\pm$ SD).

Parametre	Grup 1 (n=8)	Grup 2 (n=8)	Grup 3 (n=8)	İstatistik (ANOVA)
MDA (nmol/mg)	0,37 $\pm$ 0,06	0,32 $\pm$ 0,04	0,22 $\pm$ 0,05	p<0,001
AOP (U/mg)	0,68 $\pm$ 0,05	0,63 $\pm$ 0,07	0,76 $\pm$ 0,05	p<0,01
SOD (U/mg)	99,32 $\pm$ 5,78	90,96 $\pm$ 10,48	55,35 $\pm$ 11,66	p<0,001
KAT (IU/mg)	79,66 $\pm$ 23,26	106,40 $\pm$ 6,64	99,49 $\pm$ 8,57	p<0,05
GSH-Px (mIU/mg)	8,52 $\pm$ 3,09	8,89 $\pm$ 1,73	38,64 $\pm$ 3,11	p<0,001
XO (mIU/mg)	0,717 $\pm$ 0,154	0,411 $\pm$ 0,120	1,025 $\pm$ 0,101	p<0,001

Tablo 4.7: Testis dokusunda oksidan-antioksidan parametreler (Ort. $\pm$ SD).

Parametre	Grup 1 (n=8)	Grup 2 (n=8)	Grup 3 (n=8)	İstatistik (ANOVA)
MDA (nmol/mg)	0,73 $\pm$ 0,19	0,79 $\pm$ 0,28	0,18 $\pm$ 0,03	p<0,001
AOP (U/mg)	1,67 $\pm$ 0,31	1,18 $\pm$ 0,13	1,19 $\pm$ 0,12	p<0,01
SOD (U/mg)	99,29 $\pm$ 17,34	103,42 $\pm$ 36,60	40,74 $\pm$ 6,50	p<0,01
KAT (IU/mg)	2,24 $\pm$ 0,65	3,49 $\pm$ 1,90	6,57 $\pm$ 1,68	p<0,01
GSH-Px (mIU/mg)	4,57 $\pm$ 1,10	4,38 $\pm$ 0,57	3,71 $\pm$ 0,53	p>0,05
XO (mIU/mg)	0,036 $\pm$ 0,004	0,040 $\pm$ 0,003	0,093 $\pm$ 0,011	p<0,001

Tablo 4.8: Oksidan-antioksidan parametrelerin çoklu karşılaştırmaları.

Parametre	Post hoc Tukey HSD Testi		
Böbrek-MDA	Grup 1	Grup 2	p < 0,01
		Grup 3	p < 0,01
	Grup 2	Grup 3	p > 0,05
Böbrek-AOP	Grup 1	Grup 2	p > 0,05
		Grup 3	p < 0,05
	Grup 2	Grup 3	p < 0,05
Böbrek-SOD	Grup 1	Grup 2	p > 0,05
		Grup 3	p < 0,001
	Grup 2	Grup 3	p < 0,001
Böbrek-KAT	Grup 1	Grup 2	p < 0,01
		Grup 3	p > 0,05
	Grup 2	Grup 3	p > 0,05
Böbrek-GSH-Px	Grup 1	Grup 2	p > 0,05
		Grup 3	p < 0,05
	Grup 2	Grup 3	p < 0,01
Böbrek-XO	Grup 1	Grup 2	p > 0,05
		Grup 3	p < 0,001
	Grup 2	Grup 3	p < 0,001
Kalp-AOP	Grup 1	Grup 2	p > 0,05
		Grup 3	p < 0,001
	Grup 2	Grup 3	p < 0,001
Kalp-SOD	Grup 1	Grup 2	p > 0,05
		Grup 3	p < 0,05
	Grup 2	Grup 3	p > 0,05
Kalp-GSH-Px	Grup 1	Grup 2	p > 0,05
		Grup 3	p < 0,01
	Grup 2	Grup 3	p < 0,01
Kalp-XO	Grup 1	Grup 2	p > 0,05
		Grup 3	p < 0,001
	Grup 2	Grup 3	p < 0,001
Karaciğer-MDA	Grup 1	Grup 2	p > 0,05
		Grup 3	p < 0,001
	Grup 2	Grup 3	p < 0,05
Karaciğer-AOP	Grup 1	Grup 2	p > 0,05
		Grup 3	p > 0,05
	Grup 2	Grup 3	p < 0,01
Karaciğer-SOD	Grup 1	Grup 2	p > 0,05
		Grup 3	p < 0,001
	Grup 2	Grup 3	p < 0,001
Karaciğer-KAT	Grup 1	Grup 2	p < 0,05
		Grup 3	p > 0,05
	Grup 2	Grup 3	p > 0,05
Karaciğer-GSH-Px	Grup 1	Grup 2	p > 0,05
		Grup 3	p < 0,001
	Grup 2	Grup 3	p < 0,001
Karaciğer-XO	Grup 1	Grup 2	p < 0,01
		Grup 3	p < 0,01
	Grup 2	Grup 3	p < 0,001
Testis-MDA	Grup 1	Grup 2	p > 0,05
		Grup 3	p < 0,01
	Grup 2	Grup 3	p < 0,001
Testis-AOP	Grup 1	Grup 2	p < 0,01
		Grup 3	p < 0,01
	Grup 2	Grup 3	p > 0,05
Testis-SOD	Grup 1	Grup 2	p > 0,05
		Grup 3	p < 0,01
	Grup 2	Grup 3	p < 0,01
Testis-KAT	Grup 1	Grup 2	p > 0,05
		Grup 3	p < 0,001
	Grup 2	Grup 3	p < 0,01
Testis-XO	Grup 1	Grup 2	p > 0,05
		Grup 3	p < 0,001
	Grup 2	Grup 3	p < 0,001

Bulguları özetleyecek olursak; yüksek kolesterollü diyetle beslenen gruplarda (Çalışma grupları; grup-2 ve 3) serum total kolesterol düzeyleri kontrol grubuna (Grup-1; $1,44 \pm 0,25$ mmol/L veya $55,60 \pm 9,84$ mg/dl) göre anlamlı olarak yüksek bulunmuş; ancak C ve E vitamini desteği yapılan grubun (Grup-3) kolesterol düzeyi, destek yapılmayan gruba (Grup-2) göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur (Grup-2; $17,12 \pm 2,35$ mmol/L veya $660,86 \pm 90,72$ mg/dl ve Grup-3; $12,95 \pm 1,01$ mmol/L veya $500,17 \pm 38,93$ mg/dl). Serum HDL kolesterol düzeyleri; antioksidan vitaminlerle desteklenen grupta diğer iki gruptan, yüksek kolesterollü diyetle beslenen grupta da kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Tablo 4.2 ve 4.3). Yukarıda sözü edilen kolesterol düzeylerine ulaşıldıktan sonraki 1 hafta içinde çalışma sonlandırılmıştır.

Kalp dokusu dışındaki dokularda MDA düzeyleri anlamlı farklılıklar göstermiş; buna göre böbrek dokusunda çalışma gruplarında kontrole göre, karaciğer ve testis dokusunda ise grup-3'te diğer gruplara göre MDA düşük bulunmuştur. Testis dokusunda AOP değerleri çalışma gruplarında kontrole göre düşükken, grup-3'te böbrek ve kalp dokusunda diğer gruplara göre anlamlı yüksek, karaciğer dokusunda da yalnızca grup-2'ye göre yüksek bulunmuştur. Kalp dokusunda SOD aktivitesi, grup-3'te kontrole göre, diğer dokularda da grup-2 ve kontrole göre anlamlı düşük bulunmuştur. Yine kalp dokusunda KAT aktivitesinde anlamlı farklılık gözlenmezken, karaciğer dokusunda grup-2'de kontrole göre anlamlı yüksek, böbrek dokusunda anlamlı düşük, testis dokusunda ise grup-3'te diğer gruplara göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Testis dokusunda GSH-Px aktivitesinde gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmemiş, ancak diğer dokularda grup-3'te diğer gruplara göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Tüm dokularda XO aktivitesi grup-3'te diğer gruplara göre yüksek bulunmuş, buna ek olarak karaciğer dokusunda grup-2'de kontrole göre düşük bulunmuştur (Tablo 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8).

5. TARTIŞMA

Günümüzde hiperkolesterolemi aterosklerozun majör risk faktörleri arasında önemli bir yer tutmaktadır (2). Ateroskleroz oluşumunda LDL'nin oksidasyonu ise en çok üzerinde durulan mekanizmadır (63). Yüksek kolesterolü diyetle beslenmenin kan lipit değerleri üzerine olan etkileri ve bunun önlenmesiyle ilgili yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (64,65). Bununla birlikte hiperkolesteroleminin çeşitli organlarda oksidan strese yol açıp açmadığı ile ilgili yapılmış çalışmalar da bulunmaktadır (66-68). Yağda çözünen ve güçlü bir antioksidan vitamin olarak bilinen E vitamininin hiperkolesterolemiyi ve ateroskleroza önleyip önleyemediği ve olası oksidan stresle başa çıkıp çıkamadığı ile ilgili araştırmalar da yapılmıştır (68-70). C vitamini ise suda çözünen güçlü bir antioksidan olup E vitamininin rejenerasyonunda da rol almaktadır. Buna dayanarak C ve E vitaminlerinin kombine kullanımının daha olumlu sonuçlar verebileceği ifade edilmektedir. Bundan dolayı, aterosklerozun önlenmesinde antioksidan vitamin desteğinin rolü çeşitli çalışmalara konu olmaktadır (6-8,71).

Oliveira ve ark. yaptıkları bir çalışmada, ateroskleroza yatkın, hiperkolesterolemili ve LDL reseptörlerinden yoksun farelerde kontrole göre oksidatif fosforilasyon veriminde farklılık olmadığı halde reaktif oksijen türleri üretiminde artma gözlemişlerdir. Bu artışı karaciğer, kalp ve beyni kapsayan çeşitli dokuların ve dalaktan elde edilmiş sağlam mononükleer hücrelerin mitokondrilerinde ölçerek gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarının sonucunda, artmış lipogenez sonucu NADPH'tan sağlanan indirgeyici ajanların azaldığını ve bunun da hiperkolesterolemik, LDL reseptörlerinden yoksun farelerde oksidatif stres yarattığını düşünmüşler ve bu bulguların ailesel hiperkolesterolemide gözlenen artmış LDL oksidasyonu, hücre ölümü ve aterogenezi açıklayabileceğini ileri sürmüşlerdir (66).

Vijayakumar ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada da, yüksek yağlı diyetle beslenmiş ratların çeşitli dokularında karabiberin lipit peroksidasyonu, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada 10 hafta süreyle yüksek yağlı diyetle beslenen ratların karaciğer, kalp, böbrek, bağırsak ve aort dokularında kontrole göre anlamlı olarak artmış TBARS ve konjuge dien

(CD) düzeyleri ve anlamlı olarak azalmış SOD, KAT, GSH-Px, GSH transferaz enzim aktiviteleri ile azalmış GSH düzeyleri saptanmıştır. Yağlı diyetle birlikte karabiber verilen grupta ise TBARS ve CD düzeyleri düşmüş, antioksidan enzim aktiviteleri ile GSH düzeyleri kontrol grubuna yakın düzeylerde korunmuştur. Araştırmacılar, bu bulguların sonucunda karabiberin hücrelerde yüksek yağlı diyetle indüklenmiş oksidatif stresi azaltabileceği kanısına varmışlardır (67).

Gökkuşu ve Mostafazadeh son zamanlarda yaptıkları bir çalışmada, 4,5 ay süreyle yüksek kolesterolle beslenmiş ratların karaciğer ve beyin dokularıyla plazma ve eritrositlerinde E vitamininin antioksidan etkilerini incelemişlerdir. Yüksek kolesterolle beslenmiş ratların plazma total kolesterol, fosfolipit ve trigliserit düzeyleri kontrole göre yükselmiş ve E vitaminiyle desteklenen grupta yüksek kolesterol grubuna göre trigliserit düzeyleri daha düşük bulunmuştur. Sözü edilen grupların total kolesterol değerleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Aynı çalışmada, yüksek kolesterolle beslenmiş ratların plazma ve eritrosit ile karaciğer ve beyin doku homojenatlarında TBARS konsantrasyonlarında kontrole göre anlamlı artışlar saptanmış, buna karşılık E vitaminiyle desteklenen grupta yüksek kolesterol grubuna göre plazma, eritrosit ve doku homojenatlarında TBARS konsantrasyonlarında anlamlı düşmeler bulunmuştur. Yüksek kolesterol grubunda eritrosit ve karaciğer GSH-Px aktiviteleri düşmüş ve E vitaminiyle desteklenen grupta yüksek kolesterol grubuna göre GSH-Px aktivitesinde artış gözlenmiştir. Eritrosit ve karaciğer SOD aktivitelerinde ise anlamlı değişiklik bulunmamıştır. Araştırmacılar çalışmalarının sonucunda hiperkolesteroleminin dokularda antioksidan gücün düşmesine neden olduğu ve hem antioksidan güçteki bu düşme, hem de yüksek kolesterolle beslenmeden kaynaklanan serbest radikal yüklenmesinin oksidan strese yol açtığını, bunun da peroksidasyon reaksiyonlarını hızlandırdığını ve bu metabolik olayların sonucunda plazma ile doku lipit parametrelerinde önemli değişikliklerin olduğunu söylemişlerdir. Araştırmacılar buna ek olarak, uzun süreli E vitamini desteğinin, antioksidan enzimleri aktive ederek toksik serbest radikalleri temizleyebileceğini ve böylece de hiperkolesteroleminin neden olduğu peroksidasyon reaksiyonlarına karşı hücre yapılarını koruyabileceğini ileri sürmüşlerdir (68).

Tavşanlarda yapılan bir çalışmada alfa-tokoferol (E vitamini) desteğinin total plazma kolesterol konsantrasyonunda artmayı önleyip önleyemediği ve aterojenik diyetle beslenen tavşanların arteriyel plaklarındaki kolesterol birikimini azaltıp azaltmadığı araştırılmıştır. Sonuç olarak da, diyetle yüksek miktarda alfa-tokoferol tüketiminin total plazma kolesterol konsantrasyonunu düşürerek ateroskleroza önleyebileceği ileri sürülmüştür (69). Hsu ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada da, hiperkolesterolemik tavşanların antioksidan savunma sistemlerinde balıkyağı ve E vitamininin etkileri araştırılmıştır. Tavşanlar 6 hafta süreyle yüksek yağ ve kolesterol içeren diyetle beslenmiş, balıkyağı ve/veya E vitamini desteği verilen ve verilmeyen gruplar, birbirleriyle ve kontrol grubuyla karşılaştırılmışlardır. Yüksek yağ ve kolesterolle beslenen tavşanlarda kontrol grubuna göre, aterom oluşumu, plazma lipit ve peroksit düzeyleri artmış ve kan glutatyon düzeyleriyle, plazma GSH redüktaz, GSH-Px ve KAT aktiviteleri azalmıştır. Balıkyağı desteği yapılan grupta, aterom oluşumu anlamlı olarak azalırken, GSH-Px ve GSH redüktaz aktiviteleri artmış, bunlarla birlikte plazma lipit peroksit düzeyleri de artmıştır. Balıkyağına E vitamininin eklenmesi GSH redüktaz aktivitesini daha da artırmış ve peroksit düzeylerini de düşürmüştür. Sonuçta, balıkyağının hiperkolesteroleminin neden olduğu oksidatif strese karşı antioksidan savunma sistemlerini güçlendirdiği ve E vitamininin de bu yararlı etkileri daha da artırdığı kanısına varılmıştır (70).

Aterosklerozun önlenmesinde antioksidan desteği çalışmasının (ASAP) ilk 3 yılında 136 IU E vitamini ve yavaş salınımlı C vitamini (2x250 mg) desteği yapılan erkeklerde karotid arter aterosklerozunun ilerlemesi yavaşlamış, ancak kadınlarda etkili bulunmamıştır. Altı yıllık desteğin, hiperkolesterolemik (Serum kolesterol değeri $\geq 5,0$ mmol/L) deneklerde karotid (*common carotid*) arter intima-media kalınlığı üzerine olan etkileri incelendiğinde ise, her iki cinsiyet grubunda da karotid arter intima-media kalınlığında anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Bu bulguların sonucunda E vitamini ile birlikte yavaş salınımlı C vitamini suplementasyonunun hiperkolesterolemik kişilerde aterosklerotik gidişi yavaşlattığı bilgisi desteklenmiştir (71). Perticone ve ark. hiperkolesterolemik hastalarda atorvastatin ve C vitamininin etkilerini inceledikleri çalışmalarının sonucunda hiperkolesterolemik kişilerde endotel bağımlı vazodilatasyonun normal kişilere göre bozulduğu, intra-arteriyel C vitamini infüzyonunun asetil kolince yürütülen bozulmuş

vazodilatasyonu düzelttiğini ve atorvastatin tedavisinin serum kolesterol ve trigliserit düzeylerini hızla düşürdüğünü gözlemişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarının yorumunda, hiperkolesterolemik kişilerde atorvastatinin asetil kolince yürütülen bozulmuş vazodilatasyonu hızla iyileştirdiği ancak normale çevirmediği, bu endotel disfonksiyonunda süperoksit anyon üretiminin önemli rol oynadığı ve C vitamininin, muhtemelen serbest radikalleri süpürerek, endotel bağımlı vazodilatasyonda anlamlı bir düzelmeyi indüklediği kanısına varmışlardır (72).

Tüm bu bilgilerin ışığında, bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular nasıl değerlendirilebilir? Her şeyden önce, yüksek kolesterolli diyetle beslenen hayvanların serum kolesterol düzeyleri 3 ayda kontrol grubuna göre yaklaşık 12 katlık bir artış göstermiş, buna karşılık yüksek kolesterolli diyetle beslenen ve antioksidan vitamin kombinasyonu ile desteklenen hayvanlarda bu artış 9 katta sınırlanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık gösteren bu bulgu, antioksidan vitamin desteğinin serum kolesterol düzeylerinin düzenlenmesinde önemli rol oynadığını göstermektedir. Literatürde E vitamininin tek başına serum kolesterol düzeyi üzerine farklı etkilerini gösteren çalışmalar bulunmakta olup (68,69), bizim çalışmamızdaki bulgular C ve E vitamini kombinasyonunun serum kolesterolünün düzenlenmesinde E vitamininin tek başına verilmesine göre daha yararlı olacağını düşündürmektedir. Hiperkolesterolemi ateroskleroz oluşumundaki majör risk faktörlerinden biri olduğuna göre (2), hiperkolesterolemik kişilere kombine antioksidan vitamin desteği yapılması ateroskleroz gelişiminin önlenmesinde anahtar rol oynayabilir. Bu görüş ASAP çalışmasının bulgularıyla da desteklenmiştir (71).

Oksidan-antioksidan parametreler değişik dokularda farklı sonuçlar göstermiştir. Buna göre lipit peroksidasyonunun son ürünü olan ve önemli bir oksidasyon göstergesi olarak kullanılan MDA, yüksek kolesterolli diyetle beslenen grupta kontrole göre testis dokusunda anlamlı olmasa da hafif bir artış göstermiş, antioksidan vitaminle desteklenen grupta ise MDA diğer gruplara göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Böbrek dokusunda yüksek kolesterolle beslenen her 2 grupta da MDA kontrole göre düşükken, karaciğer dokusunda antioksidan destek yapılan grupta diğer gruplardan düşük ölçülmüştür. Bu bulgular yüksek kolesterolle beslenmenin erken dönemde lipit peroksidasyonunda önemli bir artışa yol açmadığını ve antioksidan vitamin kombinasyonu ile yapılan desteğin mevcut

durumu koruduğunu düşündürmektedir. Antioksidan potansiyel değerlerine bakıldığında, böbrek ve kalp dokularında antioksidan vitaminlerle desteklenen grupta diğerlerine göre, karaciğer dokusunda yüksek kolesterolli diyetle beslenen gruba göre anlamlı artışlar saptanmış, testis dokusunda ise çalışma gruplarında kontrole göre düşük bulunmuştur. Testis dokusu dışındaki dokularda antioksidan vitaminlerle yapılan desteğin AOP değerlerini artırıcı etki yaptığı gözlenmiş olmakla birlikte, testis dokusunda gözlenen sonuçlar yüksek kolesterol düzeylerinin bu dokuda antioksidan gücü düşürdüğünü ve antioksidan vitamin kombinasyonu ile yapılan desteğin antioksidan gücü artıramamasına karşın lipid peroksidasyonunu (MDA düşmüş) azalttığını göstermektedir. Aynı dokuda kolesterolün antioksidan enzim aktivitelerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı da görülmektedir. Buna göre kolesterolün testis dokusunda enzimatik olmayan antioksidan gücü azalttığı, ancak bunun lipid peroksidasyonunda önemli bir hızlanmaya yol açmadığı söylenebilir (MDA düzeyindeki artış anlamlı bulunmamıştır). Testis dokusu dışındaki dokularda antioksidan vitamin kombinasyonu ile yapılan desteğin hem enzimatik (bazı antioksidan enzim aktivitelerinde artış var), hem de enzimatik olmayan antioksidan gücü artırdığı düşünülebilir. Testis dokusunda ise antioksidan vitaminler reaktif oksijen türlerini direk olarak etkisiz hale getirmiş olabilirler.

Antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki değişiklikleri dokulara göre değerlendirecek olursak; böbrek ve karaciğer dokularında, antioksidan destek yapılan grupta diğerlerine göre SOD aktivitesi düşük, GSH-Px aktivitesi ise yüksek ölçülmüş, KAT aktivitesi ise yüksek kolesterolli diyetle beslenen gruplarda kontrole göre böbrek dokusunda düşük, karaciğer dokusunda yüksek bulunmuştur. Kalp dokusunda, KAT aktivitesi gruplar arasında değişiklik göstermemiş, antioksidan vitamin desteği yapılan grupta diğerlerine göre SOD aktivitesi düşük (kontrole göre anlamlı, yüksek kolesterol grubuna göre anlamlı olmasa da düşük), GSH-Px aktivitesi ise yüksek ölçülmüştür. Testis dokusundaki bulgular SOD aktivitesinde böbrek ve karaciğer dokularındaki bulgulara benzer olmakla birlikte, GSH-Px aktivitelerinde anlamlı değişiklik yokken KAT aktivitesi antioksidan destek yapılan grupta diğerlerine göre yüksek bulunmuştur. Sonuçta hiperkolesteroleminin erken döneminde antioksidan enzimlerin aktivitelerinde önemli bir değişiklik gözlenemediği ve antioksidan vitamin desteğinin GSH-Px ve KAT aktivitelerini

çeşitli dokularda artırırken, SOD aktivitesini düşürdüğü söylenebilir. Antioksidan vitamin kombinasyonu ile yapılan destek süperoksit radikalini doğrudan yok ederek SOD aktivitesini baskılamış olabilir. Malondialdehit düzeylerinde gözlenen değişiklikler de SOD aktivitesindeki değişikliklere benzer nitelikte olup bu çıkarımı desteklemektedir.

Endojen süperoksit radikal üretiminde rol oynadığı için oksidan parametreler arasında değerlendirilen XO enziminin aktivitelerine bakıldığında, tüm dokularda antioksidan destek yapılan grupta diğerlerine göre yüksek değerler saptanmış, karaciğer dokusunda ise yüksek kolesterolle beslenen çalışma grubunda kontrole göre düşük ölçülmüştür. Buna göre kolesterol akut dönemde XO aktivitesini önemli biçimde değiştirmemektedir. Antioksidan vitamin desteği yapılması sonucundaysa, XO aktivitesi tüm dokularda artmıştır. Ksantin oksidaz enzim aktivitesindeki bu artış, ya nükleotid katabolizmasının hızlanması ya da ATP kullanımının artması sonucu olabileceğine göre, antioksidan vitamin desteği akut dönemde nükleotid yıkımı veya ATP kullanımını artırarak XO enzimini aktive ediyor olabilir. Bunun sonucunda oluşan süperoksit radikali antioksidan vitaminler tarafından yok ediliyor olabilir.

Bu araştırmada diyetle yüksek oranda kolesterol tüketiminin oksidatif reaksiyonları hızlandırdığı gözlemlenemedi. Bunun nedeni erken dönemde, kolesterolün serbest radikal metabolizmasında rol alan enzimlerin bazılarını aktive etmesi olabilir. Organizma belki de kolesterolün oksidan potansiyeline karşı başlangıçta kendisini böyle bir kompensasyon mekanizmasıyla koruyor olabilir.

Serum kolesterol düzeyindeki artış akut dönemde antioksidan vitamin desteğiyle bir noktaya kadar kontrol edilebilmiş olmakla birlikte, oksidan-antioksidan parametrelerde gözlenen sonuçlar hiperkolesterolemik sürenin kısa tutulmuş olmasına (1 hafta) bağlanabilir. Eğer hiperkolesteroleminin uzun süreli etkileriyle birlikte kronik antioksidan vitamin desteğini kapsayan çalışmalar yapılırsa, antioksidan vitamin kombinasyonu ile yapılacak desteğin, serum kolesterol düzeylerini kontrol edici etkilerini ve oksidan / antioksidan parametreler üzerindeki düzenleyici rollerini daha net biçimde gözlemlemek mümkün olacaktır.

6. SONUÇLAR

1. Bu çalışmada analizleri yapılan oksidan / antioksidan parametrelerden sağlanan bulgular, yüksek serum kolesterolünün erken evrede dokularda oksidasyon reaksiyonlarını hızlandırmadığına işaret etmektedir.
2. Antioksidan vitamin kombinasyonu ile yapılan destek, yüksek serum kolesterolünün erken döneminde dokularda hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidan gücü artırmaktadır.
3. Bu çalışmada ölçülen serum kolesterol değerleri, yüksek serum kolesterolüne sahip kişilerde antioksidan vitaminler olan C ve E vitaminlerinin birlikte kullanımının serum kolesterolünün kontrolünde etkili olacağını göstermektedir.
4. Elde edilen bulguların, yüksek serum kolesterolünün erken dönemde yol açabildiği değişikliklere ve doğal olarak buna bağlı biçimde C ve E vitamini kombinasyonunun da akut dönemdeki etkilerine işaret etmekte oldukları, çalışma sonuçları değerlendirilirken dikkate alınmalıdır.

ÖZET

Yüksek Kolesterolü Diyetin Ratlarda Değişik Organlardaki Oksidan / Antioksidan Dengesine Etkisi ve Antioksidan Vitaminlerin Olası Rollerinin Araştırılması

Bu çalışmada yüksek kolesterolü beslenmenin ratlarda (sıçanlarda) çeşitli organlardaki oksidan-antioksidan dengesine olan etkileri ile C ve E vitaminlerinin birlikte kullanımının bu etkilere ve hiperkolesterolemiye karşı olası rollerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla, 24 adet Sprague Dawley cinsi albino erkek rat rasgele 3 gruba ayrılarak 8'er adet rattan oluşan kontrol ve çalışma grupları oluşturuldu. Kontrol grubu (Grup-1) 3 ay boyunca normal yemle beslenirken, grup-2 ve grup-3'teki hayvanlar yüksek kolesterolü diyetle (% 4 kolesterol, % 1 kolik asit ve % 0,5 tiyourasil içeren yemle) beslendiler. Grup-3'teki hayvanlara çalışma süresince haftada 3 kez C ve E vitamini verildi (C vitamini 100 mg/kg i.p; E vitamini 60 mg/kg i.m). Grupların çalışma başı ve sonundaki kan biyokimya parametreleri ölçüldü. Üç ayın sonunda hayvanlar sakrifiye (kurban) edildikten sonra, böbrek, karaciğer, kalp ve testis dokuları çıkarılarak, bu dokularda oksidan ve antioksidan parametrelerin (Malondialdehit-MDA düzeyleri, Antioksidan Potansiyel-AOP değerleri ile Süperoksit Dismutaz-SOD, Katalaz-KAT, Glutasyon Peroksidaz-GSH-Px ve Ksantin Oksidaz-XO enzim aktiviteleri) analizleri yapıldı.

Çalışma gruplarında (Grup-2 ve 3) serum kolesterol düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yükselmiş (Grup-2'de kontrole göre yaklaşık 12 kat), ancak antioksidan vitamin desteği yapılan gruptaki artış, vitamin desteği yapılmayan gruba göre anlamlı bir şekilde daha az olmuştur (Grup-3'te kontrole göre yaklaşık 9 kat). Oksidan-antioksidan parametrelerde değişik dokularda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre böbrek dokusunda, grup-3'te kontrole göre MDA düzeyi ile KAT aktiviteleri düşük, kontrol ve grup-2'ye göre SOD aktiviteleri düşük, AOP değeri, GSH-Px ve XO aktiviteleri yüksek bulunmuş, grup-2'de ise MDA düzeyi ve KAT aktivitesi kontrole göre düşük saptanmıştır. Kalp dokusunda grup-3'te AOP değeri, GSH-Px ve XO aktiviteleri kontrol ve grup-2'ye göre yüksek, SOD aktivitesi ise kontrole göre düşük bulunmuştur. Karaciğer dokusunda grup-3'te kontrol ve grup-2'ye göre MDA düzeyi ve SOD aktivitesi düşük, GSH-Px ve XO aktiviteleri yüksek, grup-2'ye göre AOP düzeyi yüksek, grup-2'de de kontrole göre KAT aktivitesi yüksek, XO aktivitesi düşük saptanmıştır. Testis dokusunda grup-3'te kontrol ve grup 2'ye göre MDA düzeyi ve SOD aktiviteleri düşük, KAT ve XO aktiviteleri yüksek, grup-2 ve 3'ün her ikisinde de kontrole göre AOP değerleri düşük bulunmuştur.

Bu çalışmanın sonuçları, yüksek serum kolesterolünün erken evrede oksidasyona yol açmadığına, ancak bununla birlikte antioksidan savunmanın güçlenmesinde C ve E vitamin kombinasyonunun yararlı olacağına işaret etmektedir. Bu çalışmada elde edilen veriler, yüksek serum kolesterolüne sahip kişilerde antioksidan vitaminler olan C ve E vitaminlerinin birlikte kullanımının serum kolesterolünün kontrolünde etkili olacağını da göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Antioksidan vitaminler, Hiperkolesterolemi, Oksidan / Antioksidan denge

SUMMARY

Effects of High Cholesterol Diet on Oxidant / Antioxidant Status in Various Tissues from Rats Investigation of Possible Roles of Antioxidant Vitamin Combination

In this study, it was aimed to investigate effects of high cholesterol diet on oxidant antioxidant status in various tissues from rats and possible roles of the vitamins C and E combination on these parameters and on hypercholesterolemia.

For this aim, 24 Sprague Dawley type albino male rats were used in the study. The animals were divided into 3 groups randomly. In each group there were 8 rats. The control group (Group-1) was fed by a normal laboratory diet. The study groups (Groups-2 and 3) were fed by high cholesterol diet (4% cholesterol, 1% cholic acid and 0.5% thiouracil) for 3 months. Rats in the group-3 were given vitamins C and E three times a week throughout the study (Vitamin C 100 mg/kg i.p; vitamin E 60 mg/kg i.m). At the beginning and end of the study, blood biochemical parameters of the animals were analyzed. At the end of the 3-month period, all the animals were sacrificed and their heart, kidney, liver and testis tissues were surgically removed to measure oxidant and antioxidant parameters (Malondialdehyde-MDA levels, Antioxidant Potential-AOP values, Superoxide dismutase-SOD, Catalase-CAT, Glutathione peroxidase-GSH-Px and Xanthine oxidase-XO enzyme activities).

At the end of the study period, serum total cholesterol levels were significantly higher in the study groups than the control group. However, the increase in the group-3 was significantly lower than that in the group-2. As to the oxidant-antioxidant parameters, there were different results among the tissues, significant ones of which are as follows. In the kidneys of the group-3, MDA levels and CAT activities were lower than that in the control, AOP values, GSH-Px and XO activities were higher and SOD activities lower than those in the other groups. In the same tissues of the group-2, MDA levels and CAT activities were lower than that in the control. In the heart tissues of the group-3; AOP values, GSH-Px and XO activities were higher than those in the others, and SOD activities were lower than that in the control. In the livers of the group-3; MDA levels and SOD activities were lower, GSH-Px and XO activities were higher than those in the other groups, and AOP values were higher than that in the group-2. In the liver tissues of the group-2, CAT activities were higher and XO activities were lower than that in the control group. In the testis tissues of the group-3, MDA levels and SOD activities were found to be lower, CAT and XO activities higher than those in the other groups. In the testes of the study groups, AOP values were found to be lower than that in the control group.

In conclusion, our results suggest that hypercholesterolemia does not lead to oxidation reactions in the early phase. However, the results also show that antioxidant vitamin combination is helpful to improve antioxidant power in the tissues. Moreover, it is suggested that the combination of vitamins C and E is effective in the management of serum cholesterol levels in hypercholesterolemic patients.

Key Words: Antioxidant vitamins, Hypercholesterolemia,
Oxidant / Antioxidant status

KAYNAKLAR

1. Libby P. The pathogenesis of atherosclerosis. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. New York: McGraw-Hill, 2001: 1377-1381.
2. *National cholesterol education program adult treatment panel III final report*. National Institute of Health, 2002.
3. Cox DA, Cohen ML. Effects of oxidized low-density lipoprotein on vascular contraction and relaxation: clinical and pharmacological implications in atherosclerosis. *Pharmacol Rev*. 1996; 48: 3-19.
4. Parthasarathy S, Rankin SM. Role of oxidized LDL in atherogenesis. *Prog Lipid Res*. 1992; 31: 127-143.
5. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*. 1991; 88: 1785-1792.
6. Munteanu A, Zingg J-M, Azzi A. Anti-atherosclerotic effects of vitamin E - myth or reality? *J Cell Mol Med*. 2004; 8: 59-76.
7. Nuttall SL, Kendall MJ, Martin U. Antioxidant therapy for the prevention of cardiovascular disease. *QJM*. 1999; 92: 239-244.
8. Salonen JT, Nyyssonen K, Salonen R, Lakka HM, Kaikkonen J, Porkkalarataho E, Voutilainen S, Lakka TA, Rissanen T, Leskinen L, Tuomainen TP, Valkonen VP, Ristonmaa U, Poulsen HE. Antioxidant supplementation in atherosclerosis prevention (ASAP) study: a randomized trial of the effect of vitamins E and C on 3-year progression of carotid atherosclerosis. *J Intern Med*. 2000; 248: 377-386.
9. Daugherty A, Roselaar SE. Lipoprotein oxidation as a mediator of atherogenesis: Insights from pharmacological studies. *Cardiovasc Res*. 1995; 29: 297-311.
10. National Research Council. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. Washington, D.C.: National Academy Press, 2000.
11. Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med*. 1996; 20: 707-727.

12. McNamara JR, Warnick GR, Wu LL. Lipids and lipoproteins. In: Bishop LM, Duben-Engelkirk JL, Fody EP, eds. *Clinical Chemistry*. QY: Lippincott Williams & Wilkins, 2000: 232-259.
13. Gilbert DL. Fifty years of radical ideas. *Ann NY Acad Sci*. 2000; 899: 1-14.
14. Akkuş İ. *Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri*. Konya: Mimoza Yayınları, 1995.
15. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med*. 2000; 108: 652-659.
16. Evans P, Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr*. 2001; 85(S2): S67-S74.
17. Fridovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann NY Acad Sci*. 1999; 893: 13-18.
18. Wu G, Morris SM Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J*. 1998; 336: 1-17.
19. Benzie IFF. Evolution of antioxidant defence mechanisms. *Eur J Nutr*. 2000; 39: 53-61.
20. Kawashima S. The two faces of endothelial nitric oxide synthase in the pathophysiology of atherosclerosis. *Endothelium*. 2004; 11: 99-107.
21. Esterbauer H, Wag G, Puhl H. Lipid peroxidation and its role in atherogenesis. *Br Med Bull*. 1993; 49: 566-576.
22. Halliwell B. Vitamin C: antioxidant or prooxidant in vivo. *Free Radic Res*. 1996; 25: 439-454.
23. Stocker R. The ambivalence of vitamin E in atherogenesis. *Trends Biochem Sci*. 1999; 24: 219-223.
24. Carr AC, Frei B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *Am J Clin Nutr*. 1999; 69: 1086-1107.
25. Bowry VW, Mohr D, Clearly J, Stocker R. Prevention of tocopherol-mediated peroxidation in ubiquinol-10-free human low density lipoprotein. *J Biol Chem*. 1995; 270: 5756-5763.

26. Neuzil J, Thomas SR, Stocker R. Requirement for, promotion, or inhibition by α -tocopherol of radical-induced initiation of plasma lipoprotein lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 1997; 22: 57-71.
27. Fang Y-Z, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition.* 2002; 18: 872-879.
28. Yalçın AS. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim.* 1998; 11: 342-346.
29. Shah AM, Channon KM. Free radicals and redox signalling in cardiovascular disease. *Heart.* 2004; 90: 486-487.
30. Omar BA, McCord JM. Interstitial equilibration of superoxide dismutase correlates with its protective effect in the isolated rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1991; 23: 149-159.
31. Baker K, Marcus CB, Huffman K, Kruk H, Malfroy B, Doctrow SR. Synthetic combined superoxide dismutase/catalase mimetics are protective as a delayed treatment in a rat stroke model: a key role for reactive oxygen species in ischemic brain injury. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; 284: 215-221.
32. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN, Hamilton SR, McCord JM. Ischemic injury in the cat small intestine role of superoxide radicals. *Gastroenterology.* 1982; 82: 9-15.
33. Kerr S, Brosnan MJ, McIntyre M, Reid JL, Dominiczak AF, Hamilton CA. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of endothelium. *Hypertension.* 1999; 33: 1353-1358.
34. Hubel CA. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999; 222: 222-235.
35. Toshniwal PK, Zarling EJ. Evidence for increased lipid peroxidation in multiple sclerosis. *Neurochem Res.* 1992; 17: 205-207.
36. Lyras L, Cairns NJ, Jenner A, Jenner P, Halliwell B. An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 1997; 68: 2061-2069.
37. Cohen G. Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology.* 1984; 5: 77-82.

38. Vaille A, Jadot G, Elizagaray A. Anti-inflammatory activity of various superoxide dismutases on polyarthritis in the Lewis rat. *Biochem Pharmacol.* 1990; 39: 247-255.
39. Warren JS, Yabroff KR, Mandel DM, Johnson KJ, Ward PA. Role of $O_2^{\cdot-}$ in neutrophil recruitment into sites of dermal and pulmonary vasculitis. *Free Radic Biol Med.* 1990; 8: 163-172.
40. Shah SV. The role of reactive oxygen metabolites in glomerular disease. *Annu Rev Physiol.* 1995; 57: 245-262.
41. Mohan IK, Das UN. Oxidant stress, anti-oxidants and essential fatty acids in systemic lupus erythematosus. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1997; 56: 193-198.
42. Gonzalez PK, Zhuang J, Doctrow SR, Malfroy B, Benson PF, Menconi MJ, Fink MP. Role of oxidant stress in the adult respiratory distress syndrome: evaluation of a novel antioxidant strategy in a porcine model of endotoxin-induced acute lung injury. *Shock.* 1996; 6 (Suppl 1): S23-S26.
43. Houghlum K, Ramm GA, Crawford DH, Witztum JL, Powell LW, Chockier M. Excess iron induces hepatic oxidative stress and transforming growth factor beta1 in genetic hemochromatosis. *Hepatology.* 1997; 26: 605-610.
44. Flores SC, Marecki JC, Harper KP, Bose SK, Nelson SK, McCord JM. Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 represses expression of manganese superoxide dismutase in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 7632-7636.
45. Wallaert B, Aerts C, Gressier B, Gosset P, Voisin C. Oxidative inactivation of alpha(1)-proteinase inhibitor by alveolar epithelial type II cells. *J Appl Physiol.* 1993; 75: 2376-2382.
46. Davies GR, Simmonds NJ, Stevens TRJ, Grandison A, Blake DR, Rampton DS. Mucosal reactive oxygen metabolite production in duodenal ulcer disease. *Gut.* 1992; 33: 1467-1472.
47. Dianzani MU. Lipid peroxidation in ethanol poisoning: a critical reconsideration. *Alcohol Alcohol.* 1985; 20: 161-173.

48. Asami S, Manabe H, Miyake J, Tsurudome Y, Hirano T, Yamaguchi R, Itoh H, Kasai H. Cigarette smoking induces an increase in oxidative damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. *Carcinogenesis*. 1997; 18: 1763-1766.
49. Jackson MJ. An overview of methods for assessment of free radical activity in biology. *Proc Nutr Soc*. 1999; 58: 1001-1006.
50. Eddy AA. Interstitial inflammation and fibrosis in rats with diet-induced hypercholesterolemia. *Kidney Int*. 1996; 50: 1139-1149.
51. Lee WC, Chao WT, Yang VC. Effects of high-cholesterol diet on the interendothelial clefts and the associated junctional complexes in rat aorta. *Atherosclerosis*. 2001; 155: 307-312.
52. Meier-Bratschi A, Lutz WK, Schlatter C. Methylation of liver DNA of rat and mouse by N-nitrosodimethylamine formed in vivo from dimethylamine and nitrite. *Food Chem Toxicol*. 1983; 21: 285-289.
53. Ima-Nirwana S, Suhaniza S. Effects of tocopherols and tocotrienols on body composition and bone calcium content in adrenalectomized rats replaced with dexamethasone. *J Med Food*. 2004; 7: 45-51.
54. Lowry O, Rosenbrough N, Farr L, Randall R. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 182: 265-275.
55. Dahle LK, Hill EG, Holman RT. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arch Biochem Biophys*. 1962; 98: 253-261.
56. Guillen-Sans R, Guzman-Chozas M. The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1998; 38: 315-330.
57. Ramanathan L, Das NP, Li QT. Studies on lipid oxidation in fish phospholipid liposomes. *Biol Trace Elem Res*. 1994; 40: 59-70.
58. Durak İ, Bingöl NK, Avcı A, Çimen MYB, Kaçmaz M, Karaca L, Öztürk HS. Acute effects of smoking of cigarettes with different tar content on plasma oxidant/antioxidant status. *Inhal Toxicol*. 2000; 12: 641-647.

59. Durak İ, Canbolat O, Kavutcu M, Öztürk HS, Yurtarslanı Z. Activities of total, cytoplasmic and mitochondrial superoxide dismutase enzymes in sera and pleural fluids from patients with lung cancer. *J Clin Lab Anal.* 1996; 10: 17-20.
60. Aebi H. Catalase. In: Bergmayer HU, ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. New York and London: Academic Press Inc., 1974: 673-677.
61. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967; 70: 158-169.
62. Hashimoto S. A new spectrophotometric assay method of xanthine oxidase in crude tissue homogenate. *Anal Biochem.* 1974; 62: 426-435.
63. Itabe H. Oxidized low-density lipoproteins: what is understood and what remains to be clarified. *Biol Pharm Bull.* 2003; 26: 1-9.
64. Sanchez-Muniz FJ, Garcia-Linares MC, Garcia-Arias MT, Bastida S, Viejo J. Fat and protein from olive oil-fried sardines interact to normalize serum lipoproteins and reduce liver lipids in hypercholesterolemic rats. *J Nutr.* 2003; 133: 2302-2308.
65. Yokogoshi H, Oda H. Dietary taurine enhances cholesterol degradation and reduces serum and liver cholesterol concentrations in rats fed a high-cholesterol diet. *Amino Acids.* 2002; 23: 433-439.
66. Oliveira HCF, Cosso RG, Alberici LC, Maciel EN, Salerno AG, Dorighello GG, Velho JA, de Faria EC, Vercesi AE. Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. *FASEB J.* 2005; 19: 278-280.
67. Vijayakumar RS, Surya D, Nalini N. Antioxidant efficacy of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress. *Redox Rep.* 2004; 9: 105-110.
68. Gökkuşu C, Moztafazadeh T. Changes of oxidative stress in various tissues by long-term administration of vitamin E in hypercholesterolemic rats. *Clin Chim Acta.* 2003; 328: 155-161.

69. Schwenke DC, Rudel LL, Sorci-Thomas MG, Thomas MJ. α -Tocopherol protects against diet induced atherosclerosis in New Zealand white rabbits. *J Lipid Res.* 2002; 43: 1927-1938.
70. Hsu H-C, Lee Y-T, Chen M-F. Effects of fish oil and vitamin E on antioxidant defense system in diet-induced hypercholesterolemic rabbits. *Prostag Oth Lipid M.* 2001; 66: 99-108.
71. Salonen RM, Nyyssonen K, Kaikkonen J, Porkkala-Sarataho E, Voutilainen S, Rissanen TH, Tuomainen TP, Valkonen VP, Ristonmaa U, Lakka HM, Vanharanta M, Salonen JT, Poulsen HE; Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention Study. Six-year effect of combined vitamin C and E supplementation on atherosclerotic progression: the Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) Study. *Circulation.* 2003; 107: 947-953.
72. Perticone F, Ceravolo R, Maio R, Cloro C, Candigliota M, Scozzafava A, Mongiardo A, Mastroroberto P, Chello M, Mattioli PL. Effects of atorvastatin and vitamin C on endothelial function of hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis.* 2000; 152: 511-518.

EK 1: Etik Kurul Kararı

ETİK KURUL KARARI

Toplantı Tarihi : 03.07.2002
Toplantı Yeri : Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Odası
Toplantı Sayısı : 2002/02
Karar Sayısı : 2002/02-05

Etik Kurulumuz; mevcut üyelerinin katılımı ile 03.07.2002 tarihinde yapılan toplantıda, Yrd.Doç.Dr.ÖZBEK'in Etik Kurul Başkanlığı'na verdiği "Sigara Dumanına Maruz Bırakma ve/veya Yüksek Kalolestroldü Diyetle Beslenmenin Sıkanıldakü Oksidatif/Antioksidatif Sistem ve Aterosklerotik Plak Şekillenmesi Süreci Üzerine Etkileri: Doğal ve Sentetik Antioksidatif Destekinin Mühim Etkilerinin Araştırılması" isimli projeye ait dosya ve ekleri ile ilgilenmiş olup, Yıldırım Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Yürürlüğünde belirtilen hususları yerine getirmek ve sorumlu araştırmacıları anı olarak üzere, bu çalışmaya yapımında herhangi bir sakınca bulunmadığına, katılan tüm üyelerin oy birliği ile karar vermiştir.

Doç.Dr.Hayrettin KARA
Üye

Doç.Dr.Mustafa BERKELİ
Başkan Vekili

Prof.Dr.Abdullah CEYLAN
Üye

Doç.Dr.Ramazan ŞEKERDOĞRU
Üye

Yrd.Doç.Dr.Hüseyin ÖZBEK
Üye

Başhekim Dr.Emine KARAKA
Üye