



T.C.

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AKROLEİN VERİLEN RATLARDA KONJUGE LİNOLEİK ASİT' İN
BEYİN MİTOKONDRIAL FONKSİYONLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Cansu GÜLER ŞAHİN

Nisan 2019

**AKROLEİN VERİLEN RATLARDA KONJUGE LİNOLEİK ASİT' İN
BEYİN MİTOKONDRIAL FONKSİYONLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

Cansu GÜLER ŞAHİN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Birsen KILIÇ AYDIN

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

NİSAN 2019

Cansu GÜLER ŞAHİN tarafından hazırlanan AKROLEİN VERİLEN RATLARDA KONJUGE LİNOLEİK ASİT' İN BEYİN MİTOKONDRIAL FONKSİYONLARI ÜZERİNE ETKİSİ" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile Amasya Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Birsen KILIÇ AYDIN

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Başkan: Prof. Dr. Ahmet DURSUN

Biyoloji Anabilim Dalı, A.Ü

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye: Zülal ŞEKEROĞLU

Biyoloji Anabilim Dalı, O.Ü.

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Tez Savunma Tarihi: 24/04/2019

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Doç. Dr. Meryem EVECEN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Cansu GÜLER ŞAHİN

AKROLEİN VERİLEN RATLARDA KONJUGE LİNOLEİK ASİT' İN BEYİN MİTOKONDRIAL FONKSİYONLARI ÜZERİNE ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Cansu GÜLER ŞAHİN

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Nisan 2019

ÖZET

Akrolein (AK) insanların sıklıkla maruz kaldıkları, nörotoksik etkisi olduğu bilinen bir kimyasaldır. Konjuge linoleik asit (KLA) birçok biyolojik işlevinin yanında vücutta yağ yakılmasını hızlandıran ve süt ürünlerinden elde edilen bir suplemanttir. Bu çalışmada, AK ile muamele edilmiş rat beyin dokularında KLA' in mitokondriyal oksidatif stres ve bioenerjetik fonksiyonlar üzerine etkisinin çalışılması amaçlanmıştır. Bu nedenle, Sprague Dawley ratlara AK (5 mg / kg.i.p, haftada 6 gün), KLA (200 mg/kg/ o.p, haftada 6 gün) ve AK ile birlikte KLA olmak üzere 30 gün boyunca verildi. Genel olarak, AK verilen grupta mitokondriyal GSH (redükte glutatyon) seviyesi ve antioksidan enzimlerde azalma oldu. Buna karşın, AK verilen grupta mitokondriyal lipit peroksidasyonu (LP) ve protein karbonil (PK) seviyelerinde önemli artışlar gözlemlendi. Ayrıca, AK verilen grupta kompleks I, kompleks IV gibi elektron transport zincir (ETZ) enzimlerinde, mitokondriyal izositrat dehidrogenaz (mİSDH), alfa - ketogluterat dehidrogenaz (KGDH) gibi trikarboksilik asit (TCA) döngüsü enzimlerinde ve ATP miktarında anlamlı azalmalar görüldü. AK + KLA verilen grupta, AK ile oluşan oksidatif stres ve bozulan bioenerjetik parametrelerin tamamen normale döndüğü görüldü. Elde ettiğimiz bulgular sonucunda, KLA' in AK etkisi ile beyin dokusunda artan oksidatif stres ve bozulan mitokondriyal fonksiyonların iyileştirilmesinde etkili olduğu görüldü.

Sayfa adedi :92
Anahtar kelimeler :Akrolein, Konjuge Linoleik Asit, Beyin, Oksidatif Stres, Oksidatif Fosforilasyon Enzimleri, Krebs Döngüsü Enzimleri, Mitokondriyal Fonksiyon.
Danışman :Prof. Dr. Birsen Kılıç Aydın

**THE EFFECT OF CONJUGATED LINOLEIC ACID ON THE
MITOCHONDRIAL FUNCTIONS IN THE AKOLEIN TREATED RAT BRAIN
(MSc.Thesis)**

Cansu GÜLER ŞAHİN

**AMASYA
UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
April 2019**

ABSTRACT

Acrolein (AC) is a chemical that is commonly known to have a neurotoxic effect. Conjugated linoleic acid (CLA) is a supplement is derived from dairy products that accelerates fat burning in the body besides its many biological functions. The aim of this study was to investigate the effect of CLA on mitochondrial oxidative stress and bioenergetic functions in AC treated rat brain. Sprague Dawley rats were given AC (5 mg/kg,o.p, 6 days per) ve CLA (200 mg / kg, o.p., 6 days per week) and WP with AC for 30 days. In general, there were decreases in mitochondrial GSH level and antioxidant enzymes in the AC treated group. In contrast, significant increases were observed in mitochondrial lipid peroxidation (LP) and protein carbonyl (PK) levels in the AC group. Furthermore, in the AC group, were observed significant decrease in electron transport chain (ETZ) enzymes such as complex I and complex IV, tricarboxylic acid (TCA) cycle enzymes such as mitochondrial isocitrate dehydrogenase (mISDH), alpha-ketoglutarate dehydrogenase (KGDH) and ATP level. It was observed that oxidative stress and deteriorated bioenergetic parameters caused by AC were completely normalized in the group AC+CLA. As a result of our findings, it was observed that CLA was effective in improving oxidative stress and impaired mitochondrial functions in brain tissue by the effect of AC.

Page Number :92
Keywords :Akrolein, Conjugated Linoleic Acid, Brain, Oxidative Stress, Oxidative Phosphorylation Enzymes, Krebs Cycle Enzymes, Mitochondrial Function.
Supervisor :Prof. Dr. Birsen Kılıç Aydın

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleőtirilmesinde, tez konumun belirlenmesinde, yüksek lisans eğitimi boyunca değerli bilgilerini bizlerle paylaőan, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen, önemini asla unutmayaağım saygıdeğer danıőmanım Prof. Dr. Birsen KILIÇ AYDIN' a 'Amasya niversitesi' teőekkürü bir borç bilir ve őükranlarımı sunarım. Tez araőtırmalarımın laboratuvar deneyleri aőamasında birlikte çalıőtıđım, çalıőmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen ve gösterdikleri sabır için arkadaőlarım Rahime ER, Hicran AKYOL ve Ali OĞUZ' a teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimi boyunca her anımda yanımda olan canım annem ve babama sonsuz teőekkürler.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİGİLER.....	5
2.1. Akrolein	5
2.1.1. Akroleinin yapısı, kimyasal özellikleri ve oluşum mekanizmaları.....	5
2.2. Konjege Linoleik Asit.....	8
2.2.1. Konjuge linolik asitin içeriği ve biyolojik aktivitesi.....	8
2.3. Reaktif Oksijen Türleri	18
2.3.1. Süperoksit radikali	18
2.3.2. Hidrojen peroksit	19
2.3.3. Hidroksil radikali	19
2.3.4. Nitrik oksit ve peroksinitrit.....	20
2.3.5. Singlet oksijeni.....	21
2.4. Serbest Radikallerin Kaynakları	21
2.4.1. Endojen Kaynaklar.....	21
2.4.2. Ekzojen Kaynaklar.....	22
2.5. Serbest Radikallerin Yol Açtığı Hasarlar	23
2.5.1. Karbonhidratlar üzerine etkileri	23
2.5.2. Membran lipitlerine etkileri (Lipit peroksidasyonu).....	23
2.5.3. Proteinler üzerine etkileri.....	24

2.5.4. Nükleik asitler ve DNA' ya etkileri	25
2.6. Oksidatif Stres.....	25
2.7. Antioksidanlar.....	26
2.7.1. Enzimatik olan antioksidanlar.....	27
2.7.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar.....	30
2.8. Mitokondri	32
2.8.1. Mitokondrinin yapısı.....	32
2.8.2. Hüresel solunum ve mitokondriyal enzimler	33
2.9. Mitokondri ve Oksidatif Stres.....	40
2.10. Mitokondriyal Hastalıklar.....	41
2.10.1. Kearns-sayre sendromu (KSS).....	44
2.10.2. Melas sendromu	44
2.10.3. Pearson sendromu	45
2.10.4. MERRF (Miyoklonik Epilepsi Ragged Red Fibers).....	45
2.10.5. NARP (Nöropati, Ataksi, Retinitis Pigmentosa)	45
2.10.6. LHON (Leber' in Herediter Optik Neropatisi)	45
2.10.7. Alper hastalığı (progresif infantil poli distrofi)	46
2.10.8. Friedreich ataksisi	46
2.10.9. Kartilaj-saç hipoplazisi (KSH).....	46
2.11. Beyin.....	46
2.11.1. Beyinin yapısı ve görevleri	46
2.11.2. Beyin hastalıkları ve mitokondri.....	50
3. MATERYAL VE METOT	54
3.1. Materyal	54
3.1.1. Analizlerde kullanılan cihazlar ve malzemeler.....	54

3.1.2. Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler ve hazırlanışları	54
3.1.3. Deney hayvanları ve deney grupları	55
3.2. Metod	56
3.2.1. Dokularının elde edilmesi ve analizlere hazırlanması	56
3.2.2. Beyinden mitokondri izolasyonu	56
3.2.3. Mitokondriyal oksidatif stresin belirlenmesi	57
4. BULGULAR.....	62
4.1. Akrolein ve Konjuge Linoleik Asitin Beyin Mitokondrial Fraksiyonunda Enzimatik ve Enzimatik Olmayan Oksidatif Stres Parametreleri Üzerine Etkisi....	62
4.1.1. Mn-süperoksit dismutaz üzerine etkisi	62
4.1.2. Gpx üzerine etkisi	62
4.1.3. Redükte glutatyon üzerine etkisi.....	63
4.1.4. Lipit peroksidasyonu üzerine etkisi	64
4.1.5. Protein karbonil miktarı üzerine etkisi.....	65
4.2. Akrolein ve Konjuge Linoleik Asitin Beyin Mitokondrial Oksidatif Fosforilasyon ve Trikarboksilik Asit Döngüsü Enzimleri ve ATP Üzerindeki Etkileri	66
4.2.1. Kompleks I üzerine etkisi	66
4.2.2. Kompleks II üzerine etkisi	67
4.2.3. Kompleks IV üzerine etkisi	68
4.2.4. İzositrat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkisi.....	69
4.2.5. Alfa ketoglutarat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkisi.....	70
4.2.6. Malat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkisi.....	70
4.2.7. Beyin ATP miktarı üzerine etkisi	71
5. TARTIŞMA	73
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	78
KAYNAKLAR	79

ÖZGEÇMİŞ 92



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge

Sayfa

Çizelge 2.1. Konjuge linoleik asidin sağlıkta faydalı etkileri	17
Çizelge 2.2. Mitokondrial hastalıkların etkilediği yapılar ve bunlara ait semptomlar....	43
Çizelge 2.3. Beyin yarım kürelerinin fonksiyonları.....	49



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Akroleinin kimyasal yapısı.	6
Şekil 2.2. Üstte t-10 c-12 KLA, ortada c-9 t-11 KLA ve altta LA (cis 9, cis 12) konjuge linoleik asit ve kaynak linoleik asitin üç boyutlu yapıları	9
Şekil 2.3. Linoleik asitin yapısı (üstte), c-9, t-11, KLA (ortada) ve t-10, c-12 KLA izomeri (altta)	10
Şekil 2.4. 18 Karbonlu doymamış yağ asitlerinin rumende biyohidrojenasyonu	12
Şekil 2.5. Vücuttaki önemli serbest radikaller ve serbest radikal hasarı sonuçları.....	23
Şekil 2.6. Protein oksidasyonunun en yaygın sonuçları	25
Şekil 2.7. Antioksidanların hücredeki etkileri	27
Şekil 2.8. SOD' un üç farklı formu ve hücrede bulunduğu kısımlar	28
Şekil 2.9. Hidrojen peroksidin, NADPH tarafından glutatyon aracılığıyla indirgenmesi.....	31
Şekil 2.10. Oksidatif mtDNA hasarı ve yaşlanma	41
Şekil 2.11. Beyinde biriken protein sonucu meydana gelen hasar	52
Şekil 4.1. Grupların beyinde MnSOD aktivitesi üzerine etkileri.....	62
Şekil 4.2. Grupların beyinde Gpx aktivitesi üzerine etkileri	63
Şekil 4.3. Grupların beyinde GSH miktarı üzerine etkileri	64
Şekil 4.4. Grupların beyinde LPO miktarı üzerine etkileri.....	65
Şekil 4.5. Grupların beyinde protein karbonil miktarı üzerine etkileri.....	66
Şekil 4.6. Grupların beyinde Kompleks I aktivitesi üzerindeki etkileri	67
Şekil 4.7. Grupların beyinde Kompleks II aktivitesi üzerindeki etkileri	68
Şekil 4.8. Grupların beyinde Kompleks IV aktivitesi üzerindeki etkileri.....	69
Şekil 4.9. Grupların beyinde izositrat dehidrogenaz aktivitesi üzerindeki etkileri.....	69

(devam) Şekiller dizini

Şekil 4.10. Grupların beyinde alfa ketogluterat dehidrogenaz aktivitesi üzerindeki etkileri	70
Şekil 4.11. Grupların beyinde malat dehidrogenaz aktivitesi üzerindeki etkileri.....	71
Şekil 4.12. Grupların beyinde ATP miktarı üzerindeki etkileri.....	72



RESİMLER DİZİNİ

Resim

Sayfa

Resim 2.1. Mitokondri yapısı.....	32
Resim 2.2. Elektron transport zinciri birimleri	38
Resim 2.3. Nöronun yapısı.....	47
Resim 2.4. Beyin lobları	48



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
HO₂·	Perhidroksi radikali
H₂O₂	Hidrojen peroksit
O₂	Moleküler oksijen
OH·	Hidroksil radikali
O₂·	Süperoksit radikali
Kısaltmalar	Açıklama
AK	Akrolein
ASETİL CoA	Asetil koenzim A
ATP	Adenosin tri fosfat
CoQ	Koenzim Q10
EC-SOD	Ekstrasellüler SOD
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EFAD	Esansiyel yağ asiti noksan
EGTA	Etilen glikoltetra asetik asit
ETZ	Elektron transport zincir
DCIP	Dichloorindofenol
DNPH	2,4-dinitrofenil hidrazin
DTNB	5-5'-ditiobis 2- nitrobenzoik asit
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid

GST	Glutatyon-S-transferaz
GSH	Redükte glutatyon
GSSG	Okside glutatyon
GPx	Glutatyon peroksidaz
GR	Glutatyon redüktaz
HTAB	Hekzdesil amonyum bromid
ISD	İzositrat dehidrogenaz
İ.P	İntroperitonal
KAT	Katalaz
KCN	Potasyum siyanür
KGDH	Alfa ketoglutarat dehidrogenaz
KLA	Konjuge linoleik asit
LC	Lewy cisimciği
L·	Lipit radikali
LOO·	Lipit peroksit radikalleri
LOOH	Lipit peroksitleri
LP	Lipit peroksidasyonu
LPS	Lipopolisakkarit
MD	Malat dehidrogenaz
MDA	Malondialdehit
mISDH	Mitokondriyal izositrat dehidrogenaz
MSS	Merkezi sinir sistemi
mtDNA	Mitokondriyal DNA
MTT	Metil thiazoltetrazolyum
NADPH	Redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NADH	Redükte nikotinamid adenin dinükleotit
NO	Nitrik oksit
PDH	Pirüvat dehidrojenaz
PK	Protein karbonil
ROT	Reaktif oksijen türleri
RNA	Ribo nükleik asit
SOD	Süperoksit dismutaz
tRNA	Taşıyıcı RNA
TBA	Tiyobarbitürik asit
TCA	Trikarboksilik asit

1. GİRİŞ

Nörodejeneratif hastalıklar, yaşlılarda hızla yayılan, hayati tehlike oluşturan hastalıklardır. Dünya nüfusunun hızla artması ile birlikte artan vaka sayısı hem aileler hem de toplum için önemli bir sağlık yükü oluşturmaktadır. Nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde rol oynayan faktörler henüz tam olarak aydınlatılmamış olsa da bazı biyolojik mekanizmalar önerilmiştir. Bunlardan en önemlisi mitokondri ve oksidatif stresin bu hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynadığıdır. Beyin dokusu mitokondrilerinde meydana gelen bozukluklar ve oksidatif stresin ortadan kaldırılmasına yönelik antioksidanların kullanımı şimdilik bu hastalıkların önlenmesinde önemli bir stratejik olarak görünmektedir (Kausar, Wang, Cui, 2018).

Reaktif oksijen türleri (ROT), çeşitli hücrel bölmelerde üretilir. Bununla birlikte, mitokondri, toplam hücrel ROT' nin sayısının % 90' ını ürettiği için ROT' ne önemli bir katkıda bulunur. Bir mitokondride, en az sekiz bölgenin ROT' nin üretilmesinde rol oynadığı bilinmektedir. Bununla birlikte, mitokondriyal kompleksler I, II ve IV ROT' nin en fazla oluştuğu yerlerdir (Lenaz, 2001; Kausar ve diğerleri, 2018).

Oksidatif fosforilasyon, eşleştirilmemiş elektronlar üreten ana işlemdir. Bu eşleşmemiş elektronlar O₂ ile etkileşime girerek yüksek oranda reaktif serbest radikallerin (süperoksit iyonları) üretilmesine neden olur. Süperoksit iyonları, H₂O₂ ve hidroksil iyonları (-OH) gibi diğer ROT' ne dönüştürülür (Kausar ve diğerleri, 2018).

Nörodejeneratif hastalıklarda oluşan beta amiloid, tau ve huntingtin gibi oksidatif stres sonucu oluşmuş hasarlı proteinler mitokondrideki ETZ enzimlerini ve ATP (adenozin tri fosfat) seviyesini azaltmaktadır. Ya da tam tersi mitokondriler tarafından oluşturulan ROT bu anormal proteinlerin oluşumunu artırmaktadır. Kısacası mitokondriyal bozuklukların nörodejeneratif hastalıkların sebebi mi yoksa sonucu mu olduğu tartışmalı bir durumdur (Abramov, Berezhnov, Fedotova, Zinchenko, Dolgacheva, 2017).

Son derece aktif olan mitokondriler çift zarlı organellerdir. Mitokondriyal solunum zinciri iç zarın içinde bulunur ve burada oksidatif fosforilasyon oluşur. Solunum zinciri ya da ETZ' i, Kompleks I (NADH (Redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotit) ubikinon oksidoredüktaz), II (süksinat ubikinon oksidoredüktaz), III (ubikinon sitokrom c redüktaz)

ve VI (sitokromoksidaz) enzimlerinden oluşur. Kompleks I, II, III ve IV tarafından protonlar membranlar arası boşluğa pompalanır ve böylece elektrokimyasal bir gradient oluşur. Kompleks V (F₁F₀-ATP sentaz) tarafından ADP' den ATP oluşturulur (Morais ve De Strooper, 2010). Bazı Alzaymır hastalıklarında serbest radikallerde artış, sitokrom c oksidaz aktivitesinde ve ATP miktarında azalma gözlenmiştir (Cardoso, Proenca, Santos, Santana, Oliveira, 2004). Buna ek olarak, transgenik fare modelinden alınan kesitlerde bir amiloid öncü proteini (A β PP) içeren nöronların mitokondriyal membran potansiyelinde ve ATP seviyelerinde azalma gözlenmiştir (Keil ve diğerleri, 2004).

Alzaymır hastalığında olduğu gibi Parkinson hastalığında da mitokondriyal bozukluklar önemli rol oynar. İnsanlarda ve deney hayvanlarında mitokondriyal toksinler ile Parkinson benzeri sendromlar oluşturulmuştur. Ek olarak, bir mitokondriyal Kompleks I inhibitörü rotenona maruz bırakılan sıçanlarda Parkinson hastalarının davranışsal ve nöropatolojik özelliklerinin olduğu gözlemlenmiştir. Bunu destekleyecek şekilde Parkinson hastalarının beyin örneklerinde Kompleks I hasarı gösterilmiştir (Panov ve diğerleri, 2005). Parkinson hastalığı ile mitokondriyaldeki fonksiyon bozukluğu arasında çok güçlü bir ilişki bulunmuştur. Alzaymır hastalıklarında durum biraz daha karışık olmasına rağmen mitokondri fonksiyon bozuklukları Alzaymır hastalığının özellikle belirli formlarının patolojisinde önemli rol oynamaktadır (Morais ve De Strooper, 2010).

Sonuç olarak denilebilir ki başta Alzaymır ve Parkinson olmak üzere birçok nörolojik ve nörodejeneratif hastalığın temelinde mitokondriyal fonksiyon bozuklukları ve mitokondriden kaynaklanan aşırı ROT üretimi rol oynamaktadır.

AK, yüksek derecede elektrofilik bir α , β -doymamış aldehittir. Termal olarak yaygın üretilen çevre ve gıda kirleticileri, karbonhidratlar, amino asitler dahil işlenmiş organik bileşikler ve yağlar önemli AK kaynaklarıdır. Yağda kızartılmış gıdalar, tütün dumanı, plastik, odun ve petrolün eksik yanması gibi çevresel kaynaklarla AK' e maruz kalınmaktadır. AK, ham kakao çekirdeği, bitkisel yağlar, beyaz ekmek, şarap, viski, üzüm çilek, domates ve balık gibi yiyecek ve içeceklerde de belirli oranlarda bulunmaktadır. Ayrıca AK amino asit ve poliamin metabolizması yolu ile endojen olarak da oluşabilir. AK su kanallarının alg ve yumuşakçaların kontrolsüz büyümesini önlemek için biosit olarak kullanılmaktadır ve su kirliliğinin de önemli bir nedenini oluşturmaktadır (Selmanoğlu, Özgün Gökçen, Karacaoğlu, 2018).

Yapılan çalışmalar AK' nin oldukça yüksek reaktif bir nörotoksik madde olduğunu göstermektedir. AK, lipid peroksidasyonunun yan ürünlerinden biridir. Yüksek aktiviteye sahip olduğu için hücrel nukleofilik grupları ekleyerek oksidatif strese neden olur. Alzaymır hastalarının hasarlı beyin bölgelerinde AK seviyesinin belirgin şekilde arttığı görülmüştür. Alzaymır hastalarının beyinlerinde karakteristik olarak bulunan amiloid-beta peptidinin oluşumunda hidrojen peroksit (H₂O₂) önemli rol oynar. Ayrıca H₂O₂ beyinde diğer proteinlerin, lipidlerin ve DNA' nın zarar görmesine de neden olur (Singh, Murthy, Ramassamy, 2010).

AK, kalp, spinal kord ve beyin dokularında mitokondriyal solunumu bozmaktadır. Bu nedenle AK etkisi ile artan oksidatif stres sinir dokusundaki normal bioenergetik metabolizmanın bozulduğu görülmektedir. *In vitro* beyin mitokondrisi ile yapılan çalışmalarda AK etkisi ile mitokondriyal GSH miktarında azalma görülmüştür. H₂O₂ uzaklaştırılmasında büyük rol oynayan katalaz (KAT) enzimi beyin mitokondrilerinde diğer dokulara göre çok daha azdır. Bu nedenle beyin mitokondrilerindeki GSH miktarı diğer dokulara göre daha önemlidir ve H₂O₂' in GSH tarafından uzaklaştırılması nöron mitokondrileri için hayati önem taşır (Shi, Rickett, Sun, 2011).

AK' e maruz bırakılan Moğol gerbilllerinin ön beyninden izole edilen mitokondrilerin proteomik analizleri yapıldığında burada enerji metabolizmasında, protein sentezinde, nörotransmisyonunda, sito-skeletal bütünlükde ve nöronal plastisititede çok önemli rol oynayan proteinlerde karbonil gruplarının oluştuğu ve buna bağlı olarak fonksiyonlarını kaybettikleri rapor edilmiştir (Mello ve diğerleri, 2007).

Birçok kronik hastalığın diyetsel faktörlerle bağlantılı olduğu bilinmekte ve bu risk faktörlerinin ortadan kaldırılması için alternatif tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle son 20 yıldır araştırılan KLA' in vücut yağ kitlesinin azaltılması, kardiovasküler hastalıkların ve kanserin önlenmesi, immun ve anti inflamasyonel yanıtların düzenlenmesi, oksidatif stresin azaltılması ve hatta kemik kütlelerinin geliştirilmesi gibi birçok biyolojik işlevinin olduğu bilinmektedir. KLA' in bu biyolojik etkilerinin cis-9, trans-11 ve trans-10, cis-12 olmak üzere 2 ayrı majör bileşeni arasındaki etkileşimlerden kaynaklandığı bilinmektedir. Fosfolipid metabolizmasını değiştirmeye ek olarak, KLA bir antioksidandır ve bitkisel kaynaklı çoğu antioksidandan farklı olarak hayvan kaynaklı ve insan

beslenmesinde çok önemli rol oynayan süt ve süt ürünlerinde bulunmaktadır (MacDonald, 2000).

Tokoferol gibi radikal süpürücü antioksidanların sinir dokusunu koruyucu etkileri olduğu bilinmektedir. Aynı şekilde KLA' in de serbest radikal süpürücü etkilerinin olduğu Yu tarafından gösterilmiştir (Yu, 2001).

Son zamanlarda sıçanlarla yapılan çalışmalarda KLA desteğinin yaşa bağlı nöral hasarı büyük ölçüde engellediği ve bu nedenle sinir hücrelerini koruyucu etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur (Monaco ve diğerleri, 2018).

Oksidatif stres ve mitokondriyal fonksiyon bozukluklarının iskemi-reperfüzyon hasarı, travmatik hasarlar, Parkinson hastalığı, Alzaymır hastalığı nörodejeneratif bozukluklarda rol oynadığı bilinmektedir. Çalışmamızda endojen olarak oluştuğu gibi çevresel olarak da kaçınılmaz olarak maruz kaldığımız AK ile özellikle kilo verme amaçlı olarak kullanılan ve birçok biyolojik etkileri olan KLA'in sıçan beyin mitokondrilerinde oksidatif stres ve bioenergetik parametreleri üzerine olan etkisini inceledik. Yukarıda da açıkladığımız gibi hücrelerin enerji merkezleri olan mitokondrilerdeki bozukluklar nörodejeneratif hastalıklarla yakından ilişkilidir. Bu nedenle çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin, beyin ve sinir dokusu ilgili hastalıkların aydınlatılmasına katkı sağlayacağını düşünüyoruz.

2. GENEL BİGİLER

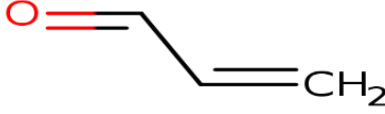
2.1. Akrolein

2.1.1. Akroleinin yapısı, kimyasal özellikleri ve oluşum mekanizmaları

2-Propenal, olarak bilinen AK, oda sıcaklığında tahriş edici bir koku yayan renksiz veya sarımsı renkte yanıcı bir sıvıdır. Aynı zamanda oldukça elektrofilik a, b doymamış aldehittir (Zhu, Sun, Jiang, Chen ve Wang, 2015). AK, gıda maddelerinde (kakao çekirdeği, çikolata likörü, kızarmış patates vb.), hayvansal veya bitkisel yağların yüksek sıcaklıklarda ısı ile muamelesi sırasında üretilen uçucularda da bulunur (Faroon ve diğerleri, 2008; Umano, 1987). Endüstriyel ölçekli üretim için birçok organik kimyasalın/malzemelerin sentezinde vazgeçilmez bir ara madde olarak kullanılır (Faroon ve diğerleri, 2008). Endüstriyel salınımın yanı sıra, çevresel olarak petrol, kömür, plastik, ahşap malzemeler ve tütün dahil olmak üzere çok çeşitli organik maddelerin yanmasına dayanmaktadır (Beauchamp, Andjelkovich, Kligerman, Morgan ve Heck, 1985).

AK' de iki reaktif yarı molekülün varlığı: Konjuge $C = C - C = O$ sisteminde $C = C$ çiftli bağ ve $C = O$ karbonil grubu, belirgin olarak elektrofilikliğinden sorumludur (Zhu, 2011). AK, a, b doymamış aldehytler arasında en güçlü elektrofilik olarak bilinir; bu nedenle, biyolojik nükleofillere karşı çok yüksek reaktiviteye sahiptir ve bu da güçlü toksisiteye neden olur (Burcham, 2008). Su, alkol ve dietil eterdeki çözünürlüğü nedeniyle AK, difüzyon yoluyla hücre membranlarından kolayca geçebilir (Stevens ve Maier, 2008).

AK endüstriyel olarak propilenden üretilir, ağırlıklı olarak biyosid olarak kullanılır ve metionin amino asidi gibi diğer kimyasal bileşikler için bir yapı taşı olarak kullanılır. AK değiştirilmiş gıda nişastaları hazırlanmasında bir eterleştirme maddesi olarak da kullanılır. Aynı zamanda AK su arıtımında kullanılan bir herbisit ve yosun öldürücüdür. Örneğin, mikroorganizmalar tarafından üretilen *Clostridium perfringens*. AK reaktif olan ve nispeten elektrofilik bir bileşiktir bu nedenle yüksek toksisiteye sahiptir. AK için ana metabolik yol, GSH' un alkillenmesidir. Dünya Sağlık Örgütü vücut ağırlığında kilogram başına günde 7,5 mg oral AK alımının tolere edilebildiğini belirtmiştir. Şekil 2.1' de Akroleinin kimyasal yapısı verilmiştir (URL 1).



Şekil 2.1. Akroleinin kimyasal yapısı

İnhalasyon (nefes alma), oral veya dermal maruz kalma sonrasında insanlar için toksiktir. Akut (kısa süreli) inhalasyona maruz kalınması, üst solunum yolları tahrişine ve tıkanıklığa neden olabilir. Cilt, burun kanalları ve gözler için güçlü bir tahriş edicidir. İnsanlarda üreme, gelişimsel veya kanserojen etkileri hakkında hiçbir bilgi mevcut değildir ve mevcut hayvan kanser verileri, AK' nin insanlarda kanserojen olduğunu belirlemek için yetersizdir (URL 1).

Akrolein metabolizması ve Akroleinle ilgili yapılan deneysel çalışmalar

Geçmişte, hücreler, dokular ve hayvanlarda AK' nin toksikolojik profilini oluşturmak için kapsamlı çalışmalar yapılmıştır (Zhu ve diğerleri, 2011). *Carassius Auratus* AK' e maruz bırakıldığında böbreklerde vazodilatasyona, göllenmeye, koyu renkli melanomakrofaj yığınları ile renal parenkimde vakuol oluşumlarına, parenkimden ayrılan renaltübül ve toplayıcı kanalların epitellerinde hiperplazi, vakuolleşme ve deformasyona, parenkimde ve toplayıcı kanalların etrafında fibröz doku oluşumuna, kanamaya, infiltrasyona ve nekroza, kısaca böbrek hasarına yol açmıştır (Arman, İşisağ Üçüncü).

Bir başka çalışmada AK' nin 60 dakika boyunca zamana bağlı etkisi 500 mM (1,0 mM / mg protein) ile inkübe edilen mitokondriyal kompleks I ile denenmiştir. AK, 10 dakika içinde kompleks I aktivitesinde hızlı bir düşüşe neden olduğu ve 60 dakikadan daha uzun inkübasyon, kompleks I aktivitesinde daha fazla azalmaya neden olmadığı görülmüştür. Mitokondri kompleks I etkinliği (1,0 mmol/mg protein) 500 mM AK' de düşmeye başladı ve AK derişiminin yükselmesiyle yavaş bir şekilde azaldığı görülmüştür. Bununla birlikte, 1,5 mM (3,0 mmol / mg protein) AK konsantrasyonunda, yaklaşık % 50 enzim aktivitesi kalmıştır. Kompleks II aktivitesi, 100 mM (0,2 mmol / mg protein) AK konsantrasyonunda ve artan AK konsantrasyonları ile birlikte keskin bir şekilde azalmıştır. Kompleks I'in

aksine, kompleks II aktivitesinin % 80'inden fazlasını 1000 mM (2,0 mmol / mg protein) AK konsantrasyonunda kaybettiği görülmüştür. Kompleks III, IV ve V aktiviteleri incelenen en yüksek konsantrasyonda (1,0 mM veya 2,0 mmol/mg protein) bile değişmemiştir (Sun, Luo, Long, Wei ve Liu, 2006).

Mitokondrinin yaşlanma sırasında oksidatif hasar oluşturduğu bilinmektedir. Mitokondrial disfonksiyonun yaşlanmaya ve dejeneratif hastalıklara katkıda bulunduğu yönünde güçlü kanıtlar vardır. Mitokondriyal fonksiyon üzerindeki AK' nin önleyici etkileri 1973 yılında öne sürülmüştür. AK' nin mitokondri üzerindeki toksik etkileri *in vitro* olarak PC12 hücreleri ve CHO hücreleri gibi kültür hücrelerinde veya beyin, omurilik, kalp ve akciğerden izole mitokondrilerde ve ayrıca saf mitokondriyal enzim pirüvat dehidrojenaz (PDH) ve KGHD' da araştırılmıştır (Sun ve diğerleri, 2006).

AK' nin hepatotoksositeye neden olduğu görülmüştür, 45 gün boyunca sıçanlara AK verilmesiyle yapılan bir *in vivo* çalışmada karaciğer mitokondriyal fonksiyonu araştırılmıştır. Sonuç olarak mitokondriyal geçirgenlik, protein oksidasyonu, mitokondrial kompleks I, II, III, IV ve V ve PDH, KGDH enzimlerinde toksik etkilere neden olduğu bulunmuştur. Ayrıca sıçan karaciğerinden izole edilen mitokondrilerde AK' nin, malat dehidrojenaz (MD) ve mitokondriyal solunum enzimleri üzerinde toksik etkilerinin olduğu da bulunmuştur (Sun ve diğerleri, 2006).

Farelerle yapılan bir çalışmada AK verilen grupların lökosit, monosit, MCV, MCHC, hematokrit, platelet ve trombosit değerleri kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. 0,5 mg/kg/gün AK uygulanan sıçanların lökosit yüzdesinde kontrol grubundan farklı olarak anlamlı derecede artış görülmektedir. Aynı çalışmada AK' e maruz bırakılmış sıçanların kontrol gruplarındaki sıçanlara göre beyin hücre çekirdeklerinde küçülmeler meydana gelmiştir ve sitoplazmanın kaybolduğu gözlenmiştir (Mülayimçelik, 2012).

Nörofilament proteinlerinin AK ile muamele edildiği *in vitro* bir çalışmada artan doz oranına bağlı olarak nörofilamentlerde birikim olduğu gözlenmiştir (Jeong ve Kang, 2008).

Yapılan başka bir çalışmada sıçanların beyin dokusundan yapılan immünohistokimyasal incelemelerde, uygulama gruplarına ait sıçanların beyin dokularında kontrol gruplarından

farklı olarak nörofilament birikiminin istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu gözlenmiştir. AK' nin gelişmekte olan sıçanların beyin hücrelerinde nörofilamentler üzerinde olumsuz etkiye neden olduğu ve dolayısıyla hücre iskeleti yapısını olumsuz yönde etkilediğini söyleyebiliriz (Mülayimçelik, 2012).

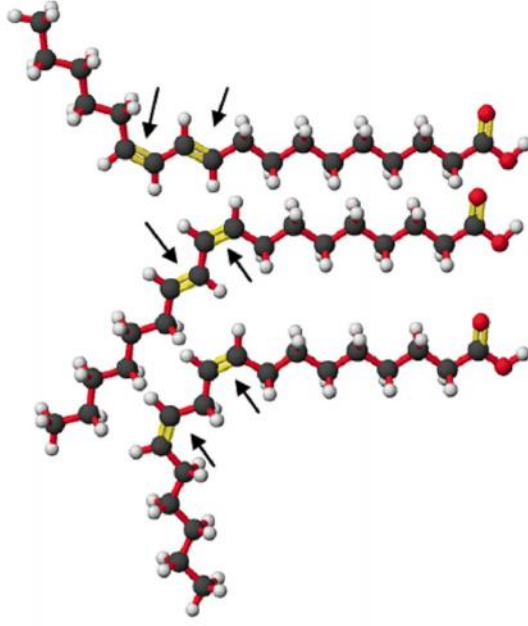
2002 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün AK ile ilgili yayınlamış olduğu raporda, Sprague Dawley sıçanları ile yapılan bir çalışmada oral gavaj yöntemi ile hayvanlara 102 hafta süreyle, 0,05 mg/kg/gün, 0,5 mg/kg/gün, 2,5 mg/kg/gün AK verilmiştir. Çalışmanın devam ettiği süre boyunca 0,5 mg/kg/gün ve 2,5 mg/kg/gün AK verilen sıçanlarda ölüm oranlarının arttığı gözlenmiştir. 90 gün süreyle AK verilen sıçanlarla ilgili yapılan başka bir çalışmada, sıçanlara 0,75 mg/kg, 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg ve 10 mg/kg AK verilmiş ve deney süresince 2,5 mg/kg, 5 mg/kg ve 10 mg/kg doz gruplarında deney süreci tamamlanmadan ölümler olduğu gözlenmiştir. Yürütülen aynı çalışmada 10 mg/kg/gün AK verilen gruba ait sıçanlarda anormal nefes alıp verme, göz ve burunda akıntı, bozulmuş tüy yapısı ve gruba ait tüm sıçanlarda kilo kaybı gibi bulgulara rastlanmıştır (Auerbach, 2008).

Yapılan birçok çalışmada, AK ve ayrıca 4-hidroksi-2-transnonenal gibi diğer lipid peroksidasyonu ürünleri nörolojik hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir. Beyin ya da medulladaki endojen AK seviyesinin Alzaymır, Parkinson, ALS ve diğer nörolojik hastalığın kişilerde arttığı belirlenmiştir. Ayrıca Alzaymır hastalarında DNA-AK ataklarının seviyesinin arttığı da belirtilmiştir (Abraham ve diğerleri, 2011).

2.2. Konjuge Linoleik Asit

2.2.1. Konjuge linolik asitin içeriği ve biyolojik aktivitesi

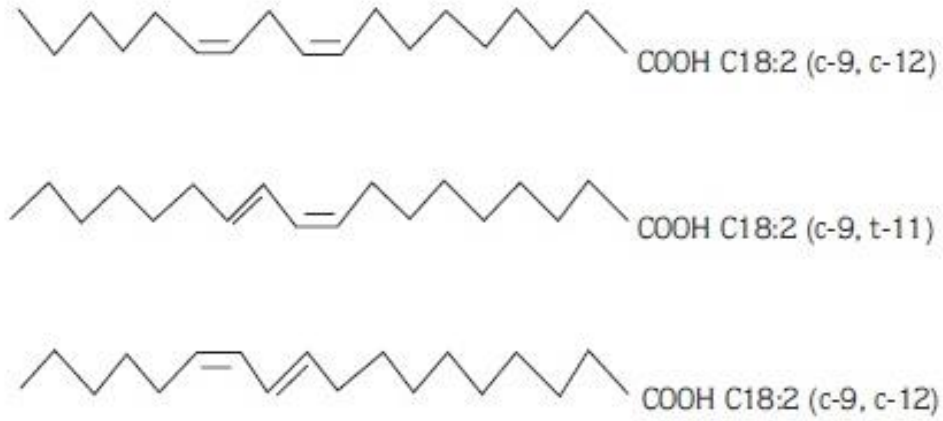
KLA pozisyonel ve geometrik linoleik asit (LA) izomerlerinin (C18:2, cis-9, cis-12), insanlar ve hayvanlar için esas bir yağ asitinin karışımıdır, 8 ve 9, 10 ve 11, 10 ve 12, veya 11 ve 13. zincirde bir çift bağ içerir (Eulitz ve diğerleri, 1999). Bu pozisyonel konjuge dien izomerlerin her biri cis-trans, trans-cis, cis-cis ya da trans-trans geometrik düzende gerçekleşir (Aydın, 2005). Şekil 2.2' de üstte t-10 c-12 KLA, ortada c-9 t-11 KLA ve altta LA (cis 9, cis 12) konjuge linoleik asit ve kaynak linoleik asitin üç boyutlu yapıları verilmiştir (Kaya, 2009).



Şekil 2.2. Üstte t-10 c-12 KLA, ortada c-9 t-11 KLA ve altta LA (cis 9, cis 12) konjuge linoleik asit ve kaynak linoleik asitin üç boyutlu yapıları

KLA' in biyolojik özelliklerinden dolayı KLA' e büyük ilgi görülmektedir. KLA ile beslenen hayvan modelleri üzerinde etkili bir şekilde antikarsinojen olduğu ve kalp-damar hastalıkları riskini azalttığı gösterilmiştir. KLA' in immün sisteminde blastogenezisi ve makrofajların öldürme yeteneklerini artırdığı da bulunmuştur. Tüm bu biyolojik aktivitelere ek olarak KLA' in domuz ve kemiricilerin vücutlarındaki yağ oranını azalttığı da rapor edilmiştir. Göstermiş olduğu biyolojik özelliklerinden dolayı; yumurta, kırmızı et ve süt ürünleri içeriğinin KLA yönünden zenginleştirilmesi insan beslenmesi bakımından önem kazanmıştır (Aydın, 2005).

KLA' e olan ilgi, kanseri tetikleyen bileşenlerin hayvan modellerindeki antikarsinojenik etkinin gözleminin takip edilmesini ciddi oranda yükseltmiştir. KLA' in antikarsinojenik etkilerine ek olarak, bağıışıklık işlevini yükseltme, vücut yağını azaltmak ve yağsız vücut kütleini artırmak için, aterosklerotik lezyonlarını engellediği rapor edilmiştir. KLA birçok izomerin karışımı olduğu için, herhangi bir izomerin farklı etkinlikleri olabilir veya sinerjik olarak çalışabilir. Mevcut durumda, c-9, t-11 KLA ve t-10, c-12 KLA izomerleri fizyolojik özellikleri ortaya koyduğu gösterilen tek izomerlerdir. Şekil 2. 3' de Linoleik asitin yapısı (üstte), c-9, t-11, KLA (ortada) ve t-10, c-12 KLA izomeri (altta) verilmiştir (Aydın, 2005).



Şekil 2.3. Linoleik asitin yapısı (üstte), c-9, t-11, KLA (ortada) ve t-10, c-12 KLA izomeri (altta)

Konjuge linoleik asitin besinsel kaynakları

En önemli KLA kaynağı, geviş getiren hayvanlardaki vücut dokuları, yağ dokusu, süt ve süt ürünleridir (Kara, 2009). Elli yıldan fazladır, KLA' in süt ürünlerinde ve geviş getiren hayvanlardan elde edilen diğer besinlerde bulunduğu bilinir (Chin, Liu, Storkson, Ha ve Pariza, 1992). Az miktarda da olsa kümes hayvanları ve yumurtaları önemli KLA kaynaklarıdır. Tavuk etine göre hindi eti daha yüksek oranda (yaklaşık 2,5 mg KLA/g yağ) KLA içerir. Bitkisel kaynaklı besinlerde ise çok düşük miktarlarda bulunabilir. Bitkisel yağlarda rafine işlemleri olan ısıtma, ağartma ve deodorizasyon gibi basamakların etkisiyle az miktarda KLA oluşmaktadır. KLA miktarı danada az miktarda bulunurken (yaklaşık 2,7 mg KLA/g yağ) en yüksek miktarda koyun etinde (yaklaşık 5,6 mg KLA/g yağ) bulunur. KLA/g yağ sığır etinde 2,9-4,3 mg aralıklarında bulunduğu bilinmektedir. Yapılan başka çalışmalarda peynir ve yoğurt gibi besinlerde KLA konsantrasyonunun hayvanların beslenme şekline bağlı olarak 3,6-6,2 mg KLA/g yağ aralıklarında olduğu bildirilmiştir. Su ürünlerinde düşük miktarlarda (0,1-0,9 mg KLA/g yağ arasında) bulunur. Yumurta sarısında da az miktarda KLA bulunmaktadır (Kaya, 2009). İnek sütündeki KLA derişimi değişkendir ve 1 gram yağda KLA, 2,4-21,8 mg aralığında değişkenlik gösterir (Riel, 1963). Sütteki KLA derişimi, bir hayvanda, sürü arasında ve mevsimler arasında değişkenlik gösterebilir. En büyük KLA derişimine, hayvanların otlama dönemi boyunca erişilmiştir (Aydın, 2005). İnsan sütündeki KLA seviyesi toplamı, inek sütündekinden daha azdır ve yağın % 0,37' si ile % 0,75' i arasında değişiklik gösterir (Fritsche ve diğerleri, 1999). Büyükbaşlardaki ve

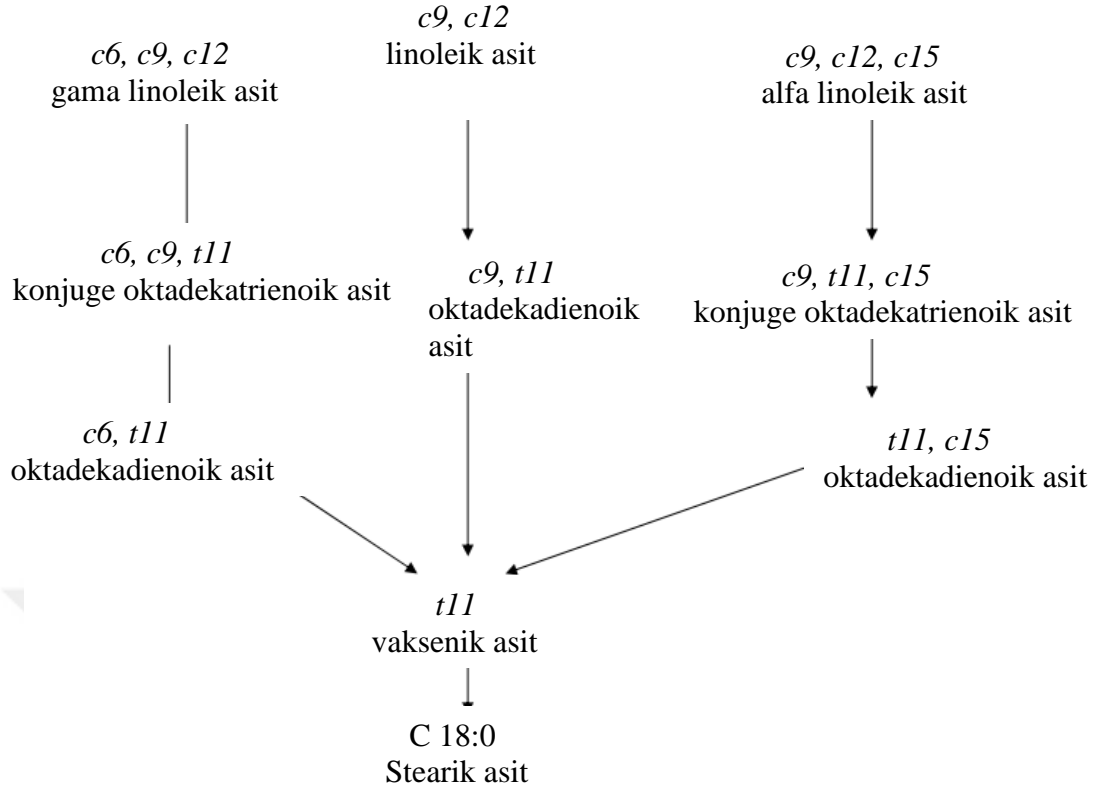
insan sütündeki başlıca KLA izomeri c-9, t-11 KLA izomeri olarak rapor edildi (Parodi, 1977; Fritsche ve diğerleri, 1999).

Bazı besinlerin KLA (mg/g yağ) içerikleri; taze sığır kıyma 4,3, sığır budu 2,9, sığır kol 3,3, tütülenmiş sığır sosis 3,8, dana eti 2,7, kuzu eti 5,6, domuz etti 0,6 tavuk 0,9, hindi 2,5, somon 0,3, alabalık 0,5, karides 0,6, homojenize süt 5,5, tereyağı 4,7, krema 4,6, yoğurt 4,8, dondurma 3,6, çedar peyniri 3,6, mozzarella peyniri 4,9, ayçiçeği 0,4, kanola 0,5, mısır 0,2 şeklindedir (Chin ve diğerleri, 1992).

Yağ asiti olan KLA' nın süt ve kas yağında bulunduğu bildirilmiştir. KLA alımının yaklaşık % 60' ı süt ürünlerinden temin edilirken, % 32' si ise et ve et ürünlerinden elde edilmektedir. KLA izomerlerinin toplamını sığır etindeki yağ asitlerinin yaklaşık % 1' i ve süt ürünlerindeki yağ asitlerinin % 2' si oluşturur. Süt ürünlerinden peynir KLA' in ana kaynağıdır. KLA' in erkekler % 30' unu ve kadınlar % 33' ünü peynirden alırlar (Kara, 2009).

Konjuge linoleik asitin biyosentezi

Isıl işlem ve uzun zincirli yağ asitleri (ağırlıklı olarak linoleik veya linolenik asitler) içeren mikrobik enzimatik tepkimeler sayesinde, besinlerdeki KLA' nın yapısına başlıca katkıda bulunanlar geniş getiren hayvanların ilk mide bölümündedir (Aydın, 2005). Hayvan midesinde, ardışık azaltma kademeleri, linoleik asiti (C18:2 c-9, c-12), c-9, t-11 KLA' ya, daha sonra da vaksenik asite (C18:a, t-11) ve en sonunda steraik asite (iç yağı asiti) dönüştürür (Harfoot ve Hazelwood, 1988). Şekil 2.4' de 18 Karbonlu doymamış yağ asitlerinin rumende biyohidrojenasyonu verilmiştir (Aydın, 2005).



Şekil 2.4. 18 Karbonlu doymamış yağ asitlerinin rumende biyohidrojenasyonu

KLA temel olarak rumendeki mikrobiyal flora ile linoleik asitten ve meme bezlerinde bulunan vaksenik asitten sentezlendiği için en temel kaynağı geviş getirenlerden elde edilen süt ve süt ürünleridir. KLA'ın bilinen ilk üretim yolu rumende linoleik asitin hidrojenle doyurulması sırasında ara ürün olarak ortaya çıkmasıdır. Rumen işlevi ile birlikte süt ve doku lipidlerinde bulunan KLA özü arasında güçlü bir bağlantı olsa da çok düşük miktarda KLA rumen ve ince bağırsaktan emilmektedir (Kara, 2009).

Geviş getiren hayvanların etinde veya sütünde bulunan KLA ya hayvan midesi biyohidrojenlenmesinden ya da steril koenzim A indirgeyici enzimi tarafından etkinmiş ve c-9, t-11 KLA'ya dönüştürülmüş olan emilmiş C18:1, t-11'den elde edilmiştir (Kepler, 1966). Önceki çalışmalar, sütteki ve tereyağındaki KLA seviyesinin, beslenmedeki LA alımına kesin olarak bağlantılı olduğunu göstermiştir (Parodi, 1977). Yalnızca hayvan midesindeki bakteriler değil, geviş getirmeyen hayvanların (Chin, Liu, Storkson, Ha ve Pariza, 1994) ve insanların sindirim sistemindeki mikroorganizmalar, KLA'ı uzun zincirli yağ asitlerinden sentezleyebilirler. KLA'ın konvansiyonel kalın bağırsakta üretildiği, ama LA içermeyen besinlerle beslenen bakterisiz sıçanlarda üretilmediği rapor edildi (Chin ve diğerleri, 1994; Adlof, Duval, Emken, 2000).

Konjuge linoleik asit ile ilgili yapılan çalışmalar

KLA' in insan metabolizması üzerindeki etkilerini inceleyen çalışma sayısı yok denecek kadar azdır. Ancak deney hayvanları üzerinde fazlaca çalışma yapılmıştır. KLA' in insan metabolizması üzerindeki; antikarsinojenik etkileri, bağışıklık sistemini geliştirici, kolesterol düşürücü, arterioskleroz riskini düşürücü, gelişmeyi ve büyümeyi teşvik edici, vücutta yağ birikimini azaltıcı, diyabete karşı koruyucu, kas gelişimini arttırıcı, serbest radikal yok edici, signal transdüksyon etkileyici, antibakteriyel etki ve antioksidatif etkiler gibi oldukça fazla faydası vardır (Aydın, 2005).

Ha ve arkadaşları tarafından 1987 yılında yapılan çalışmada ilk defa KLA' in antikanserojenik etkisi bulunmuştur. Bu tarihten sonra yapılan çalışmalarla KLA' in kanserin tüm safhalarında anti kanserojenik etki gösterdiği tespit edilmiştir. KLA' in deri, meme ve midede tümör hücrelerinin gelişimini engellediği görülmüştür (Aydın, 2005).

Fare, sıçan ve domuz gibi gelişmekte olan hayvanlar 0,5-2 g/100 g oranlarında KLA ile beslenindiklerinde vücutta biriken yağ miktarını azalttığı bulunmuştur (Wahle, Heys ve Rotondo, 2004). KLA yönünden oldukça bol beslenen sıçanlarda yağ hücresi sayısının azalmasının yanı sıra boyutunda azalma olduğu kaydedilmiştir (Azain, Hausman, Sisk, Flatt ve Jewell, 2000). KLA' in % 1 oranında alınımı adipositte apoptozisi baskılayarak beyaz yağ dokusu miktarında azalmalar meydana geldiğini bildirmişlerdir (Tsuboyama ve diğerleri, 2000).

Domuzların KLA izomerlerinin % 0,05 - 1 oranında olduğu karışım ile beslenmesi, besleme faaliyetini olumlu yönde etkilerken vücut ağırlığını değiştirmeden yağ oranını azaltmıştır (Cook ve diğerleri, 1999). 8 hafta boyunca % 0,07 - 0,5 oranında KLA izomerleriyle beslenen yavru domuzlarda, kontrol domuzlarına göre beslenme etkinliği ve vücudun yağsız kütlesi artarken, yağ miktarını azaltmıştır (Ostrowska, Muralitharan, Cross, Bauman ve Dunshea, 1999). Başka bir çalışmada 5 hafta boyunca Sprague Dawley fareleri % 0,25 - 0,5 oranında KLA kaynakları karışımı ile beslenmiştir. Çalışma sonucunda büyüme veya besin alım oranını etkilemeden retroperiperitoneal ve parametrial yağ birikiminin ağırlığını azalttığı görülmüştür (Azain, Hausman, Sisk, Flatt ve Jewell, 2000).

Yapılan bir çalışmada 14 gün boyunca farelerin KLA karışımı ile beslenmesi sonucunda vücut yağındaki etkileri araştırılmıştır. Oluşturulan kontrol grubunda fareler soya yağı, kokonut yağı gibi esansiyel yağ asitleri ve balık yağı içeren besinler ile 42 gün boyunca beslenmişlerdir (Hargrave ve diğerleri, 2004). KLA ve esansiyel yağ asitleri ile beslenen farelerde vücut ağırlığı ile epididimle ilgili yağ kütlesini önemli derecede azalmalar olduğu gözlemlenmesine rağmen periton arkasındaki yağ kütlesinde aynı oranda azalmalar gözlenmemiştir. Bu çalışmada KLA ile birlikte esansiyel yağ asitleriyle beslenme yağ kütlesini azaltmada daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda son zamanlarda rapor edilenlere göre benzer bir grupta kokonat yağıyla beslenen fareler temel yağ asitleriyle de beslenmişlerdir ancak sadece kokonat yağıyla beslenen kontrol farelerinde yağ kütlesinde herhangi bir değişiklik görülmemiştir. Çalışmadan elde edilen bilgilere göre KLA' in etkisinin esansiyel yağ asitlerinden ayrı bir şekilde etkili olabileceği ileri sürülmüştür (Hargrave, Azain ve Miner, 2005).

Sprague Dawley cinsi sıçanlarla yapılan 6 hafta süreli diğer bir çalışmada yüksek oranda KLA içeren soya fasülyesi yağının etkisi incelenmiştir. Çalışmada kasıksal, epididime ait ve periton arkası yağ depolarının KLA etkisiyle fark edilir şekilde küçüldüğü bulunmuştur (Choi, Kwon, Yun ve Jung, 2004).

Yapılan başka bir çalışmada KLA' in antioksidatif etkiye sebep olduğu anlaşılmıştır. Örnek olarak yapılan bir çalışmada linoleik asit/fosfat tamponu/etanol sisteminde E vitamini ve bütillendirilmiş hidroksi toluen' den (BHT) daha yüksek oranda KLA' nın antioksidatif etkiye sahip olduğu izlenmiştir (Aydın, 2005).

Besidüzensel KLA birkaç biyolojik özelliğe sahip olduğu için, yumurtanın, sütün ve etin KLA derişimini geliştirmek ilgi çekicidir (Aydın, 2005). Geviş getiren hayvanlardan elde edilen et ve süt ürünleriyle karşılaştırıldığında, kümes hayvanlarından elde edilen yumurta ve et çok daha az KLA içerir (Chin ve diğerleri, 1992). Yumurta tavuklarını 29 gün boyunca % 5 KLA ilave edilmiş besinlerle beslemek, yumurta sarısındaki KLA seviyesini artırmıştır (Chamruspollert ve Sell, 1999). Fakat besidüzensel KLA' in, 10 günlüğüne 4 °C' de depolanan yumurtaların kalitesindeki yan etkilere sebep olduğu gösterilmiştir (Aydın, Pariza, Cook, 2001). Tahminen steril koenzim A desaturaz enzimi üzerindeki t-10, c-12 KLA izomerinin inhibitör etkisinden dolayı az yağlı beslenmelerdeki KLA, doymuş yağ

asidi seviyesini (temel olarak C16:0 ve C18:0) yükseltti ve mono doymamış yağ asidi seviyelerini (temel olarak C16:1 (n-7) ve C18:1 (n-9)) azalttı (Aydın, 2005).

Tavuk yumurtalarını KLA yönünden zenginleştirmek, herhangi bir yağda bulunan KLA' yı beslemekle mümkündür (Aydın, 2001). % 2 KLA ve % 4 kanola yağı tavuk beslenmesinde birlikte kullanıldığı zaman, tavuk yumurtası KLA yönünden 43 kat daha fazla zenginleştirilmiştir (Aydın, 2000).

Hayvanlarla yapılan beslenme çalışmalarında, süt yağının içindeki KLA' in, keten tohumu yağı ile birlikte linolenik asidin diğer kaynaklarıyla beraber beslenildiğinde arttığı gözlenmiştir (Kara, 2009)

Besidüzensel KLA' in, sıçanlarda ve tavuklarda endotoksin lipopolisakkarit (LPS) enjeksiyonunu takip eden bağışıklık kaynaklı büyüme suprasyonunu önlediği gösterildi. Besinlerine LPS enjekte edilmiş civcivlerin 24 saatin üzerinde bir sürede kilo kaybettiği, fakat KLA ile beslenenlerin bağışıklıkları stimüle edilmesine rağmen büyümeye devam ettiğiydi. KLA' in hayvan türleri içinde bağışıklık stimülesine karşı koruduğunu gösteren bu çalışma, fareler ve sıçanlar üzerinde tekrarlandı (Miller, Park, Pariza ve Cook, 1994).

Bir çalışmada sütteki KLA derişiminin, geviş getiren hayvanların beslenmesinde ayçiçeği yağı (linoleik asitte yüksek) ve keten tohumu yağının (linolenik asitte yüksek) eklenmesiyle artırılabilirdiğini gösterdi (Kelly ve diğerleri, 1998). Keçiler üzerinde yürütölen bir başka çalışma, beslenmedeki % 2 veya % 4 kanola yağının kontrol amaçlı karşılaştırılan sütteki KLA seviyesini 2-3 katına çıkardığını gösterdi (Mir, Goonewardene, Okine, Jaegar ve Scheer, 1999).

Diğer çalışmalar süt ineğini deniz yosunlarıyla beslemenin, sütteki KLA seviyesinde 7 kat yükselmeye yol açtığını gösterdi (Franklin, Martin, Baer, Schingoethe ve Hippen, 1999). KLA' in temel izomerlerinin (yani, c-9, t-11 ve t-10, c-12 KLA izomerleri), KLA karışımıyla doza bağılı bir şekilde beslenen domuzların karaciğer, kalp, arka yağ ve omental yağ bünyesine dahil olduğu gösterildi (Kramer ve diğerleri, 1998). c-9, t-11 ve t-10, c-12 KLA izomerlerinin seviyeleri, ilave KLA beslenmeden çıkarıldığında, karaciğerde ve yağ pedlerinde benzer oranda azalmıştır (Park ve diğerleri, 1999). t-10, c-12 KLA izomeri iskelet kasında c-9, t-11 KLA izomerinden önemli ölçüde daha hızlı temizlendiği rapor edilmiştir

(Park, 1999). t-10, c-12 KLA izomerinin, c-9, t-11 KLA izomerine göre özellikle iskelet kasında daha hızlı bir şekilde metabolize edildiği ortaya atılmıştır (Park, Albright, Liu, Cook ve Pariza, 1997).

Konjuge linoleik asitin antikarsinojenik etkinlikleri

Son zamanlarda KLA' e olan ilgi, antikarsinojenik bir etki olarak hamburger etinden izolasyonu ile başladı (Pariza, Hargraves, 1985). Kıvartılmış dana kıymasından elde edilen kısmen arıtılmış ekstreler, 7, 12-dimetilbenzil antrasen (DMBA) ve prokarsinojen tarafından fare epidermik karsinogenезin başlamasını engelleyen, mutasyona yol açan modölatör etkinliği içerdiği gösterildi (Pariza, Hargraves, 1985). Daha sonra, bu antikarsinojenik bileşen izole edildi ve tanımlandı ve KLA olarak belirlendi (Ha, 1987).

KLA' in 1990' larda, mide neoplazisi, meme tümörleri ve cilt papillomları için hayvan modellerinde antikarsinojenik etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Ha, Storkson, Pariza, 1990; Ip, 1996; Belury, Bird, Nickel ve Wu, 1996). % 0,05 kadar az bir KLA seviyesinin, kemirgenlerdeki endüklenmiş meme tümörlerinin sayısını önemli ölçüde azalttığı bulundu (Ip, Singh, Thompson ve Scimeca, 1994). KLA, şiddetli bir biçimde risk taşıyan bağışıklık yetersizliği olan farelerde, organ nakli yapılmış insan memesi kanser hücrelerinin ve prostat kanseri hücrelerinin boyutunu ve metastazını azaltmada etkili olduğu gösterildi (Cesano, Visonneau, Scimeca, Kritchevsky ve Santoli, 1998). KLA' in bu özelliği, linoleik asidi beslemekle ilişkili olan prokanser aktivitesi ile tam bir zıtlık içindedir (C. Ip, Carter, M.M. Ip, 1997). Birçok çalışma, linoleik asidin aslında kemirgenlerdeki meme tümörünün büyümesini arttırdığını gösterdi (Ip ve diğerleri, 1997). Son zamanlarda, linoleik asidin prostat kanserini arttırdığı görüldü (Cesano ve diğerleri, 1998). Ayrıca KLA' in laboratuvar ortamındaki çalışmalarda, insan malin melanomunun, kolorektalın ve meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu engellediği rapor edildi (Shultz, Chew, Seaman ve Lueddecke, 1992).

Finlandiya' da yürütülen bir epidemiyolojik çalışmanın 25 yıllık rapor döneminde, kadınlardaki meme kanseri rastlantısı ve süt tüketimi arasında önemli bir ters bağıntı olduğunu gösterdi (Knekt, Järvinen, Seppänen, Pukkala ve Aromaa, 1996). Son zamanlarda, KLA bakımından zenginleştirilmiş tereyağının, meme bezini morfojenез olarak değiştirdiği ve sıçanlardaki kanser riskini azalttığı rapor edildi (Ip ve diğerleri, 1999).

Diğer doymamış çoklu yağ asitleri gibi KLA, başlama, yükselme, ilerleme veya gerileme olarak bilinen kanser gelişiminin ayrı evrelerini etkileyen yöntemler ile karsinojenezi modüle edebilir. Fakat KLA' in karsinojenezi etkilemesine neden olan asıl yöntem henüz tanımlanmamıştır (Aydın, 2005). Bir çalışmada KLA' in antioksidan özellikleri ile antikanser özellik gösterebileceği ileri sürüldü (Ha ve diğerleri, 1990). Araştırmacılar, KLA tarafından uygulanan tümör inhibisyon yönteminin, lipoksijenaz ve siklo oksijenaz lipid mediyatörler ile ilişkili olabileceğini ileri sürdüler (Cook, Miller, Park ve Pariza, 1993). Son zamanlarda, KLA' in karsinojenezi etkilemesine neden olan tetki mekanizmalarının olabileceği görüşü ağırlık göstermektedir (Pariza, Park ve Cook, 2000).

Bağışıklık işlevinde konjuge linoleik asitin rolü

KLA' in, sıçanlarda ve tavuklarda endotoksin LPS enjeksiyonunu takip eden bağışıklık kaynaklı büyüme suprasyonunu önlediği gösterildi (Cook ve diğerleri, 1993). LPS enjekte edilerek beslenen civcivlerin 24 saatin üzerinde bir sürede kilo kaybettiği fakat KLA ile beslenenlerin bağışıklıkları stimüle edilmesine rağmen büyümeye devam ettiği gözlemlendi (Aydın, 2005). KLA' in hayvan türleri içinde bağışıklık sistemine karşı koruduğunu gösteren bu çalışma, fareler ve sıçanlar üzerinde yapılmıştır (Miller ve diğerleri, 1994). Çizelge 2.1' de Konjuge linoleik asidin sağlıkta faydalı etkileri verilmiştir (İnanç, 2006).

Çizelge 2.1. Konjuge linoleik asidin sağlıkta faydalı etkileri

Anti-Kanser	Tümör büyüme/metastaz inhibisyonu Hücrelerde kanser hücre proliferasyonunun inhibisyonu Anjiogenezis inhibisyonu
Anti-Aterosklerozis	Plak formasyonunda azalma Hücrelerde molekül adezyon ekspresyonunda azalma Sitokin formasyonunun inhibisyonu Anjiogenezis inhibisyonu
Anti-Obezite	İnsan yağ depolarında azalma Diyabetis mellutus azalma

İmmünitinin Modulasyonu	İnsan inflamatuvar sitokin üretiminin inhibisyonu İnsan antikor formasyonunu artırma
----------------------------	---

2.3. Reaktif Oksijen Türleri

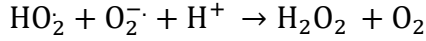
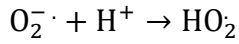
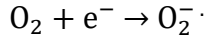
Serbest radikaller son yörüngelerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron bulunduran, kısa ömürlü, yüksek enerji içeren atom ya da molekül olarak tanımlanmışlardır (Karabulut ve Gülay, 2016). Radikal olmayan bir atom ya da molekülden bir elektron kopmasıyla veya atom ve moleküle bir elektron eklenmesiyle serbest radikaller oluşurlar. Oluşan bu radikaller çok reaktif ve aynı zamanda kararsız moleküllerdir. Diğer moleküllere elektron verdiklerinden ve elektron aldıklarından dolayı vücutta indirgen veya yükseltgen olarak görev yaparlar (Çaylak, 2011). Ömürleri çok kısa olan ve kararsız bir yapı gösteren tanecikler, etrafındaki moleküller ile etkileşime girerek, bir an önce kararlı bir yapıya dönüşmek isterler. Serbest radikaller hücrelerde kullanılan oksijenin % 2-3' ünden oluşur (Büyüksulu ve Yiğitbaşı, 2015).

Oksidatif stresi oluşturan ve büyük kısmı makrofajlarda üretilen ROT, Multipl Skleroz ve deneysel otoimmün sefalopatidede miyelinizasyon ve akson hasarına yol açtığı bulunmuştur. ROT, hücreler için son derece toksik maddeler olan peroksinitrit gibi ürünlere dönüşerek hücrenin ana komponentleri olan lipidler, proteinler ve nükleik asitlerin hasar görmesine, sonuç olarak nekroz ya da apoptoz yolu ile hücre ölümüne neden olurlar (Kurban, Akpınar ve Mehmetoğlu, 2010).

2.3.1. Süperoksit radikali

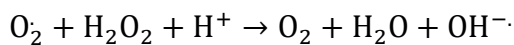
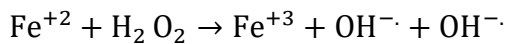
O_2^- biyolojik sistemlerde bulunan en önemli serbest radikaldir. Sekiz elektrona sahip olan, oksijenden türeyen serbest oksijen radikalleridir. Süperoksit radikalleri, oksidazlar veya oksidasyon sırasında bazı enzimlerin çalışması sonucunda meydana gelirler. Oksijen atomu, iki adet ortaklanmamış elektronu vardır bu sebeple serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer ve radikal olmayan maddelerde daha yavaş reaksiyona girmesine neden olur (Koç, 2007). Oksijen molekülüne bir elektronun eklenmesi sonucunda O_2^- oluşur. O_2^- direkt olarak zarar vermez. Bu radikal anyonun asıl önemi, H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Mitokondriyal ETZ memeli hücrelerinde ATP' nin esas

kaynağıdır. Bu sebeple yaşamsal fonksiyonların gerçekleşmesi için son derece gereklidir (Karabulut ve Gülay, 2016). O_2^- radikalinin oluşum reaksiyonu aşağıda gösterilmiştir.



2.3.2. Hidrojen peroksit

O_2 ' in ortamdan iki elektron alması veya O_2^- ' nin bir elektron alması sonucu asidik ortamda H_2O_2 meydana gelir (Gutteridge, 1995). H_2O_2 serbest radikal olmasa da yine de çok önemlidir. Çünkü biyolojik membranlardan içeri girebilir. Nötrofillerin fagozomlarında bulunan bir enzim olan miyeloperoksidaz tarafından H_2O_2 , hipokloröz asite (HOCl) dönüştürülür (Karabulut ve Gülay, 2016). Bu sırada geçiş metalleri veya Fe^{2+} varlığında Fenton reaksiyonu sonucu, O_2^- ' nin O_2 varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali ($OH\cdot$) oluşturur (Gutteridge, 1995). Hidrojen peroksidin başka bir önemli görevi de hücre içi sinyal molekülü rolünü yerine getirmektir. H_2O_2 , O_2^- ' ye bir elektron ilave edilmesiyle ya da O_2^- ye iki elektron ilave edilmesiyle de doğrudan meydana gelir. Bu reaksiyonlar sonucunda oluşan H_2O_2 , KAT, Gpx ve peroksiredoksinler olarak adlandırılan antioksidan enzim sistemleri tarafından ortadan kaldırılır (Karabulut ve Gülay, 2016). H_2O_2 radikalinin hidrolizi aşağıda verilmiştir.

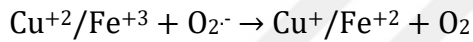
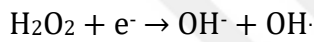


2.3.3. Hidroksil radikali

Son derece reaktif olan $OH\cdot$, Haber-Weiss reaksiyonu ve Fenton reaksiyonu sonucu H_2O_2 ' ten oluşmaktadır (Koç, 2007). O_2^- ne üç elektron aktarımı ile oluşur. Serbest radikallerin birçok zararlı etkisi $OH\cdot$ ile oluşur. $H_2O_2^-$ bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektron taşıyan ve serbest radikal karakterli geçiş metalleri ile reaksiyona girerek veya diğer etkilerle $OH\cdot$ ni oluştururlar (Çaylak, 2011). $OH\cdot$, ROT' lerinin en güçlüsüdür ve LP' nda rol oynar. Yağ

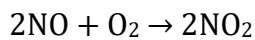
asitleri ve tiyoller gibi moleküllerden proton kopartarak tiyil radikalleri, karbon merkezli organik radikaller, organik peroksitler gibi yeni serbest radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasarların oluşmasına neden olur. OH' nin araşidonik asit gibi doymamış yağ asitlerine olan ilgisinin de fazla olduğu ileri sürülmektedir (Koç, 2007).

Aağıda gösterildiğı gibi H₂O₂, Fe⁺², Cu⁺ ve diğere elementler (Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) varlığında indirgenerek OH' ye dönüştürülür. Bu olaya "fenton reaksiyonu" denir. O₂· fenton reaksiyonu ile bağlantı kurarak oluşan metal iyonlarının yeniden kullanılmasında önemli bir rol oynar. Bu iki reaksiyona "Haber-Weiss reaksiyonu" adı verilir. Böylece geçiş metalleri OH· oluşmasında önemli bir paya sahiptir (Karabulut ve Gülay, 2016). OH· radikalının oluşumu aşağıda gösterilmiştir.

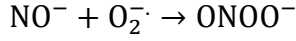


2.3.4. Nitrik oksit ve peroksinitrit

Eşleşmemiş elektronları ile nitrik oksit (NO) ve nitrojen dioksit birer radikaldirler. Bir atom azot ile bir atom oksijenin çiftleşmemiş elektron vererek birleşmesinden meydana gelmiştir ve bu yüzden radikal sınıfına girmektedir. NO, damar endotel hücrelerinde NO sentaz enzimi yardımıyla L-arjinin amino asitinden sentezlenir. NO, eşlenmemiş elektronuyla oldukça yüksek reaktiviteye sahiptir. Bundan dolayı protein, karbonhidrat, nükleotit ve lipitlerde hasarlar meydana getirir. Bunun dışında hücre ve dokuları da hasara uğratar. NO metabolize olurken O₂ ile bağlanıp azot dioksit (NO₂) oluşturur (Çaylak, 2011). NO radikalının oluşumu aşağıda verilmiştir.



NO' in vücuttaki ROT' i ile reaksiyona girerek güçlü bir oksidan olan peroksinitrit (ONOOH) oluşturduğu ve bunun da ileri yıkımları OH⁻ radikali meydana getirdiği bilinmektedir (Çaylak, 2011). ONOOH radikalinin oluşumu aşağıda gösterilmiştir.



2.3.5. Singlet oksijeni

Oksijen elektronlarından herhangi birinin dışarıdan enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale geçmesi sonucunda oluşur. Aynı zamanda O₂' nin NO ile reaksiyonu ve H₂O₂' in hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir. Singlet oksijen, eşleşmemiş elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Oksijenin yüksek enerjili ve mutajenik formudur (Çaylak, 2011). Delta (δ) ve sigma (σ) olmak üzere iki formu vardır. Delta formu, sigma formuna göre daha uzun ömürlüdür (Halliwell ve Gutteridge, 1984).

2.4. Serbest Radikallerin Kaynakları

Bir organizmadaki serbest radikaller başlıca endojen ve ekzojen kaynaklar olmak üzere iki şekilde meydana gelir. Serbest radikaller hücrede ve çevrede sürekli olarak üretilir (Karabulut ve Gülay, 2016).

2.4.1. Endojen kaynaklar

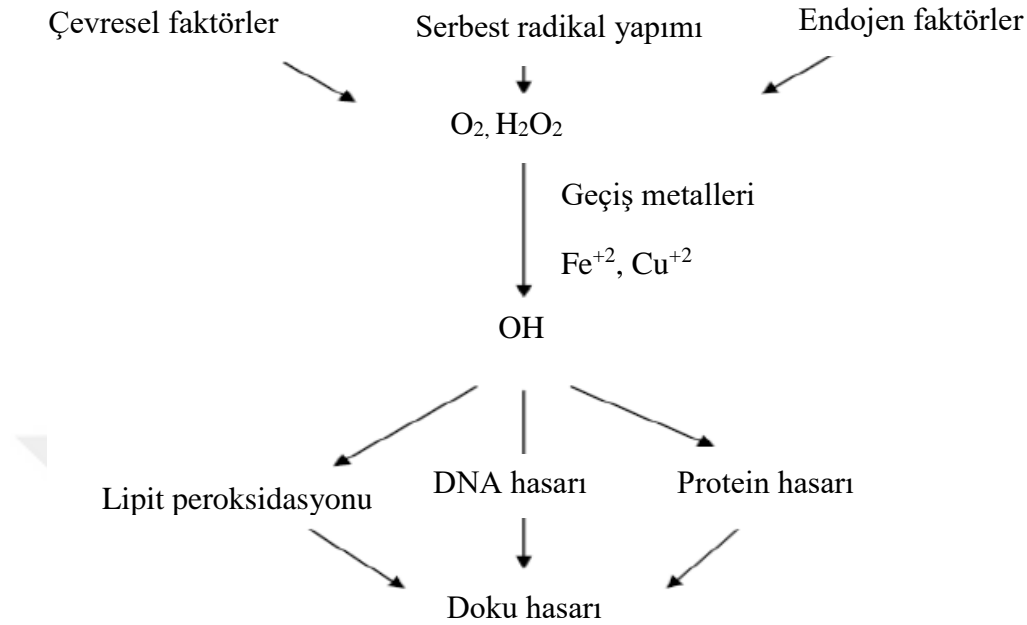
- Mitokondride oksijenli solunum sırasında ETZ yan ürün olarak serbest radikal üretir (Karabulut ve Gülay, 2016).
- Yangı durumunda sitokinler serbest hale geçerek nötrofiller ve makrofajlar tarafından serbest radikalleri üretmeye başlar (Karabulut ve Gülay, 2016).
- Serbest radikaller LP, ksantin oksidaz ve mitokondriyel sitokrom oksidaz gibi çeşitli kaynaklardan oluşabilir (Karabulut ve Gülay, 2016).

- Tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidro pterinlerin otooksidasyonu sonucunda primer olarak O_2^- radikallerinin meydana gelmesine neden olmaktadır (Akkuş, 1995).
- Zihinsel ya da vücut yorgunluğuna bağlı olarak meydana gelen stres zararlı yan ürün olarak serbest radikal üretebilir (Karabulut ve Gülay, 2016).
- Hormonların kendileri de serbest radikallere dönüşebilirler (Karabulut ve Gülay, 2016).
- Bağışıklık sisteminin elemanları tarafından patojenlere cevap olarak ROT ve oksiradikaller üretebilir (Karabulut ve Gülay, 2016).
- Geçiş metalleri (özellikle demir, bakır gibi) elektron alışverişi şeklinde gerçekleşen oksidoredüksiyon reaksiyonlarında görev alırlar bu özelliklerinden dolayı serbest radikal reaksiyonlarını hızlandıran katalizör görevi görürler (Halliwell ve Gutteridge, 1990).
- Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerde, fagositik solunumsal patlama sırasında da çeşitli serbest radikaller oluşur (Konukoğlu, 1997).

2.4.2. Ekzojen kaynaklar

- Canlı organizmaların hayatları boyunca dışarıdan aldığı ya da maruz kaldığı kaynaklar ekzojen kaynakları oluşturmaktadır (Delibaş ve Özçankaya, 1995).
- Çevre kirliliği, sigara gibi madde bağımlılığı yapan ürünlerin kullanımı, böcek öldürücüler, mikotoksinler ve ilaçlar ekzojen kaynaklara örnektir (Delibaş ve Özçankaya, 1995).
- Pişirme sırasında organik maddelerin yanması (Karabulut ve Gülay, 2016).
- UV ışınlar, X-rays, gamma ışınları, mikrodalga ışınları gibi zararlı ışınlar da serbest radikal üretimini artırır (Karabulut ve Gülay, 2016).
- Endüstriyel kirleticiler, ksenobiyotikler (Çaylak, 2011).

Şekil 2.5' de Vücuttaki önemli serbest radikaller ve serbest radikal hasarı sonuçları verilmiştir (Antmen 2005).



Şekil 2.5. Vücuttaki önemli serbest radikaller ve serbest radikal hasarı sonuçları

2.5. Serbest Radikallerin Yol Açtığı Hasarlar

Aşağıdaki şekilde görüldüğü gibi tüm serbest radikal türleri hücrelerin karbonhidrat, protein, lipit, DNA ve enzim gibi tüm temel bileşenlerine etki etmektedir (Akkuş, 1995).

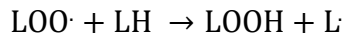
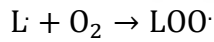
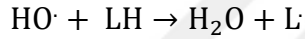
2.5.1. Karbonhidratlar üzerine etkileri

Hidroksil gibi serbest radikaller, karbonhidratlar ile reaksiyona girer, karbon atomlarının birinden bir hidrojen atomu alarak karbon merkezli radikal üretirler (Karabulut ve Gülay, 2016). Monosakkaritlerin ootoksidasyonu sonucu peroksitler, oksoaldehitler ve H₂O₂' ler oluşmaktadır. *İn vitro* ortamda H₂O₂ radikalinin hiyaluronik asidi parçaladıkları gösterilmiştir (Maxwell, 1995).

2.5.2. Membran lipitlerine etkileri (Lipit peroksidasyonu)

Hücre zarındaki birçok molekül ve bileşik, serbest radikallerden etkilenir. Hücre membranında bulunan kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağ kısımları, serbest

radikallerle kolayca tepkimeye girerek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar (Delibaş ve Özçankaya, 1995). Serbest radikallerin metabolizmaya verdiği hasara karşı en hassas olan yapılar lipitlerdir (Lovell, Ehmann, Buffer ve Markesberry, 1995). Lipitler ile serbest radikaller reaksiyona girdiğinde LP önemli hasar meydana gelir. Hücrenin fonksiyonu için LP' ndan kaynaklanan hasar son derece zararlıdır. Hücre zarının, akışkanlığını ve geçirgenliğini bozarak hücre membranına zarar verebilir. LP metilen grubundan bir hidrojen atomunun ayrılmasıyla birlikte karbon atomu üzerinde ortaklanmamış bir elektron oluşumuyla sonuçlanır. Böylece oluşan karbon radikali, moleküllerin yeniden düzenlenmesiyle konjugediene sabitlenir. Konjuge dien ile sabitlenen karbon radikali oksijen molekülü ile reaksiyona girerek lipit peroksil radikalini (LOO \cdot) meydana getirir. Bu radikaller daha fazla hidrojen atomlarının ayrılmasıyla diğer lipit molekülleri ile reaksiyona girebilir. Böylelikle lipit hidroperoksitler (LOOH) oluşur ve aynı zamanda daha fazla LOOH üretilir (Karabulut ve Gülay, 2016). Lipid peroksidasyonunun, nörojenik hastalıklar, iskemik reperfüzyon hasarı ve diyabet gibi birçok hastalık üzerinde etkili olduğu doğrulanmıştır (Lovell ve diğerleri, 1995). LP zinciri şu şekilde gerçekleşir:

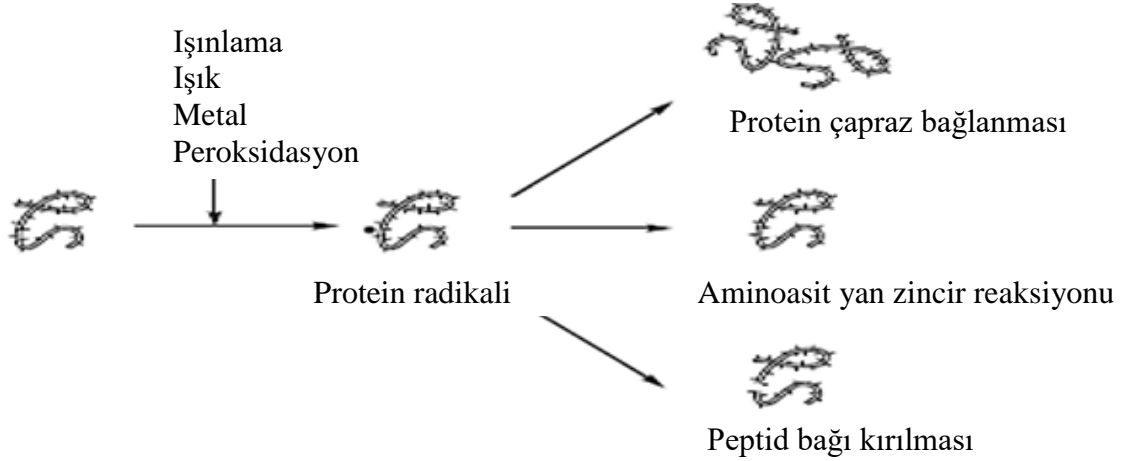


LP, LOOH' lerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklerine yıkılması ile son bulur (A. Chauhan, V. Chauhan, Brown ve Cohen, 2004).

2.5.3. Proteinler üzerine etkileri

Serbest radikaller proteinleri doğrudan etkilerken proteinlerin etkilenme derecesini amino asit içerikleri belirler (Karabulut ve Gülay, 2016). Serbest radikaller, triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitleri etkilenmektedir. Özellikle bu aminoasitlerin nedeni doymamış bağ ve sülfür içermeleridir. Reaksiyonları sonucunda özellikle karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri meydana gelir ve immünglobülin G ve albümin gibi disülfid bağı bulunduran proteinlerin yapılarını bozarak fonksiyonlarını yerine getirmelerini engel olurlar (Freeman ve Crapo 1982). Serbest radikallerin oluşturduğu hasarlardan büyük oranda etkilenenlerden biri de "Hem proteinleri"dir. Özellikle hem

proteini olan oksihemoglobin O_2^- ve H_2O_2 ile reaksiyona girerek methemoglobini oluşturur. Aşağıda Şekil 2.6' da Protein oksidasyonunun en yaygın sonuçları gösterilmiştir (Ergezer, Gökçe, Hozer ve Akcan, 2016).



Şekil 2.6. Protein oksidasyonunun en yaygın sonuçları

2.5.4. Nükleik asitler ve DNA'ya etkileri

DNA molekülü, OH^\cdot gibi serbest radikaller tarafından kolaylıkla hasara uğratılabilir. Bu serbest radikaller DNA ile reaksiyona girerek deoksiriboz şekerinde hidrojen atomlarının kaybına ya da eklenmesine neden olabilir (Karabulut ve Gülay, 2016). İyonize edici radyasyon sonucu oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve hatta hücrenin ölümüne neden olur (Willcox, Ash ve Catignani, 2004). Süperokside maruz kalan DNA molekülleri hayvanlara enjekte edildiğinde daha fazla antijenik özellik gösterirler (Er, 2017).

2.6. Oksidatif Stres

Serbest radikaller organizmalarda devamlı olarak meydana gelen ve antioksidan savunma sistemi tarafından düzenli olarak ortadan kaldırılan moleküllerdir (Kayış, 2010). Sağlıklı bir organizmada serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemi arasında bir denge vardır. Bu dengenin bozulmasıyla birlikte oksidatif stres oluşur. Oksidatif stres, serbest radikal miktarı arttığı zaman artar; serbest radikallerin azalmasıyla ya da oksidatif modifiye moleküllerin onarılmasıyla azalır. Oksidatif stresin azaltılması üç farklı basamakta

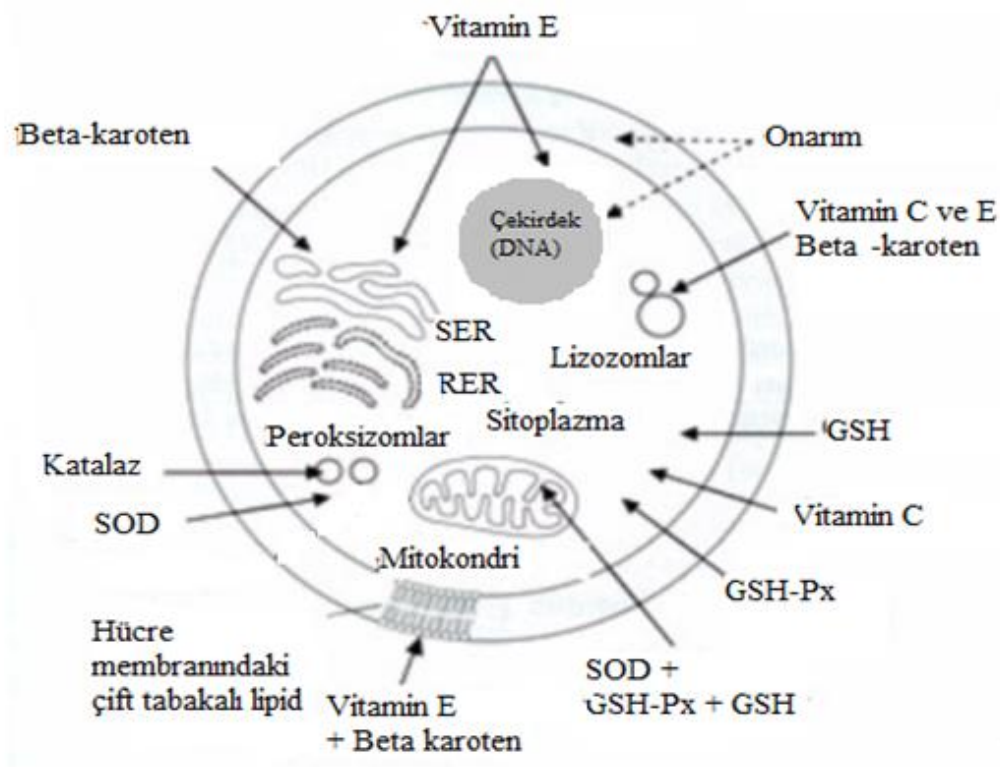
gerçekleşebilir. Oksidasyona sebep olan çevresel zararlı maddeler azaltılarak, endojen ve ekzojen antioksidanları arttırılabilir ve mitokondriyal enerji üretimini ve etkinliğini arttırarak, oksidatif stres oluşumu azaltılabilir (Kurt, 2008; Poljsak, 2011). Serbest radikallerin fazla miktarda oluşması sonucu meydana gelen oksidatif stres, hücrelerde DNA, proteinler, lipitler, karbonhidratlar ve enzimler gibi önemli organik moleküllere zarar verebilir. Biyolojik sistemlerde bulunan ROT; O_2^- , OH, peroksil radikali ($ROO\cdot$) ve radikal olmayan H_2O_2 gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenlerini oluştururlar (Kayış, 2010).

2.7. Antioksidanlar

Antioksidanlar düşük yoğunluklarda okside edilebilen ve diğer bir maddenin oksidasyonunu azaltan ya da engelleyen yani oksidasyona karşı savaşan maddelerdir (Çaylak, 2011). Hücreler bu sayede serbest radikallerin etkisinden ve LP' ndan korunmuş olurlar (Kayış, 2010). Antioksidan sistem serbest radikallerin hücre zarına, nükleik asitlerine ve hücre bileşenlerine saldırmadan kendine çeker ve bağlar (Kunwar ve Priyadarsini, 2011). Antioksidanlar etkilerini dört farklı şekilde gösterirler (Kayış, 2010).

1. Toplayıcı etki: ROT' lerini etkileyerek onları tutar ve daha zayıf moleküllere çevirmeye çalışan etki (enzimler).
2. Bastırıcı etki: ROT' leri ile etkileşerek onlara bir hidrojen ekler ve aktivitelerini kaybetmesine neden olan etkidir. Böylece radikallerin aktivitelerini düşürür ya da inaktif şekle dönüştürürler. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.
3. Onarıcı etki: Antioksidanların, serbest oksijen radikallerin meydana getirdikleri zararı onarmasıdır.
4. Zincir kırıcı etki: ROT' lerini ve reaksiyonları zincirleme bir şekilde başlatacak olan diğer maddeleri kendilerine bağlayarak reaksiyon zincirini kırıp radikallerin fonksiyonlarının engellenmesi zincir kırıcı etkidir. Hemoglobin, seroplazmin, mineraller, vitaminler bu etkiye sahiptirler.

Şekil 2.7' de Antioksidanların hücredeki etkileri gösterilmiştir (Engin, 2007).



Şekil 2.7. Antioksidanların hücredeki etkileri

RER: Granüllü endoplazmik retikulum, SER: Granülsüz endoplazmik retikulum, DNA: Deoksiribo nükleik asit, SOD: Süperoksit dismutaz, GSH: Glutasyon, GSH-Px: Glutasyon peroksidaz

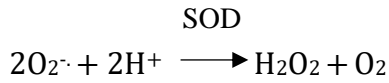
Tüm hayvansal ve bitkisel organizmalar serbest radikallerin etkilerini önlemek için doğal antioksidan sistemlere sahiptirler. Bu sistemler enzimatik ve nonenzimatik olmak üzere iki sınıftan oluşur (Çaylak, 2011).

2.7.1. Enzimatik antioksidanlar

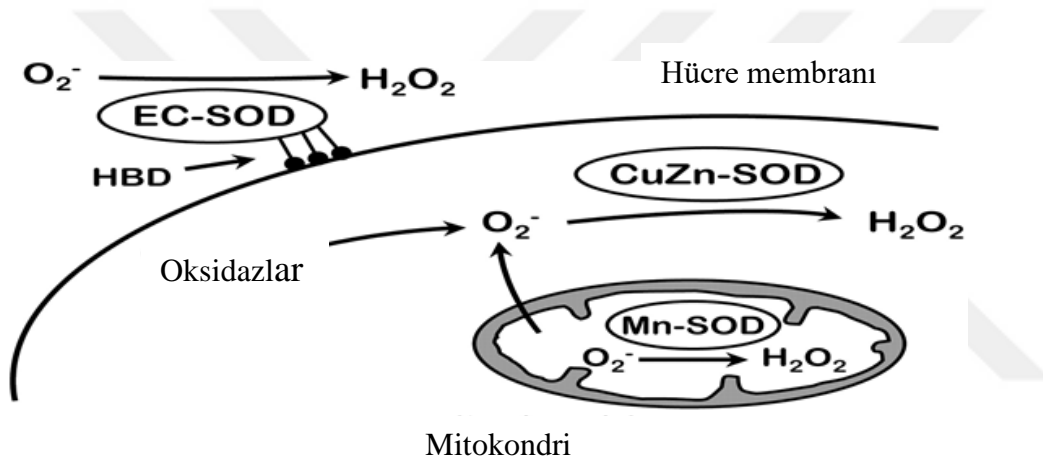
Süperoksit dismutaz (Süperoksit: süperoksit oksidoredüktaz)(EC.1.15.1.1)

O_2^- : katalitik olarak H_2O_2 ve O_2 ' ye dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. SOD aynı zamanda LP inhibe eden bir metalloenzimdir (Kayış, 2010). Organizmaları oluşturan

hücreler için bulunması gereken temel bir enzimdir (Çaylak, 2011). SOD' ın aktivitesi aşağıda gösterilmiştir.



Bu reaksiyon kendiliğinden gerçekleşebildiği gibi, SOD katalizörlüğünde 4000 kat daha hızlı gerçekleşmektedir (Akkuş, 1995). SOD' lar, merkezlerinde bulunan metallere göre, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD ve Fe-SOD olarak üçe ayrılır. Vücutta en çok bulunan CuZn-SOD sitoplazmada, Mn-SOD mitokondrilerde ve ekstrasellüler SOD (EC-SOD) hücre dışı sıvılarında bulunmaktadır (Kayış, 2010).



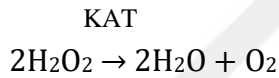
Şekil 2.8. SOD' un üç farklı formu ve hücrede bulunduğu kısımlar

Cu/Zn-SOD, 32 kDa molekül ağırlığına sahip ve eşit molekül ağırlıklı iki alt birimden oluşur. Her alt birim bir bakır ve bir çinko atomu içerir. Hücrelerde en çok bulunan SOD türüdür. Bir diğer SOD izoenzimi Mn-SOD 80 kDa molekül ağırlığında, kloroform-etanole dayanıklı ve aktif bölgesinde metalin Mn^{+3} hali bulunmaktadır. Bu farklılıklara rağmen Cu/Zn-SOD' lar gibi aynı reaksiyonu yürüttüğü bilinmektedir. pH 7,0 da Mn-SOD ların süperoksiti dismutasyon oranı Cu/Zn-SOD' larla aynıdır. Ancak yüksek pH larda bu oran Cu/Zn-SOD' dan daha azdır. Aynı zamanda Mn-SOD' lar ısı ve kimyasal maddelere karşı daha az dayanırlar. Mn-SOD mitokondrideki $\text{O}_2^{\cdot-}$ ne etki eden tek enzimdir. Mn-SOD organizmadaki tüm SOD aktivitesinin sadece % 10-15' lik kısmını oluşturmasına rağmen yapılan araştırmalarda doğuştan Mn-SOD eksikliği olan fareler 5-10 gün içinde ölürken, Cu/Zn-SOD ve EC-SOD eksikliği olan farelerin hayatta kalabildiği gözlenmiştir (Zejniloviç, 2007). Fe-SOD toplam 41kDa ağırlığına sahip iki tane protein birimi içerir ve proteinlerin

herbirinde bir ya da iki Fe atomu bulunur. Enzim normal durumdayken Fe iyonu +3 değere sahiptir, O_2^- ile Fe^{+3} ün, Fe^{+2} ye indirgenmesi sağılarak OH' nin oluşumunu SOD' un antioksidan etkisi engellemektir (Kayış, 2010).

Katalaz (hidrojen-peroksit: hidrojen-peroksit oksidoredüktaz) (EC: 1.11.1.6)

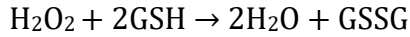
KAT enzimi, sığırın karaciğerinden 1937 senesinde Sumner ve Dounce tarafından izole edilmiştir. Molekül ağırlığı 240 kDa olup, aktif bölgesinde dört tane ferrihem grubu taşıyan bir hemoproteindir (Kayış, 2010). Karaciğer ve alyuvarlar başta olmak üzere hayvansal organizmaların oksijenli solunum yapan hücrelerinde fazla miktarda bulunur. Beyin, kalp, iskelet kasları gibi kısımlarda daha az miktarlarda KAT enzimi bulunur. KAT ve GPx, hidrojen peroksidi su ve atomik oksijene indirgemektedirler (Çaylak, 2011). H_2O_2 , KAT tarafından parçalanmazsa vücut için çok tehlikeli bir serbest radikal olan OH' nin öncülü olarak davranır ve böylece bu radikal hücrede kalıcı hasarlara sebep olur (Memişoğulları, 2005). KAT enziminin aktivitesi aşağıda verilmiştir.



Ayrıca KAT enzimi H_2O_2 varlığında peroksidazın etkisi ile etanol ve metanol gibi alkol türevlerini formaldehid ve asetaldehide oksitlerler. KAT aktivitesini incelenmesinde çok kullanılan yöntem H_2O_2 parçalanmasının spektrofotometrik yöntemle 240 nm dalga boyunda okutulmasıdır (Kayış, 2010).

Glutasyon peroksidaz (glutasyon: hidrojen peroksit oksidoredüktaz)(EC: 1.11.1.9)

GPx enzimi Mills tarafından 1957 senesinde hayvan eritrosit hücrelerinden elde edilen bir enzimdir (Kayış, 2010). Çoğunlukla mitokondri, sitozol ve hücre membranlarında bulunur. GPx, dört tane selenyum atomu bağlı olmasından dolayı seleno-sistein bileşiği sınıfına girer ve katalitik aktivitesini bu özelliği sağlar. GPx, GSH' u okside ederek H_2O_2 ' yu H_2O ' ya indirgemektedir. Glutasyonun okside formunun (GSSG) tekrar GSH' ya indirgenmesi ise glutasyon redüktaz (GR) tarafından sağlanır (Çaylak, 2011). Gpx enziminin aktivitesi aşağıda verilmiştir.



Bu enzim iki ana gruba ayrılır. Bu enzimlerden bir tanesi aktif bölgesinde seleno sistein formunda kovalent bağlı dört tane selenyum atomu bulunduran selenyuma bağımlı GSH-Px(Se-GSH-Px)dir. Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 20 kDa olup ve fosfolipid hidroperoksitleri alkollere indirger. Aynı zamanda hücre zarını en önemli antioksidan olan membran bağımlı E vitamini eksikliğinde peroksidasyona karşı korur. Diğeri ise GST (Glutatyon-S-Transferaz) olarak isimlendirilen, kataliz için selenyuma ihtiyacı olmayan H_2O_2 ' ye karşı önemszenmeyecek bir aktivite gösteren, daha çok organik hidroperoksitlerin indirgenmesinden görevli olan bir enzimdir (Kayış, 2010).

Glutatyon redüktaz (glutatyon: NADP+ oksidoredüktaz)(EC: 1.8.1.7)

FAD (flavin adenin dinukleotid) içeren flavoprotein bir enzim olan GR, H_2O_2 ' in toksiklerden arınma reaksiyonunda okside formuna dönüşen GSH' un reaksiyonlarda tekrar kullanılabilmesi için redükte GSH' a dönüşmesi gerekmektedir. GR NADPH (Redükte nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat) varlığında GSH disülfiti tekrar GSH çevirir (Er, 2017; Kayış, 2010).

Glutatyon-S-transferaz (RX:glutatyon R-transferaz)(EC: 2.5.1.18)

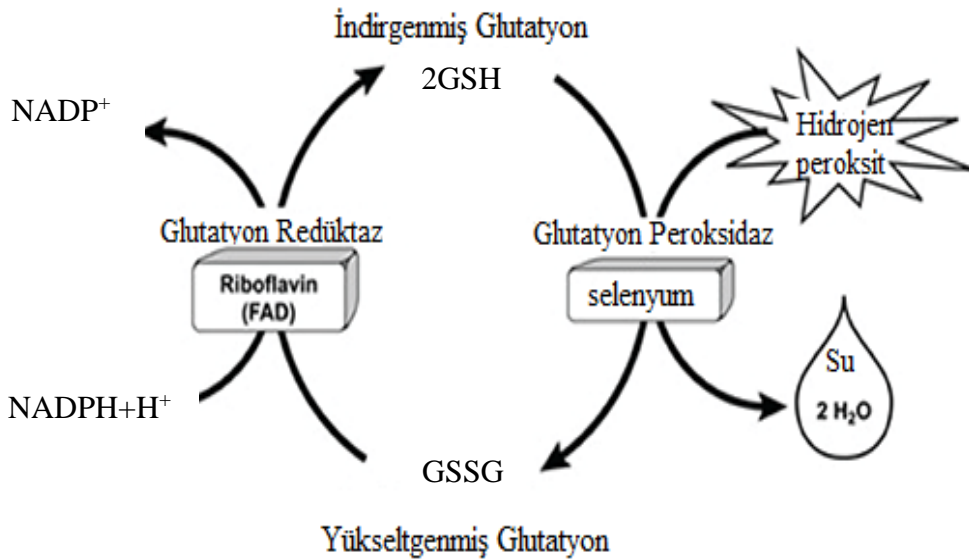
İki protein alt biriminden oluşan GST genellikle sitozolde bulunan bir enzimdir (Er, 2017; Kayış, 2010). Organizmaya giren ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli göreve sahiptirler. Araşidonik asit ve linoleat hidroksi peroksitleri başta olmak üzere lipit hidroperoksitlere karşı GST' ler Se bağımsız GPx aktivitesi gösterirler (Kayış, 2010).

2.7.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

Melatonin, ürat, sistein, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, miyogloblin, hemogloblin, ferritin, metiyonin, albümin, bilirubin ve GSH nanenzimatik antoksidanlara örnek olarak verilebilir.

Glutasyon

Suda kolayca çözünebilen, çok önemli bir antioksidandır (Er, 2017). Vücutta sistein, glisin ve glutamattan sentezlenen molekül ağırlığı düşük olan bir tripeptiddir. Hücrede en çok sitozol, mitokondri ve nükleusta bulunur. Hücre içinde bulunan GSH' un büyük kısmı indirgenmiş olarak (tiyol), az bir kısmı da okside glutasyon (GSSG) şeklinde bulunur. Tiyol kısmı antioksidan özelliğini meydana getirir. GSH hidroksil ve singlet oksijen gibi ROT' den arındırmakla birlikte, başka serbest radikaller ve peroksitlerle tepkimeye girerek hücreleri oksidatif zarardan kurtarırlar. Doğrudan serbest radikalleri temizlemesinin yanı sıra; GPx ile birlikte enzimatik olarak da görev yapar. GSH en çok karaciğer tarafından üretilir. Ayrıca GSH' un, hücre zarı geçirgenliğinin gerçekleştirilmesi, protein yapılarının bozulmaması, enzim aktivitesinin düzenlenmesi gibi birçok önemli görevi vardır (Kayış, 2010). GSH alyuvarları, akyuvarları ve göz merceğini oksidatif strese karşı korumada çok büyük öneme sahiptir (Şener ve Yeğen, 2009). Bazı zehirli ksenobiyotikler GSH ile bağlanamadıklarından hücre proteinleriyle kovalent bağ kurarak DNA, RNA (Ribonükleik Asit) ve protein gibi önemli molekülleri hasara uğratabilirler (Kayış, 2010). Birçok hücrede bulunan ve bir tripeptid-tiol olan GSH, H_2O_2 ' yi kimyasal olarak detoksifiye edebilir. GPx tarafından katalizlenen bu reaksiyon sonucu, koruyucu özelliğini kaybeden GSSG oluşur. Hücre, indirgeyici elektronların kaynağı olarak NADPH' ı kullanan GR' nin katalizlediği bir reaksiyon GSH' u tekrar meydana getirir. Böylelikle, NADPH hidrojen peroksidin indirgenmesinde dolaylı yoldan elektronları oluşturur (Er, 2017).

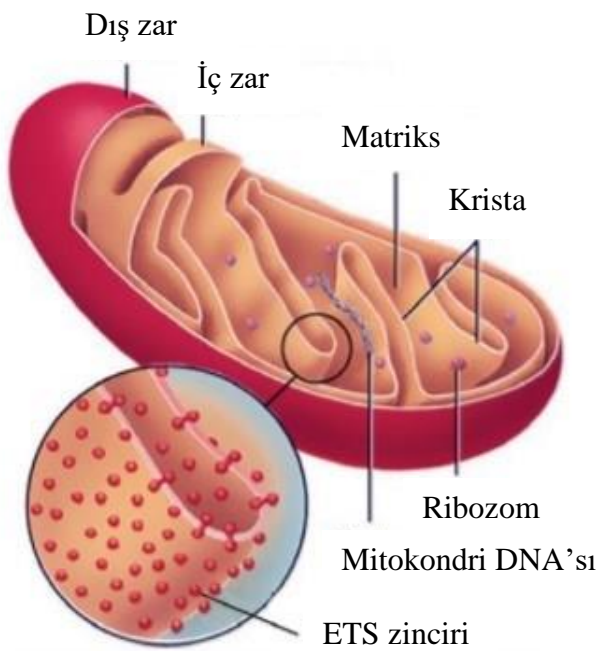


Şekil 2.9. Hidrojen peroksidin, NADPH tarafından glutasyon aracılığıyla indirgenmesi

2.8. Mitokondri

2.8.1. Mitokondrinin yapısı

Mitokondri ökaryotik hücre organellerinden biridir. Hem mitokondrial hem de nükleer DNA (nDNA)' sını olması nedeni ile mitokondri diğer organellerden farklıdır. Hücrelerdeki sayısı hücreden hücreye farklılık gösterir, örneğin bir karaciğer hücresinde yaklaşık 1000 adet mitokondri bulunur. Görevleri, hücrenin ana enerji taşıyan molekülü olan ATP kaynağı oluşturmaktır. ATP' yi şekerler gibi yakıtlardan kimyasal enerji kullanarak üretme süreci, hücresel solunum olarak adlandırılır ve bu adımların birçoğu mitokondrilerin içinde gerçekleşir. Mitokondri, hücrenin jöle benzeri sitosoluna asılır. Mitokondri oval şekilli olup iki katmanlı fosfolipid yapıya sahip çift zarla sarılıdır. Dıştaki zar organelin çevresini sarar, içteki krista adı verilen ve iç yüzey alanını arttıran birçok içe doğru kıvrım içeren bir iç tabakadan oluşur. Membranlar arasındaki boşluğa zarlar arası boşluk denir ve iç membranla çevrili bölüme mitokondrial matris denir. Matris, mitokondriyal DNA (mtDNA) ve ribozomları içerir. Mitokondri, çoğu insan hücresi türünde (diğer hayvan ve bitkilerde olduğu gibi çoğu hücre tipinde) bulunsada, sayıları hücrenin rolüne ve enerji ihtiyacına bağlı olarak değişir. Örneğin, kas hücresinin yüksek enerji ihtiyacı olduğu için çok sayıda mitokondrisi varken, oksijen taşınması için oldukça uzmanlaşmış olan kırmızı kan hücrelerinin hiç mitokondrisi yoktur (URL- 2).



Resim 2.1. Mitokondrinin yapısı

Organizmada oksidatif yıkım ürünlerinden alınan elektronların O_2 ' ye aktarılması sırasında açığa çıkan enerji ile ADP ve Pi ' den ATP sentezlenmesi olayı oksidatif fosforilasyon olarak adlandırılır.

Matriks jöle kıvamındadır, içinde birçok enzim bulunur. Bu enzimler, iç membranda yerleşmiş oksidatif enzimlerle ortaklaşa besinlerin CO_2 ve H_2O ' ya çevrilmesine sonuçta ATP adı verilen yüksek enerjili bir maddenin oluşumuna neden olurlar. Matriks sıvısı yüzde elli proteinden oluşur. Mitokondri matriksinde, hücre çekirdeğindeki benzeyen fakat birebir aynı olmayan mtDNA, RNA ve mitokondriyal ribozomlar da bulunmaktadır. mtDNA mitokondrilerin eşlenmesinde görev alır. mtDNA toplam 16.6-kilobayt (kB)' lık genoma sahiptir ve 37 tane gen içerir. Bu genlerden 22 tanesi taşıyıcı RNA, 2 tanesi ribozomal RNA' dan sorumludur. Diğer genlerden 7 tanesi ETZ kompleks I, 1 tanesi kompleks III, 3 tanesi kompleks IV, 2 tanesi kompleks V fonksiyonlarında görev alır (Wallace, 2005).

2.8.2. Hücresel solunum ve mitokondriyal enzimler

Hücresel solunum glikoliz, TCA döngüsü ve ETZ olmak üzere üç aşamada gerçekleşir.

Glikoliz

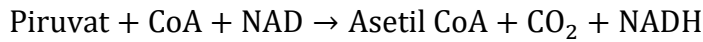
Glikoliz, glikozun hücresel metabolizma için enerji sağlamak amacıyla hidroliz edildiği ilk aşamasıdır. Glikoliz olayı, bir adet altı karbonlu glikoz molekülünün iki adet üç karbonlu pirüvat molekülüne dönüştürülmesidir. Bu aşamanın net kazancı, substrat seviyesinde fosforilasyon ile 2 adet ATP molekülü (oluşturulan 4 ATP/ kullanılan 2 ATP) ve iki adet NADH molekülüdür (URL- 3).

Asetil CoA oluşumu

Pirüvatın krebs döngüsüne dahil olabilmesi için mitokondri içine girerek asetil CoA (asetil koenzim A) ya dönüşmesi gerekmektedir. Krebse hazırlık evresinde; pirüvat oksijen varlığında mitokondriye girer, karbon ve hidrojen atomlarını kaybederek asetil CoA' ya dönüştür (Er, 2017; URL- 4).

Pirüvat dehidrogenaz

Başlıca glikoliz yoluyla olmak üzere sitoplazmada oluşan pirüvat iç membranda bulunan pirüvat taşıyıcı protein tarafından hidrojen iyonu eşliğinde ya da hidroksil iyonu karşılığında mitokondri matriksine taşınır. Glikoliz ürünü olan pirüvatın Asetil CoA' ya dönüşümünü sağlayan enzim pirüvat dehidrogenaz enzimidir. Pirüvat dehidrogenaz TCA döngüsünün ana elemanı değildir ancak iki karbonlu substratı olan Asetil CoA' nın oluşumu için ana kaynaktır (Keha ve Küfrevioğlu, 2010; 301-323). Pirüvat dehidrogenazın aktivitesi aşağıda verilmiştir.



Trikarboksilik asit siklüsü

Krebs döngüsü, Asetil CoA' yı alıp karbondioksit, NADH, FADH₂ ve ATP veya GTP üreten tepkimelerin tamamıdır. Glikolizde üretilen 3C' lu pirüvik asit ortamda oksijen (O₂) varsa mitokondriye girer. Mitokondriye giren pirüvattan 1 molekül karbondioksit ve iki hidrojen atomu ayrılır. Ayrılan hidrojenler NAD⁺ koenzimi tarafından tutulur ve NADH + H⁺ oluşur. Bunun sonucunda pirüvat krebs döngüsünü başlatacak olan Asetil CoA' ya dönüşür. İlk olarak iki karbonlu Asetil CoA, dört karbonlu bir molekül olan okzaloasetik asit ile birleşerek altı karbonlu sitrik asit oluşur (Sitrik asit döngüsü ismi buradan gelir). Sitrik asit, beş karbonlu bir bileşiğe dönüşürken bir molekül CO₂ açığa çıkar. Ayrıca bu basamakta ayrılan iki hidrojen atomu, NAD⁺ tarafından tutulur ve NADH + H⁺ oluşur. Beş karbonlu bileşikten de bir molekül CO₂ ile iki hidrojen atomu ayrılır ve hidrojenler NAD⁺ tarafından tutularak NADH + H⁺ meydana gelir. Sonuçta dört karbonlu bir bileşik elde edilir. Dört karbonlu bileşik başka bir dört karbonlu bileşiğe dönüşürken substrat seviyesinde fosforilasyonla 1 ATP üretilir. Bir önceki basamakta üretilen molekülden iki hidrojen atomu ayrılır ve FAD koenzimi tarafından tutularak FADH₂ oluşur. Böylelikle yeni bir dört karbonlu bileşik ortaya çıkar. Son olarak dört karbonlu bileşik iki hidrojen atomu daha kaybeder. Bu hidrojenler NAD⁺ tarafından tutularak NADH + H⁺ oluşur. Böylece başlangıçta Asetil CoA ile reaksiyona giren okzaloasetik asit yeniden meydana gelir. Dört karbonlu bu bileşik yeni bir Asetil-CoA ile tepkimeye girerek durmayan bir döngü haline dönüşür. Döngünün sonucunda 4 CO₂ açığa çıkmakta ve substrat düzeyinde fosforilasyonla 2 ATP üretilmekte, 6 NADH + H⁺ ve 2 FADH₂ oluşmaktadır (Çelik, 2007).

Sitrat sentaz (EC 2.3.3.16)

Sitrat döngüsünün ilk basamağı olan ve sitrat sentaz tarafından gerçekleştirilen, Asetil CoA'nın oksaloasetata dönüşümünü gerçekleştiren enzimdir (Keha ve Küfrevioğlu, 2010; 301-323).

Akonitaz (EC 4.2.1.3)

Akonitaz (akonitat hidrataz), sitratin izositrata dönüşümünü gerçekleştiren enzimdir. Bu aşamada dehidrasyon ve hidrasyon tepkimeleri birbirini takiben gerçekleşir. Akonitaz, bir Fe/S merkez içerir. Bu Fe/S merkezi, aktif bölgeden substrat bağlamak için ve H₂O'nun moleküle eklenmesi ya da çıkarılması için etki eder (Harvery, Champe ve Ferrier, 2007).

İzositrat dehidrogenaz (ISD, EC 1.1.1.42)

ISD, izositratın oksidatif dekarboksilasyonu sonucu α -ketoglutarata ve CO₂'e oksitleyen enzimdir. İzositrat dehidrojenazlardan biri elektron alıcısı olarak NAD⁺ gerektirir, diğeri ise NADP⁺ gerektirir. İki izoenzim aracılığıyla gerçekleştirilen reaksiyonlar yüksek oranda birbirine benzer. NAD-bağımlı enzim, mitokondrinin matriksinde bulunur ve TCA siklusunda izositratın α -ketoglutarata oksidatif dekarboksilasyonunu gerçekleştirir; NADP-bağımlı enzim ise mitokondrinin matriksinde ve sitozolde bulunarak anabolik indirgeme reaksiyonları için gerekli olan NADPH'nin meydana gelmesi için görev yapabilir. ISD, sitrik asit döngüsünde hız sınırlayıcı tepkimeyi gerçekleştirir. Mitokondride NAD⁺/NADH oranının yükselmesi, tepkimenin hızlanmasını sağlamaktadır (Keha ve Küfrevioğlu, 2010; 301-323).

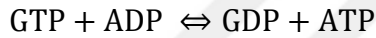
Alfa ketoglutarat dehidrogenaz (KGHD, EC 2.3.1.61)

TCA'nın dördüncü basamağında α -Ketoglutarat, oksidatif dekarboksilasyonu sonucu süksinil-CoA ve CO₂'e oksitlenir. Reaksiyonu α -ketoglutarat dehidrojenaz enzimi gerçekleştirir. Aynı zamanda NAD⁺ elektron alıcısıdır. α -ketoglutarat dehidrojenaz reaksiyonu, PDH reaksiyonuna benzer; tepkimelerin ikisinde de α -keto asit, karboksil gruplarının CO₂ olarak kaybedilmesi sonucu okside olmaktadır. α -ketoglutarat dehidrojenaz

kompleksi de yapısal ve fonksiyonel olarak PDH kompleksine benzer (Keha ve Küfrevioğlu, 2010; 301-323).

Süksinil CoA sentetaz (Süksinat tiokinaz, EC 6.2.1.5)

TCA siklusunda süksinil-CoA' nın tiyoester bağları α -ketoglutaratın oksidasyon enerjisi ile kopar. Sitrik asit döngüsünün sonraki basamağında, süksinil-CoA' nın tiyoester bağlarının yüksek oranda serbest enerjisi, bu bağların parçalanması ile salınır ve açığa çıkan enerji GTP veya ATP' de bir fosfo anhidrid bağının oluşması için tüketilir. Bu geri dönüşümü olmayan bir reaksiyondur. Süksinil-CoA sentetaz veya süksinik tiyokinaz diye tanımlanan enzim tarafından gerçekleştirilir. Süksinil-CoA' dan süksinat meydana gelir. Hayvansal dokuların bir kısmında, süksinil-CoA sentetazın biri GDP diğeri ise ADP için spesifik iki izoenzimi bulunur. Ayrıca süksinil-CoA sentetaz aracılığıyla oluşturulan GTP, fosfatı ADP' ye vererek ATP' nin oluşmasını sağlayabilir (Keha ve Küfrevioğlu, 2010; 301-323). Süksinil CoA sentetazın aktivitesi aşağıda verilmiştir.



Süksinat dehidrogenaz (EC 1.3.5.1)

Süksinil-CoA' dan meydana gelen süksinat, flavo protein süksinat dehidrogenaz aracılığıyla fumarata dönüştürülür. Süksinat dehidrogenaz, prokaryotlar canlılarda hücre zarına bağlıyken ökaryotlarda mitokondrilerin iç zarına bağlıdır. Sitrik asit döngüsünün zara bağlı bulunan tek enzimi süksinat dehidrogenazdır. Sığır kalp mitokondrilerinden izole edilen süksinat dehidrogenaz, üç farklı Fe/S grubu içerir. Elektronlar, süksinattan iç zarı ETZ' in bir parçası olan ubikinona (Q), FAD ve Fe/S aracılığıyla geçerler. Elektronların süksinattan elektron taşıyıcı zincir vasıtasıyla son elektron alıcısı olan O₂' e taşınması her elektron çifti başına iki ATP molekülü sentezine bağlanmıştır. Solunum zincirinde bir FADH₂ molekülünden iki molekül ATP sentezlenir (URL-5).

Fumaraz (Fumarat hidrataz, EC 4.2.1.2)

Fumaraz (fumarat hidrataz) enzimi aracılığıyla gerçekleştirilen hidrasyon reaksiyonu sonunda fumaratı, L-malata dönüştürülür. Fumaraz, yüksek derecede stereospesifiktir (Keha ve Küfrevioğlu, 2010; 301-323).

Malat dehidrogenaz (MD, EC 1.1.1.37)

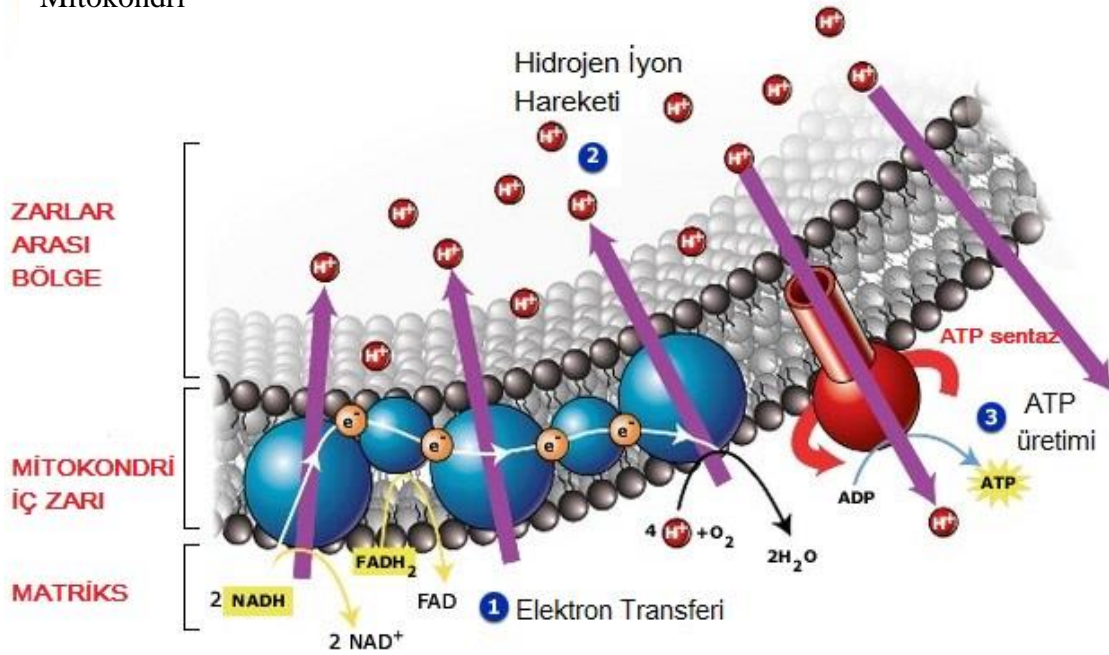
Sitrik asit döngüsünün son basamağında, L-malatı oksaloasetata oksidasyonunu NAD-bağımlı L-malat dehidrogenaz enzimi gerçekleştirir. Oksaloasetat konsantrasyonu düşük (<10⁻⁶ M) olduğunda malat dehidrogenaz reaksiyonu oksaloasetat oluşması yönünde gerçekleşir (Keha ve Küfrevioğlu, 2010; 301-323). MD aktivitesi aşağıda verilmiştir.



Elektron transport zinciri ve oksidatif fosforilasyon

ETZ; NADH ve FADH₂ gibi elektron taşıyıcılarının verdikleri elektronları ETZ elemanlarında redoks tepkimelerine sokarak ATP üretimini gerçekleştirir. ETZ elemanları iç zar olan krista üzerinde bulunur. Kıvrımlı olan zar yüzey alanının artmasını sağlar. Böylece enzimlerin etkinliklerinin artmasına sağlar. Elektronlar, son elektron alıcısı olan oksijene kadar ETZ elemanları boyunca taşınırlar ve enerji kaybederler. Elektronların verdiği enerji ETZ elemanları tarafından protonların aktif taşınmasında kullanılır ve ETZ elemanlarının üzerinde bulunduğu çift katlı fosfolipid tabakasının iki tarafında potansiyel fark oluşturulur. Bu potansiyel fark daha sonra ATP sentezi için kullanılır. ETZ elemanları, ökaryotik hücrelerde mitokondri ve kloroplast organellerinde bulunur. ETZ elemanları 4 tanedir ve Kompleks I, Kompleks II, Kompleks III ve Kompleks IV olarak adlandırılırlar (Keha ve Küfrevioğlu, 2010; 301-323).

Mitokondri



Resim 2.2. Elektron transport zinciri birimleri

Kompleks I (NADH dehidrogenaz, NADH-Q redüktaz, EC 1.6.99.3)

Kompleks I (NADH dehidrojenaz veya NADH: ubikinon oksidoredüktaz), bakterilerde en az 16, ökaryot canlılarda 43 farklı polipeptid zincirinden oluşan bir yapıya sahiptir. Yapısında FMN içeren flavoproteinler ve Fe-S merkezler bulunur. L harfine benzer ve L harfinin bir kolu matriste, diğer kolu mitokondri iç zarının içine doğru yatay şekilde uzanmaktadır. İki birbirine bağlı ve aynı anda gerçekleşen reaksiyonu gerçekleştirir. Bu reaksiyonlardan birincisi NADH' tan alınan iki elektronun ubikinon molekülüne (Q) aktarılarak ubikinol oluşturmaktır. İkinci reaksiyon ise birinci reaksiyondan elde edilen enerjile 4 protonun matristen zarlar arası bölgeye transferidir (Keha ve Küfrevioğlu, 2010; 301-323).

Kompleks II (Süksinat CoQ redüktaz, EC 1.3.5.1)

TCA döngüsündeki zara bağlı tek enzimdir. Kompleks I' den daha küçük ve basit yapıya sahiptir. İki tip prostetik grup içerir bunlar FAD ve dört demir atomlu bir Fe-S merkezidir. En az dört farklı protein vardır. TCA döngüsü ara metaboliti olan süksinattan elektronları FAD' ye aktarır sonra Fe-S merkezler üzerinden ubikona aktarır. Oksalaasetat ve malonat

süksinattan Kompleks II' ye elektron akışının önüne geçer. Karboksın ve thenoil fluoro aseton kompleks II' den, ubikinon' a elektron taşınmasının önüne geçer (URL-6).

Kompleks III (CoQ-sit c Redüktaz, sitokrom bc₁ kompleksi, ubikinon-sitokrom c oksidoredüktaz, EC 1.10.2.2)

Kompleks III, hem proteinleri olan sitokrom b ve sitokrom c1 ile hem yapısında olmayan Fe-S proteininden meydana gelen bir enzimdir. Kompleks I ve kompleks II ve diğer mitokondriyal dehidrogenazlar vasıtası ile gelen elektronları alan ubikonu bikonole indirgenir. Kompleks III ubikonolden elektronları sitokrom c' ye aktarırken, matriksten zarlar arası boşluğa protonları da transferini eder. Böylece bir proton gradienti oluşturur. BAL (dimerkaprol) ve Antimisin A Kompleks III enziminin çalışmasını inhibe eder (URL-6).

Kompleks IV (Sitokrom C oksidaz, EC 1.9.3.1)

Solunum zincirinin son basamağında elektronları sitokrom c' den O₂' ye taşır. Aynı zamanda oksijeni suya indirger. Sitokrom oksidaz enzimi a ve a₃ olmak üzere 2 hem grubu ve 3 tane Cu⁺² içeren 13 alt birimden oluşan kompleks bir yapıya sahiptir. Bu enzim her dört elektronun taşınması için enzim matriksinden dört H⁺ alarak O₂' yi 2 H₂O' ya çevirir. Sitokrom oksidazın O₂' ye eğilimi çok yüksektir. CO, CN, H₂S ve azid Komleks IV enziminin çalışmasını inhibe eder (URL-6).

Kompleks V (ATP sentaz, EC 3.6.3.14)

Mitokondri iç membranında yer alan ATP sentaz enzimi ADP + P_i' den ATP sentezini katalizler. F₀ ve F₁ iki alt birimden oluşan F tipi bir ATPaz' dır. Elektronların kompleks I, III ve IV üzerinden aktarılması sırasında protonlar matriksten zarlar arası boşluğa aktarılır. Bu sırada iç zarda bir proton gradienti oluşmaktadır. Oluşan gradient, protonların matrikse geri dönmeleri için proton hareket ettirici güç ortaya çıkarır. Bu gücün etkisi ile protonlar matrikse geri dönerler ve elektrokimyasal gradientteki enerji, protonların matrikse geri dönmeleri sırasında ATP oluşumunda kullanılır. Oksidatif fosforilasyon olarak bilinen bu olay, ATP sentaz enzimi tarafından gerçekleştirilir. F₀ iç mitokondri membranını kaplayan integral bir proteindir ve proton kanalını oluşturur. Protonların membranlar arası boşluktan

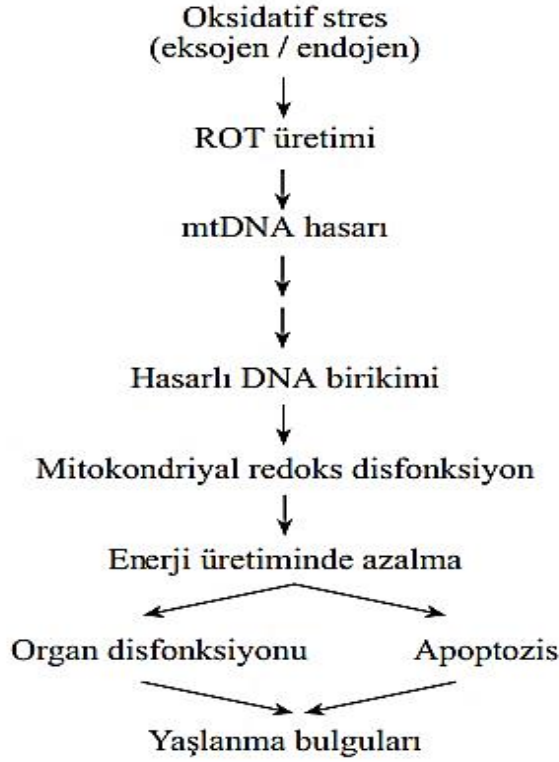
matrikse geri dönüşü F_0' a bağlıdır. ATP sentazın F_1 birimi $ADP + P_i'$ den ATP sentezini katalizler. F_0' a bağlı periferel membran proteini olup, matrikse doğru uzanan küre şeklinde bir yapısı vardır (URL-6).

2.9. Mitokondri ve Oksidatif Stres

Yaşlanma ile mitokondrial solunum ve oksidatif fosforilasyon yavaş yavaş birbirinden ayrılır ve solunumsal enzimlerin faaliyetleri azalır. Böylece ETZ' inde artmış olan elektron akışına bağlı mitokondride ROT' nde artışlar meydana gelir (Cankurtaran, 2005).

mtDNA' da artan ROT' nden oksidatif hasara karşı duyarlıdır. Mutant mtDNA tarafından kodlanan defektif protein subunitleri bozulmuş solunum fonksiyonları gösterir; elektron kaçağı ve ROT üretimi artar ve sonucunda oksidatif stres ve mtDNA hasarı artar. Bu kısır döngü farklı hücrelerde farklı oranlarda meydana gelir ve yaşlanma ile mtDNA' da mutasyon ve oksidatif hasara neden olur. O_2^- , OH \cdot , NO, lipid peroksit, H_2O_2 bilinen ROT' leridir. 50' li yaşlardan itibaren ROT yapımı belirgin şekilde artmaya başlar.

Mitokondriler, hücre oksijenin % 90' nının oksidatif fosforilasyonla tüketildiği merkezleridir. Bunların % 2' si ROT adını alan ürünlere dönüşür. ROT, DNA, protein, lipidler ve tüm yapılardaki moleküllere saldırır. DNA molekül oksidasyonu ile genetik messenger DNA hasarı, hücre bölünmesinin durması, kontrolsüz büyümesi, metastaz yapması, lipid peroksidasyonu ile hücre membran hasarı, ateroskleroz hızlı şekilde meydana gelir. GSH hücrenin lipid olmayan bölümünün en önemli koruyucusudur. SOD ise hücrede en fazla bulunan antioksidan enzimdir. Vitamin E lipid kısımda, vitamin C lipid olmayan bölümünde serbest radikalleri inhibe ederler. Antioksidan verilen memelilerde hayat süresinin % 30 oranında arttığı bildirilmiştir. SOD, GPx, KAT gibi enzimlerle vücut ROT' leri nasıl nötralize etmeye çalışır. Yaşlanmaya bağlı olarak bu enzimlerin miktarı azalır ve artmakta olan ROT' ların elimine edilmeleri zorlaşır. Oksidatif stres daha fazla etkin hale gelir (Cankurtaran, 2005). Oksidatif hasara bağlı olarak mutasyonel yükün artması, koruyucu ve onarıcı proteinlerin hasarlanması mitokondrilerin hasarını ve mutasyona uğrama ihtimalini artırır dolayısı ile hücrel yaşlanmayı hızlandırır (Öğüt ve Atay, 2012). Şekil 2.10' da Oksidatif mtDNA hasarı ve yaşlanma gösterilmiştir (Burçak ve Andican, 2004).



Şekil 2.10. Oksidatif mtDNA hasarı ve yaşlanma

Yaşlanma ile biriktiği saptanan oksidatif mtDNA lezyonları mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun başlıca nedenidir. Özellikle yaşla artan mtDNA delesyonları post-mitotik beyin ve iskelet kasında birikime uğramaktadır. Günümüze dek yapılan çalışmalar fizyolojik yaşlanma, prematür yaşlanma semptomları; Alzaymır hastalığı, diyabet, kalp yetmezliği, sağrlık, optik sinir dejenerasyonu, birçok ilerleyici kas hastalıkları ve kanser gibi yaşlanma bağlı olarak artan hastalıkların mutasyon geçirerek DNA içeren disfonksiyonel mitokondrilerin varlığı ile ilgili olduğunu ortaya koymuştur (Burçak ve Andican, 2004).

2.10. Mitokondriyal Hastalıklar

Mitokondri; enerji oksidasyonu ve ATP üretiminde hücrenin ana fonksiyonel bileşenidir. Mitokondriyal hastalıklar genetik defekt mtDNA ile nDNA mutasyonları sonucu ortaya çıkar. Oksidatif fosforilasyonu etkileyen mutasyonlar sonucu ATP miktarında azalma multisistemik belirti ve bulgulara neden olur. Yüksek aerobik enerji ihtiyacı olan sinir sistemi, retina, kalp ve iskelet kası, karaciğer ile böbrekler mitokondriyal bozukluklarda en çok hassasiyet gösteren organlardır. Bunlardan beyin ve iskelet kasları istisnasız olarak her

durumda değişen düzeylerde etkilenirler. Mitokondriyal hastalıkların belirti şiddeti kişilere göre değişiklik gösterebilir (Özkul ve Akyol, 2012).

Kalp, iskelet kası, merkez sinir sistemi, böbrek gibi bazı dokular mitokondriyal enerji üretimine yüksek oranda ihtiyaç duyduklarından dolayı mtDNA mutasyonlarından (nokta mutasyonları, delesyonlar, dublikasyonlar) oldukça fazla etkilenirler. Bundan yüzden hastalıklar metabolizma ile bağlantılıdır. Hipotoni, gelişme geriliği, mental gerilik, konvülsiyon nöbetleri ve ataksi başlıca klinik bulgulardır. Vucut sıvılarında laktik asit düzeyinin artması en önemli laboratuvar bulgusudur (Oğuz, 2015). Yaşlanma süreci içersinde mtDNA mutasyonlarının birikmesi oksidatif fosforilasyon sisteminin verimliliğini düşürür. Geç başlangıçlı nörodejeneratif hastalıklar olan Parkinson, Alzaymır ve Huntington' da mitokondriyal solunum zincir disfonksiyonu patogenezlerden biri olarak kabul edilir (Oğuz, 2015). Çizelge 2.2' de Mitokondrial hastalıkların etkilediği yapılar ve bunlara ait semptomlar verilmiştir (Koç ve Sarıca, 2003).



Çizelge 2.2. Mitokondrial hastalıkların etkilediği yapılar ve bunlara ait semptomlar

Etkilenen organ	Semptomlar
Beyin	Gelişme geriliği, mental retardasyon, demans, epileptik nöbetler, nöropsikiyatrik bozukluklar, atipikserebral felç, migren, inme
Periferik Sinir	Güçsüzlük (intermittant olabilir), nöropatik ağrı, refleks kaybı, gastrointestinal problemler (gastroösefagial reflü, gecikmiş gastrik boşalım, konstipasyon, psödoobstrüksiyon vb.), aşırı terleme veya ter yokluğuna bağlı ısı regülasyonuna ait problemler
Kas	Güçsüzlük, hipotoni, kramp, kas ağrısı
Böbrek	Fanconi sendromu, proksimal tubuler etkilenmeye bağlı protein, magnezyum, fosfor, kalsiyum ve diğer elektrolit kayıplarına ait klinik bulgular
Kalp	Kardiyak iletim defektleri (kalp blokları), kardiomyopati
Karaciğer	Hipoglisemi, karaciğer yetmezliği
Göz	Görme keskinliğinde azalma, körlük
Kulak	İşitme azlığı, sağırılık
Endokrin	Diabet, hipoparatiroidizm, büyüme/multipl hormon eksikliği
Kemik iliği	Sideroblastik anemi/pansitopeni, kazanılmış sideroblastik anemi
Gastrointestinal sistem	Pankreas yetmezliği, Villusatrofisi
Sistemik diğer problemler	Laktik asidoz, kilo kaybı, kısa boy, yorgunluk, intermittant hava açlığını da içeren solunum problemleri

Nörolojik hastalıkların patofizyolojik belirtileri, genellikle hücrel redoks hemostazı ve daha sonra oksidatif ve nitroztatif stres bozukluğu ile ilişkilidir. Oksidatif Nitroztatif Stres (ONS), ROT veya RNS (reaktif nitrojen türleri) biyolojik sistemde bu bileşikler arasındaki

dengelessizlik olarak tanımlanabilir. Ekso ve endojen patojenik uyarılar böylece onların yapı ve fonksiyonlarını değiştirerek, üretim artışı veya ROT/RNS atma kapasitesinde azalma, ROT/RNS birikimi lipitler, proteinler, nükleik asitler ve diğer biyolojik aktif molekülleri uyandırır. Endoplazmik retikulum ve trans membran NADPH oksidaz kompleksi yanında mitokondri ROT/RNS nin bir diğer önemli kaynağıdır. ETZ' indeki elektron kaçağı sonucunda bir O₂ molekülü oluşur ve bir elektron serbest radikal oluşturur. Süperoksit (O₂^{·-}), OH[·] ya da ürünü NO ile reaksiyona sokulması sonucu H₂O₂ gibi farklı bir ön madde olan (NO)⁻ Peroksinitrit (ONOO⁻) ve daha sonra azot dioksit (NO₂[·]) oluşur. Disfonksiyon ve ROT/RNS tarafından ortaya çıkan mitokondri hasarı merkezi sinir sistemi hastalıklarının (MSS) patogeneğinde kritik öneme sahiptir (Ruszkiewicz ve Albrecht, 2015).

2.10.1. Kearns-sayre sendromu (KSS)

Oftalmopleji-plus sendromu, okülokranio somatik sendrom, kronik progresif eksternal oftalmopleji ve miyopati, ragged red fiber' in eşlik ettiği kronik eksternal oftalmopleji olarak da adlandırılan çok az rastlanan bir hastalıktır. KSS, özel bir fenotipe neden olan mtDNA' daki delesyonlar sonucunda ortaya çıkar. Delesyonun büyüklüğü değişmesine rağmen benzer fenotiple sonuçlanır. Kandan ya da kas örneğinden alınan mtDNA delesyonu saptanarak tanısı konur (Koç, Sarıca ve Yerdelen, 2003).

2.10.2. Melas sendromu

MELAS sendromu, 1984 yılında ilk kez Pavlakis ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. mtDNA' daki mutasyonların neden olduğu inme benzeri nöbetler, laktik asidoz, mitokondriyal miyopati ve multisistem organ tutulumu ile karakterize olmuş progresif nörodejeneratif hastalıklardandır. Bu hastalıkta görülen akut gelişimli nörolojik defisitler inmeyi taklit edebilir. MELAS sendromundaki mitokondrial mutasyonlar, ciddi oksidatif mitokondrial hasarına neden olur. Vücuttaki tüm hücreleri özellikle fazla miktarda oksijen kullanan nöron, kas ve endokrin hücrelerini etkiler. Hücre hasarının gerçek mekanizması bilinmemekle beraber mitokondri iç zarında bulunan solunum zincirindeki enzimatik disfonksiyonunun, fazla serbest radikallerin oluşmasına ve hücrenin faaliyetleri için gerekli olan enerji üretimini azalttığı ileri sürülmektedir. İnme benzeri nöbetler, işitme kaybı, diyabetes mellitus, migrenöz başağrısı, miyopati, nefes darlığı, deri belirtileri, psikiyatrik bozukluklar MELAS' da görülen semptomlar arasındadır (Koç ve diğerleri, 2003).

2.10.3. Pearson sendromu

Pearson ve arkadaşları tarafından ilk kez 1979 yılında tanımlanan multisistem etkilenmesi ile giden mitokondri hücrelerine zarar veren hastalıklardan biridir. Çok az rastlanan bu hastalık refraktersisteroblastik anemi, pansitopeni, oksidatif fosforilasyon defekti, pankreas ekzokrin salgı yetmezliği ve değişik derecelerde karaciğer, böbrek ve endokrin yetmezliğine neden olan ölümcül bir hastalıktır. Yapılan genetik çalışmalarda mtDNA' nın büyük bir kısmının delesyonu ya da kaybının rol oynadığı bildirilmiştir (Koç ve diğerleri, 2003).

2.10.4. MERRF (Miyoklonik Epilepsi Ragged Red Fibers)

İlk defa 1980 senesinde Fukuhara ve arkadaşları miyoklonik epilepsi olarak tanımlamışlardır. Rosing ve arkadaşları 1985 yılında büyük bir ailede benzer bulgular bulmuş ve otozomal dominant, otozomal resesif ve X2' ye bağlı geçişi baskılayarak bu hastalığın anneden geçtiğini belirtmişlerdir. 1990 yılında Shoffner ve arkadaşları ilk defa mtDNA' da tRNA(taşıyıcı RNA)-Lys geninde missens mutasyonunu tanımlamışlardır. tRNA Lys' in mitokondriyal genini ve dolayısıyla oksidatif fosforilasyon için gerekli olan protein sentezini bozan bir nokta mutasyondur. Bu nokta mutasyonu, özellikle sitokrom c oksidaz' daki NADH-CoQ redüktaz (kompleks1)' de olmak üzere multipl eksikliklere neden olur (Koç ve diğerleri, 2003).

2.10.5. NARP (Nöropati, Ataksi, Retinitis Pigmentosa)

NARP sendromu, duysal nöropati, serebel larataksi, retinitis pigmentosa, demans, nöbet, gelişme geriliği ve proksimal kas zayıflığı ile karakterize edilmiş mitokondriyal hastalıklardan biridir. Kerrison ve arkadaşları 2000 yılında, NARP' da retinopatinin progresif olduğunu bildirmişlerdir. Mitokondrial H⁺-ATPaz' ın 6. birimini kodlayan gendeki mutasyon sonucu meydana gelir (Koç ve diğerleri, 2003).

2.10.6. LHON (Leber' in Herediter Optik Neropatisi)

LHON, mtDNA' daki birçok anlamsız mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkar. Akut ya da subakut ve körlüğe neden olan mitokondriyal bir hastalıktır (Koç ve diğerleri, 2003).

2.10.7. Alper hastalığı (progresif infantil poli distrofi)

Oksidatif fosforilasyon bozukluklarına bağlı olarak çok nadir ortaya çıkan mitokondriyal bir hastalıktır. Nöbet, demans, spastisite, körlük, karaciğer fonksiyon bozuklukları ve serebral dejenerasyonla ilerler. Otozomal çekinik kalıtımla aktarılır (Koç ve diğerleri, 2003).

2.10.8. Friedreich ataksisi

Friedrich ataksisi, otozomal çekinik kalıtılan, insan vücudunun duruş ve dengesindeki bozukluklara en sık rastlanan türüdür. 9q13 kromozomunda bulunan frataksin (frataxin X25) geninin tekrarlayan büyümesi sonucunda ortaya çıkar. Frataksin mitokondriyal demir içeriğinin dengelenmesinde görev alan proteindir. Frataksin eksikliğinde mitokondride demir birikimleri görülür (Koç ve diğerleri, 2003).

2.10.9. Kartilaj-saç hipoplazisi (KSH)

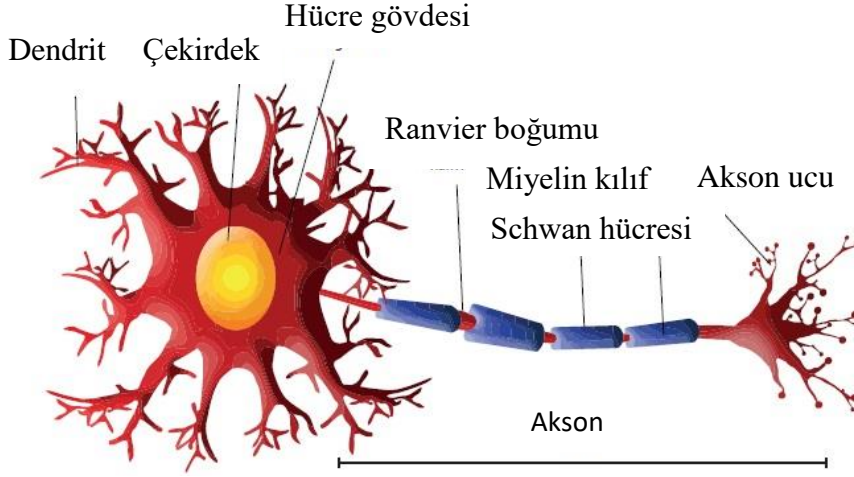
9q21-p12 kromozomu üzerinde yer alan mitokondriyal RNA-processing endoribonükleaz komponent geninde meydana gelen mutasyona bağlı olarak otozomal çekinik olarak kalıtılır (Koç ve diğerleri, 2003).

2.11. Beyin

2.11.1. Beyinin yapısı ve görevleri

Beyin, öğrenme dahil diğer tüm zihinsel işlemlerin yürütüldüğü ana merkezdir. Beyin, yaklaşık 100 milyar nörondan oluşur. MSS'nin en önemli kısmı olan beyin, kafatası kemikleri içinde, kütlesi olgun bireylerde ortalama olarak 1300-1400 gramdır. Yüzeyi ortalama 2000-2100 cm² alana sahip olan bir organımızdır. Beyin, vücut ağırlığımızın yaklaşık % 2' si kadarını oluşturmasına rağmen, enerjimizin % 20 ile % 25' ini kullanır. Sinir hücreleri ve yardımcı glia hücreleri olmak üzere iki tür hücre bulunur. Beyin, yaklaşık bir trilyon hücreden meydana gelir (Avcı ve Yağbasan, 2008). Sinir sistemi ve beyin fonksiyonlarının ana elemanları nöronlardır. Bir nöron kısımdan hücre gövdesi, dendrit ve akson olmak üzere üç ana kısımdan oluşur. Nöronlar, dendrit olarak adlandırılan ve hücre

gövdesinden çıkan çok sayıda kola sahiptir. Sinir hücreleri arasındaki elektriksel ve kimyasal sinyallerle beyinde haberleşme ağı oluşur (Avcı ve Yağbasan, 2008).

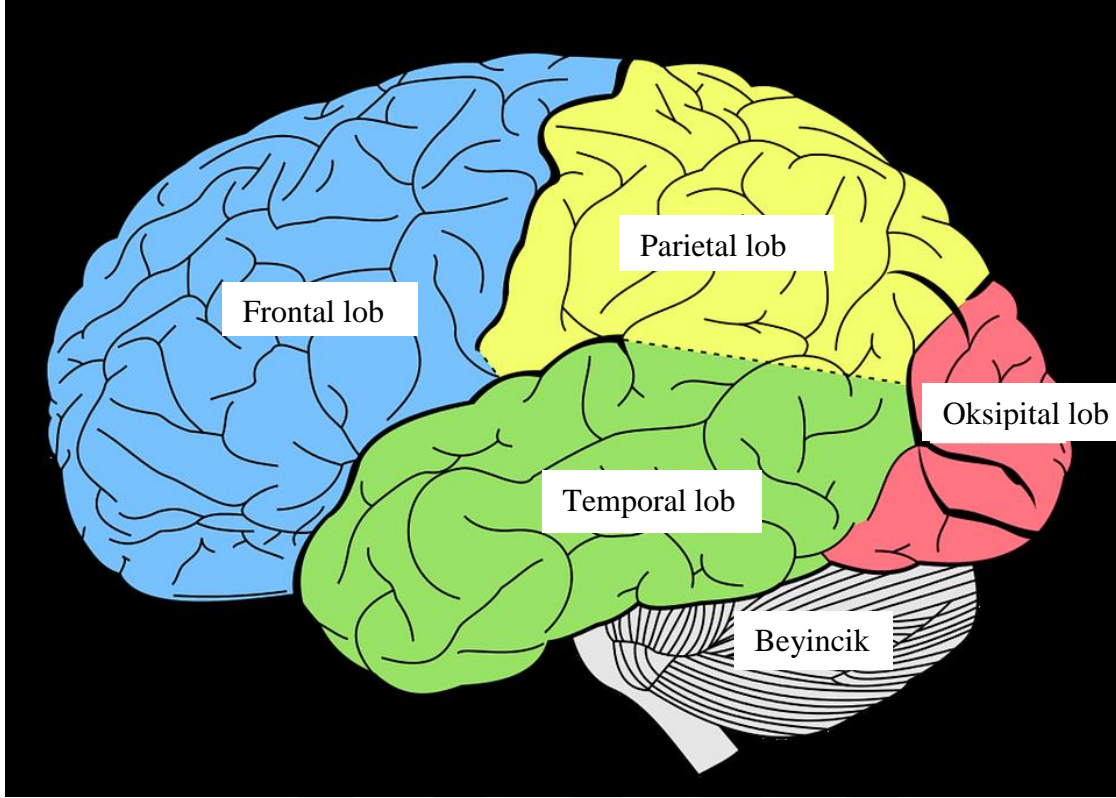


Sinir hücresi yapısı

Resim 2.3. Nöronun yapısı

Dentritler nöronlardan aldığı elektriksel yükü akson olarak adlandırılan bölüm ile başka nöronlara aktarır. Her nöron miyelin kılıfla sarılı aksone sahiptir. Nöronlar sinaps bölgeleri olarak adlandırılan ve akson uçları, dentrit ya da hücre gövdesi arasında yer alan birleşme bölgeleri sayesinde iletişim kurarlar (Avcı ve Yağbasan, 2008).

Bilim insanları beyni dört loba ayırırlar. Bunlar arka kafa (okspital), ön (frontal), yan kafa (parietal) ve şakak (temporal) loblarıdır. Arka kafa lobu beynin arka ortasında bulunan ve görmeden sorumludur. Ön lob kafanın ön bölgesinde bulunur yaratıcılık, problem çözme, karar verme ve planlama gibi eylemleri gerçekleştirir. Yan kafa lobu üst arka bölgededir ve yüksek algılama ve dil işlevlerini sorumludur. Şakak lobu (sağ ve sol kısım) kulakların üst kısmında bulunur. Bu bölge genel olarak duyma, hafıza, anlama ve dil fonksiyonlarını yerine getirir. Beynin orta bölgesi hipokampus, talamus, hipotalamus ve amigdala dört kısımdan oluşur. Limbik sistemde denilen beynin bu bölümü duygular, uyku, dikkat, vücut işleyişi, hormonlar, cinsellik, koku ve birçok beyin kimyasalının üretiminde görev alır (Avcı ve Yağbasan, 2008).



Resim 2.4. Beyin lobları

Beynin altında bulunan beyin sapı genellikle isteğimiz dışında yaşamsal öneme sahip olan otonom fonksiyonları kontrol eder. Oksipital lobun hemen altında beyincik bulunur. Vücut dengesini korumada ve kasların uyumlu şekilde çalışmasını düzenler. Küçük yapısıyla talamus beyin merkezinde bulunur. Beynin bu bölümü duyu organları ile korteks arasında direk bilgi alışverişini gerçekleştirir. Talamusun hemen altında hipotalamus bulunur. Vücut ısısı, açlık- tokluk hissi, susuzluk ve cinsellikle ilgili duyguları kontrol eder. Amigdala talamus ve hipotalamusun yanında bulunan ve beyin psikolojik nöbetçisi olarak bilinen duyguların yönetiminde büyük bir paya sahiptir. Hippocampus, temporal lobun iç taraflarında yer alır ve hafıza, duygular ve anıların bulunduğu bölümdür. Hippocampus daha çok öğrenme ve hafızadan sorumludur (Avcı ve Yağbasan, 2008)

Beynimiz sağ ve sol olmak üzere iki yarım küreden oluşur. Beyin yarım küreleri farklı fonksiyonlarda görev alırlar. Korpus kallosum, yoğun bir sinir ağı demetinden oluşur. Beynin sağ ve sol lobu arasında bilgi iletişimini gerçekleştiren bir köprü görevi görmektedir. Korpus kallosum kesildiğinde, bu iki kısım arasındaki bağlantı kesilmektedir. Çizelge 2.3’ de Beyin yarım kürelerinin fonksiyonları verilmiştir (Avcı ve Yağbasan, 2008).

Çizelge 2.3. Beyin yarım kürelerinin fonksiyonları (Avcı ve Yağbasan, 2008)

Sol yarım küre	Sağ yarım küre
Parçalı, sıralı	Bütünsel
Zihinsel, entelektüel	Sezgisel
Düzenleme	Kendiliğinden anında olan
Çözümsel, analitik	Yaratıcı/duyarlı, hassas
Mantıksal	Duygusal
Rasyonel	Yüzleri hatırlama
İsimleri hatırlama	Duygularıyla hareket etme
Problemleri parçalara ayırarak çözme	Bütüne bakarak problem çözme
Çizgisel düşünme	Üç boyutlu düşünen
İşitsel	Görsel
Yazmayı ve konuşmayı tercih etme	Resim yapma/çizme ve dokunulacak nesnelere tercih
Konuşulan talimatları takip etme	Yazılı veya kanıtlanmış talimatları takip etme
Doğru/yanlış, çoktan seçmeli ve eşleştirmeli testleri tercih etme	Yazılı sınavları tercih etme
Az risk alma	Çok risk alma (az kontrol ile)
Ayrıntılara bakma	Benzer özelliklere bakar
Vücudun sağ tarafını kontrol etme	Vücudun sol tarafını kontrol etme
Matematiksel düşünme	Rastgele ve açık uçlu düşünme
Somut düşünme	Soyut düşünme
Dil öğrenme becerisi	Müzikal yetenekler
Bir şey için bir müddet düşünür	Eşzamanlı düşünme
Sözlü dil kullanma	Jest, mimik, duygular ve vücut dili ile yorumlama
	Yön bulabilme becerisi

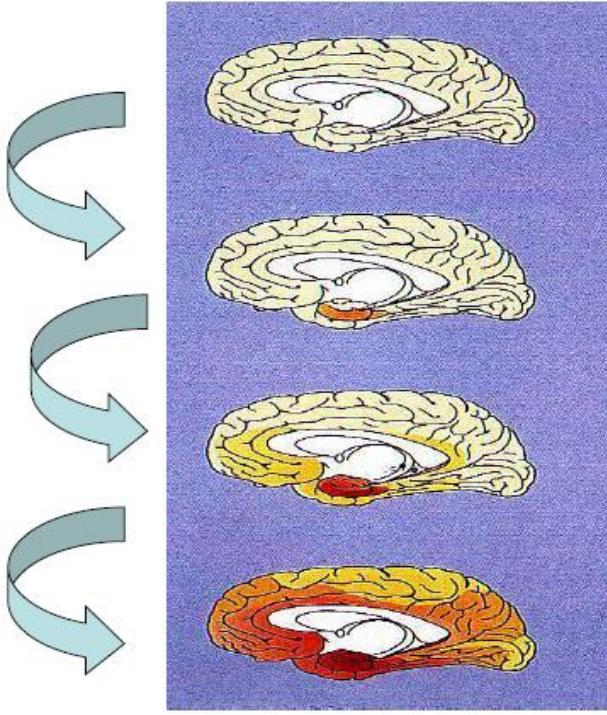
2.11.2. Beyin hastalıkları ve mitokondri

Beynin glikoz metabolizması birçok faktörden etkilenebilmektedir. Bu faktörler arasında mitokondrial solunum önemli bir yere sahiptir. Birçok nörodejeneratif ve dejeneratif olmayan bozukluk patofizyolojisinde, mitokondrial işlev bozukluğu ve hücre ATP düzeylerinde düzensizlik olduğunu gösterir. Mitokondrielerde fonksiyon bozukluğu; diabetes mellitus, kardimyopati, Leigh' s sendromu, Friedrich ataksisi, Huntington sendromu, Parkinson, Alzaymır ve Şizofreni gibi birçok hastalık etyopatolojisinde rol oynamaktadır. Alzaymır ve Parkinson hastalarının beyin dokularında ve plateletlerinde sitokrom c oksidaz (kompleks IV) ve kompleks I enzim aktivitesinde azalma görülmüştür. Ayrıca mitokondrial morfolojik değişiklikler, nokta mutasyonları, genomda delesyon ve deplesyonlar, miyoklonik epilepsi ve Leber hastalığında gösterilmiştir. mtDNA histon proteinleri tarafından korunmadığı için ve DNA zayıf onarım sistemine sahip olduğu için nDNA' ya göre somatik delesyonlara daha çok maruz kalır (Akarsu, 2014). Leber herediter optik nöropati, miyopati, diabetes mellitus, kronik progresif eksternal oftalmopleji, mitokondrial nörogastro intestinal ensefalo miyopati DNA mutasyonları sonucunda meydana gelen hastalıklar arasında sayılabilir. Etiyopatogenezinde mitokondrial disfonksiyonların yer aldığı bozukluklara psikiyatrik belirtilerin olduğuda bilinmektedir. Yapılan hayvan deneylerinde mtDNA mutasyonları ile psikiyatrik belirtilerin ortaya çıktığı gözlenmiştir (Akarsu, 2014).

ROT/RNS toksisitesi, Alzaymır hastalığı, Parkinson hastalığı ya da amyotrofik lateral skleroz gibi nörodejeneratif hastalıkların, önemli bir patojenik faktörüdür. Amyotrofik lateral skleroz, aynı zamanda diğer serebral felç, epilepsi, hepatik ensefalopati veya ağır metal toksisitesi ile ilgili beyin disfonksiyonu arasında olmayan dejeneratif beyin hastalıkları da görülür (Ruszkiewicz ve Albrecht, 2014). Primer mitokondriyal hastalıklar; mtDNA veya nDNA' daki mutasyonlar sonucunda solunum zinciri veya oksidatif fosforilasyon fonksiyonlarında bozulmaya yol açan, birçok sistemi etkileyebilen multisistemik hastalıklardır. Kas ve santral sinir sistemi gibi yüksek enerji ihtiyacı olan sistemler daha çok etkilenebilir. İlaç kullanımı gibi nedenlerle sekonder olarak mitokondriyal hastalıklar ortaya çıkabilmekte, normal yaşlanma sürecinde de mitokondriyal gen ekspresyonunda progressif azalma olmaktadır. Son yıllarda Alzaymır hastalığı, Parkinson hastalığı, Amiyotrofik lateral skleroz gibi dejeneratif hastalıklarda mitokondriyal disfonksiyona yönelik artan sayıda çalışmalar vardır. Ancak yalnızca oksidatif fonksiyonu bozan solunum

zincirindeki defektler primer mitokondriyal bozukluk olarak değerlendirilmektedir (Ekmekçi, Karasoy ve Yüceyar, 2012).

Alzaymır hastalığı yaklaşık 100 yıl önce ilk kez ilerleyici zihinsel işlev bozukluğu ve davranış değişikliği şikayetleri ile hastaneye yatırılan bir hastada keşfedilmiştir. Beş yıl boyunca izlenen ve ölümü ardından otopsi yapılan Auguste D. isimli hastadan elde edilen verilere dayanılarak tanımlanmıştır. Auguste D.'nin beyin dokusunun mikroskopta incelemesinin ardında görülen nörofibriler yumaklar ve senil plaklar hastalığın tanısını kesin koydurucu patolojik belirleyiciler olarak kabul edilmiştir. Hastalık, o günlerden bu yana, Auguste D.'yi izleyen ekipte yer alan Alois Alzaymır'ın adıyla anıla gelmiştir (Yazıcı ve Şahin, 2010). Alzaymır hastalığı, beyindeki nöronların hasar görmesi ile aralarındaki iletişimin bozulması sonucu ortaya çıkmaktadır. Alzaymır'ın beynin entorhina cortex'inde başladığı, hafıza ile ilgili fonksiyonlarda önemli olan hippocampus'a ilerlediği belirtilmektedir (Oğuz, 2015). Alzaymır hastalığı üzerinde çalışanların her bir grubu onun farklı bir yönü üzerinde çok daha detayla durmaya başlamışlar. Bu nedenle de hastalığa sebep olarak gösterilen etmenler birkaç hipotez olarak şekilde ortaya konulmuştur. Ortaya atılan hipotezler ve günümüzde geçerliliği kabul edilen sebeplerden en güncel olanı; beyindeki bir proteinin (*β-amyloid*) toksik bir beyin kimyasalı haline gelmesidir. Alzaymır hastalarında bu proteinin direkt etkili olduğunun belirtilmesi yanında, onun geliştirecek diğer zararların etkisini arttırma yoluyla iş gördüğüne de işaret edilmektedir (Öber, 2008). Şekil 2.12' de Beyinde biriken protein sonucu meydana gelen hasar gösterilmiştir (Yazıcı ve Şahin, 2010).



Şekil 2.11. Beyinde biriken protein sonucu meydana gelen hasar

Parkinson hastalığı yaşla ilişkili nörodejeneratif hastalıklar arasında, Alzaymır hastalığından sonra ikinci sırada gelen prevelansı ile (65 yaşında % 1; 85 yaş üzerine % 3-5) önemli bir yer tutmaktadır. Parkinson hastalığındaki seçici nöron kaybı temel olarak substansiya nigradaki dopaminerjik nöronlarda gerçekleşmektedir. Hayatini koruyan nöronlarda ise Lewy Cisimciği olarak adlandırılan intra sitoplazmik inklüzyonlar hastalığın önemli patolojik belirteçleridir. % 90' ı sporadik olmakla beraber, % 10 kadar ailesel geçiş gösteren vakaların moleküler analizi hastalığın patogenezinde ubikülin-proteazom (UPS) yıkım yolu ve otofaji bozukluğuna dikkat çekmektedir (Çelik, Yiğitbaşı, Tuç ve Kurular).

Mitokondriyal işlev bozukluğu nörodejeneratif hastalıkların ilk belirtilerinden biri olarak kabul edilmektedir. Mitokondri, hücrede enerji metabolizmasının kalbi durumundadır. Parkinson hastalığı olgularının hemen tamamında oksidatif fosforilasyonda kilit rolü olan mitokondriyel kompleks I' in aktivitesinin düştüğü gösterilmiştir. Bu da Parkinson hastalığında mitokondriyel hasarı gösteren ilk delil olarak kabul edilmektedir. Bu hasarın bir nedeni mitokondrinin doğası gereği “serbest radikallerin” aşırı üretimi olabilir. Hücrede bu molekülleri etkisiz hale getirecek antioksidan sistemler de mevcuttur. Serbest radikallerin çevresel etmenler etkisiyle aşırı üretimi, ya da antioksidan sistemindeki işlev bozuklukları sonucu hücredeki yarı ömürlerinin artması, başta mitokondri olmak üzere hücredeki birçok

yapıya zarar verebilir. Ancak antioksidan sisteminde görev alan proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyon/polimorfizm taramaları istatistiksel olarak parkinson hastalığı ile ilişkili anlamlı sonuçlar vermemiştir. Mitokondri ile Parkinson hastalığı ilişkisine bağlı diğer önemli delil ise ETZ inhibitörleri kullanılarak deney hayvanları üzerinde Parkinson semptomlarının oluşturulmasıdır (Çelik ve diğerleri). Oksidatif stres ile ilgili değişiklikler Parkinson hastalarının beyin dokusunda, geçici mitokondriyal kompleks I artmış, demir düzeyleri kombinasyonu değişmiş, düşük GSH düzeyleri kaydedilmiştir. Parkinson hastalığı patogenezi Lewy cisimciklerinin yaygın bir oluşum ile birlikte, substantianigra nöronların kaybı ile ilgilidir (Ruszkiewicz ve Albrecht, 2014).



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Deneysel çalışmamızın deney hayvanları ile olan kısmı Ondokuz Mayıs Üniversitesi Cerrahi Araştırma Merkezi Deney Hayvanları Laboratuvarında, Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Etik Kurulu' nun (HADYEK 2014/24) sayılı izni ile yapılmıştır. Biyokimyasal çalışmalar ise Amasya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü ve Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

3.1.1. Analizlerde kullanılan cihazlar ve malzemeler

Spektrofotometre (Shimadzu UV-VIS 1240), Hassas terazi (MettlerToledo MS 2045/01), Santrifüj (Sigma 3-30K), Homojenizatör (IKA digital T25), Mikroplaka okuyucu (Multiscan GO, ThermoScientific), -20°C derin dondurucu (Vestel), Etüv (UN160, Memmert), -80°C derin dondurucu (ThermoScientific), Ultra saf su cihazı (Direct-Q 8UV, Merck), Vorteks (Vortex 4, IKA), Otomatik pipetler (ThermoScientific), Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (C-MAG HS7, IKA), pH metre (Radiometer Analytical PHM 210), Su banyosu, Sonikatör (Jeiotech 3T-13AB-239), makas, neşter, jilet, watman süzgeç kağıdı.

3.1.2. Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler ve hazırlanışları

AK (CAS Number 01680) Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) firmasından satın alındı. Çalışmada kullanılan AC % 0,9' luk NaCl kullanılarak 4,16 mg/ml olacak şekilde stok çözelti olarak hazırlandı. Bu stok çözeltiden hayvanların ağırlıkları göz önünde bulundurularak 5 mg/kg/gün olarak intraperitoneal (i.p) olarak haftada 6 gün olmak üzere toplamda 30 gün süreyle verildi. KLA (kimyasal olarak yaklaşık yarı yarıya cis-9, trans-11 KLA ve trans-10, cis-12 KLA' dan oluşan trigliserit esteri) Tonalin®GeneralNutrition Center (GNC, İstanbul, Türkiye) firmasından satın alındı (ürün no:GNC23). KLA için çözücü solvent kullanılmadı. Direkt olarak gavaj aleti kullanılarak oral yolla (o.p) 200 mg/kg/gün, haftada 6 gün 30 gün boyunca verildi.

Bunun dışındaki kimyasal maddeler ATP tayini için Kolorimetrik/lorometrik ATP kiti (K354-100) BioVision firmasından satın alındı. Rotenon, antimisin A, 2,6-dichloorindo fenol (DCIP), deksilubikinol (CoQ), nikotin amid adenin dinukleotit (NAD⁺), redükte nikotin amid adenin dinukleotit (NADH), beta nikotin amid adenin dinukleotit fosfat (NADPH), oksaloasetat, asetil koenzim A, trisodyum isositrat, tiyobarbitürük asit (TBA), 1.1.3.3.tetraethoksiopropan (MDA), 5-5' -Ditiobis 2- nitrobenzoik asit (DTNB), sükröz, tris (Hidroksimetilaminometan hidrojen), triklor asetik asit (TCA), etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), bovin serum albümin, etilen glikoltetraasetik asit (EGTA), triton X-100, guanidin hidroklorür, o-dianisidineklorid, hegzdesil amonyum bromid (HTAB), 1- kloro, 2,4-dinitrobenzen, 2,4-dinitrofenil hidrazin (DNPH), GSH, potasyum siyanür (KCN), nitrat redüktaz, FAD, laktat dehidrogenaz, riboflavin, nitroblue tetrazolyum, metil thiazol tetrazolyum (MTT) Sigma-Aldrich firmasından alınmıştır. Çalışmalarda kullanılan diğer kimyasal maddeler analitik saflıktadır.

3.1.3. Deney hayvanları ve deney grupları

Deneyssel çalışmamızda 250-300 gr ağırlıkta sağlıklı, Spraque Dawley cinsi, 24 adet erkek albino sıçanlar kullanıldı. Deney sürecinde (30 gün) tüm sıçanlar polikarbonat şeffaf kafeslerde standart sıçan yemi ile beslenmiş ve çeşme suyu verilmiştir. Deney hayvanları arasından rastgele seçimle her birinde n=6 sıçan olmak üzere toplam 4 grup oluşturuldu. Bu gruplar;

Grup (K): Bu gruptaki ratlara 30 gün boyunca her gün intraperitoneal (i.p) 1 ml % 0,9' luk NaCl verildi.

Grup (AK): Deney hayvanlarına 30 gün süresince, haftada 6 gün, 5mg/kg i.p olarak AK verildi.

Grup (KLA): Deney hayvanlarına 30 gün süresince, haftada 6 gün, 200 mg /kg oral yolla (gavaj aleti kullanılarak) KLA verildi.

Grup (AK+KLA): Deney hayvanlarına 30 gün boyunca yukarıdaki doz ve sürelerde AK ile birlikte KLA verildi.

Deney aşaması boyunca sıçanların yeme ve içmelerinde hiçbir kısıtlamaya gidilmeden gerekli miktarda yem ve su verilip, temizliğe çok dikkat edilerek 30 günlük deney aşaması bitirildi.

3.2. Metod

3.2.1. Dokularının elde edilmesi ve analizlere hazırlanması

Otuz günlük deney sonunda servikal dislokasyonla öldürülen ratların beyinleri, herhangi bir zedelenme olmaksızın bütün olarak çıkartıldı. Dokular hızlı bir şekilde kurutma kağıdı ile kurutuldu, tartıldı ve kullanılıncaya kadar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' lik derin dondurucuda saklandı.

3.2.2. Beyinden mitokondri izolasyonu

Beyinden mitokondri izolasyonu diferansiyel santrifüj yöntemi kullanılarak yapıldı (Clark ve Nicklas, 1970). Dokular (250 mM sükroz ve 0,5 mM K^+EGTA içeren 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) tamponunda homojenize edildi. Homojenizatlar 1 000 g de 5 dk. $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de santrifüj edildi. Süpernatantın bir kısmı ATP tayini için ayrıldı. Kalan süpernatantlar alınarak 7 000 g de 10 dk. daha santrifüj edildi. Daha sonra pellet aynı tamponla sulandırılarak önce 1 000 g de daha sonra da 7 000 g de santrifüj edildi. Ham mitokondriyal pellet 5 ml % 3 Ficoll tamponu ile (% 3 Ficoll, 250 mM sükroz, 0,5 mM K^+EGTA , 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) süspansiyon edildi. Cam çubuklar kullanılarak mitokondriyal pelletin iyice dağılması sağlandı. Daha sonra bunun üzerine 10 ml % 6 Ficoll tamponu (% 6 Ficoll, 250 mM sükroz, 0,5 mM K^+EGTA , 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) ilave edildi. Tüpler oda ısısında yaklaşık 30 dk. bekletildi. Bu bekleme sonucunda çok belirgin bir tabakalaşma görüldü ve tüpler fazla sarsılmadan 11 500 g de 30 dk. $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve mitokondriyal pellet tekrar (250 mM sükroz ve 0,5 mM K^+EGTA içeren 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) tamponunda süspansiyon edilerek bu kez 12 500 g de 30 dk. $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de santrifüj edildi. Süpernatant ayrı tüplerde saklandı (sitzozolik fraksiyon) ve kalan pellet yukarıdaki tampon ile sulandırılarak protein tayini yapıldı (Lowry, Rosebrough, Farr ve Randall, 1951). Protein miktarı 50-70 mg/ml protein olacak şekilde $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de saklandı.

Bu aşamadan sonra pellet kısmında kalan mitokondriyal fraksiyon ile çalışıldı. Mitokondriyal fraksiyonlar B tamponu (250 mM sükroz, 10 Mm Tris-HCl, 0,1 mM EGTA, pH 7,6) kullanılarak 1 000 ve 7 000 g de 15 dk. santrifüj edilerek yıkandı. B tamponu ile yıkama sırasında cam çubuklar kullanılarak mitokondriyal pelletin iyice dağılması ve yıkaması sağlandı. Bu mitokondrilerin yıkama işlemi 2 kez gerçekleştirildi. Elde edilen yıkamış pellet daha sonra az miktarda tampon B ile süspansiyon edildi. Bu süspansiyonda

protein tayini yapıldı (Lowry ve diğerleri, 1951). Protein miktarı 60-70 mg/ml olacak şekilde ayarlandı ve mitokondriyal fraksiyon kullanılıncaya kadar -80 °C' de derin dondurucuda saklandı.

3.2.3. Mitokondriyal oksidatif stresin belirlenmesi

Mitokondriyal süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi

Mn-SOD aktivitesi (EC 1.15.1.1) Madamanchi ve arkadaşlarına göre yapıldı (Madamanchi, Donahue, Cramer, Alscher ve Pedersen, 1984: 95-103). Reaksiyon karışımı fosfat tamponu (0,05 M, pH 7) 0,1 mM EDTA, 13 mM methionin, 2 µM riboflavin, nitroblue tetrazolium (NBT) ve enzim ekstraktı içermektedir. Karışım karıştırılarak karanlık bir ortamdaki floresans ışığa (15-W) 30 dk. maruz bırakıldı. Işık kapatıldı, reaksiyon durduruldu. Numunelerin absorbansları ışığa maruz bırakılmayan köre karşı 560 nm de okundu. Işık ve riboflavin varlığında 560 nm' de NBT' nin % 50 inhibisyonuna karşılık gelen enzim 1 Ü olarak tanımlandı. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

Glutatyon peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

GPx aktivitesi Flohé ve Gunzler' e göre yapıldı (Flohe ve Gunzler, 1984). Reaksiyon karışımı fosfat tamponu (0,05 M, pH 7), 1 mM EDTA, 0,2 mM NADPH, 1 mM NaN₃, GSH, 1U/ml GR ve substrat olarak H₂O₂ içermektedir. 340 nm' de NADPH' daki azalma izlenmektedir. Enzim aktivitesi NADPH için molar absorblama katsayısı $\epsilon=6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar nmol okside NADPH/dk/mg olarak ifade edildi.

Redükte glutatyon düzeyinin belirlenmesi

Dokulardaki GSH düzeyi Moron ve arkadaşlarına göre yapıldı (Moron, Depierre ve Mannervik, 1979). Reaksiyon karışımı fosfat tamponu (0,15 M, pH 7), 5 mM EDTA ve DTNB' den oluşmaktadır. Reaksiyon sonucunda oluşan sarı renkli bileşik 5-thio-2-nitrobenzoik asit 412 nm' de spektrofotometrik olarak izlenmektedir. 5-thio-2-nitrobenzoik asit için molar absorblama katsayısı $\epsilon=13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak hesaplama yapıldı ve nmol/mg protein olarak ifade edildi.

Lipit peroksidasyon düzeyinin belirlenmesi

Doku LP seviyesi Esterbauer ve Chessman' a göre yapıldı (Esterbauer ve Chessman, 1990). Uygun miktarda mitokondriyal fraksiyon 1 hacim % 20 TCA ve 2 hacim TBA (% 0,67) ile karıştırılarak 45 dk. 95 °C' lik su banyosunda bekletildi. Buzda soğutulan örnekler oda ısısında 10 dk. 3 000 g de santrifüj edildi. Temiz süpernatantlar 535 nm' de spektrofotometrede köre karşı okundu. LP ürünlerinin % 99' unu MDA (malondialdehit) oluşturmaktadır ve MDA için molar absorblama katsayısı $\epsilon=1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak hesaplama yapıldı ve sonuçlar nmol MDA/mg protein olarak ifade edildi.

Protein karbonil miktarının belirlenmesi

PK miktarının belirlenmesinde PK gruplarının DNPH ile reaksiyonları esas alınarak çalışılmıştır (Levine ve diğerleri, 1990). Mitokondriyal fraksiyonlar üzerine olası DNA kontaminasyonunu ortadan kaldırmak amacı ile % 10 olacak şekilde streptomisin sülfat eklendi ve 11 000 g' de 4°C' de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatantlar alınarak 0,5 ml DNPH ilave edildi, 15 dakikada bir vortekslenerek oda ısısında, karanlıkta 1 saat bekledi. Proteinlerin çökmesi için 0, 5 ml % 20' lik TCA ilave edildi. Karıştırıldıktan sonra 11 000 g' de 4°C' de 5 dk. santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Pellet 3 kez etanol:etil asetat (1:1, v/v) ile yıkanarak serbest DNPH ve lipid kontaminantları uzaklaştırıldı. En son pellet 6 M guanidine hidroklorit içinde 37 °C' de 1 saat saat bekletilerek çözünmesi sağlandı. PK miktarı dinitrofenilhidrazinin 370 nm' deki molar absorpsiyon katsayısı $\epsilon=22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ esas alınarak ölçüldü. Sonuçlar nmol DNPH /mg protein olarak ifade edildi.

Mitokondriyal oksidatif fosforilasyon ve TCA enzimlerinin belirlenmesi

Mitokondriyal oksidatif fosforilasyon enzimleri tayin edilmeden önce mitokondri membranına tutunmuş bu enzimlerin serbest hale getirilebilmesi için hidrofobik membran proteinlerinin izolasyonunda etkili fakat diğer deterjanlara göre enzim aktivitelerini daha iyi koruyan non-iyonik bir deterjan olan dodesil- β -D-maltozid kullanıldı. Mitokondriyal fraksiyon üzerine 1/10 olacak şekilde bu deterjandan ve % 1 olacak şekilde proteaz inhibitör kokteyl ilave edildi.

Belirli aralıklarla yaklaşık 10 dakika orta hızda su banyosunda sonike edildi. Final protein konsantrasyonu Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 7,5) kullanılarak 5 mg/ml olacak şekilde ayarlandı ve 10 000 g' de 4 °C' de 15 dk. santrifüj edilerek süpernatant ayrıldı.

Komplex I (NADH ubikinon oksidoredüktaz veya NADH dehidrogenaz) aktivitesinin belirlenmesi

Komplex 1 aktivitesi Janssen ve arkadaşlarına göre yapıldı (Janssen ve diğerleri, 2007). Reaksiyon karışımı fosfat tamponu (0,025 M, pH 7,2), 1 µM antimisin A, 3 g/L BSA, 2 mM KCN, 5 mM MgCl₂, ubikinon, 80 µM 2,6-diklorofenolindofenol (DCIP), 0,2 mM NADH ve mitokondriyal proteinden oluşmaktadır. Absorbans 600 nm' de 2 dk. boyunca izlenir. DCPIP için $\epsilon=19,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar µmol DCIP/dk/mg protein olarak ifade edildi.

Komplex II (Süksinat dehidrogenaz) aktivitesinin belirlenmesi

Komplex II aktivitesi de Janssen ve arkadaşlarına göre yapıldı (Janssen ve diğerleri, 2007). Reaksiyon karışımı fosfat tamponu (0,050 M, pH 7,2), 3 g/L BSA, 1 µM antimisin A, 2 mM EDTA, 2 mM KCN, 1 µM rotenon, 20 mM sodyum süksinat, ubikinon ve mitokondriyal proteinden oluşmaktadır. Reaksiyon DCIP' in ilavesi ile başlatıldı ve spektrofotometrik olarak 600 nm' de 4 dk. izlendi. Sonuçlar µmol DCIP/dk/mg protein olarak ifade edildi.

Komplex IV (sitokrom oksidaz veya sitokrom aa3) aktivitesinin belirlenmesi

Kompleks IV aktivitesi çalışılmadan önce sodyum dithionat kullanılarak ferrisitokrom C' den 1 mM' lık ferrositokrom C çözeltisi elde edildi (Spinazzi, Casarin, Pertegato, Salviati ve Angelini, 2012). Bunun için ferrisitokrom C fosfat tamponunda çözüldü (20 mM, pH 7) ve 1 ml hacim için pipetin ucu 5-10 tane sodyum dithionat ilave edildi. Solisyonun rengi kahverenginden turuncu-pembeye dönünceye kadar vortexlendi.

Kompleks IV aktivitesi Trounce ve arkadaşlarına göre yapıldı (Trounce, Kim, Jun ve Wallace, 1996). 1 ml ferrositokrom C uygun miktardaki mitokondriyal protein ile karıştırıldı. Mitokondriyal protein kullanılmadan önce % 0,5 Tween 80 içeren fosfat

tamponunda birkaç kez dondurulup çözüldü. 550 nm' de absorbans 4 dk. ölçüldü ve sonuçlar μmol okside stokrom C/dk/mg protein olarak ifade edildi.

İzositrat dehidrogenaz aktivitesinin belirlenmesi

NADP⁺ bağımlı mitokondriyal ISD (mID) aktivitesi Fatania ve arkadaşlarına göre yapıldı (Fatania, Nassar ve Sidhan, 1993). Reaksiyon karışımı Tris tamponu (0,040 M, pH 7,4), 2 mM NADP⁺, 2 mM MgCl₂, izositrat ve bir miktar mitokondriyal proteinden oluşmaktadır. Reaksiyon 25 °C' de 340 nm' de okundu, enzim aktivitesi NADP⁺ için $\epsilon = 6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar μmol redükte NADP⁺/dk/mg olarak ifade edildi.

Alfa ketoglutarat dehidrogenaz aktivitesinin belirlenmesi

KGDH aktivitesi Lucas ve arkadaşlarının metoduna göre yapıldı (Lucas, Aryal, Szweda, Koch ve Leinwand, 2003). Reaksiyon karışımı fosfat tamponu (0,025 M, pH 7,2), 5 mM MgCl₂, 40 mM rotenon, alfa-ketoglutarat, 40 μM asetilkoenzim A, 0,2 mM, tiaminpirofosfat, 0,5 mM NAD⁺ ve sonike edilmiş mitokondriyal proteinden oluşmaktadır. Reaksiyon oda ısısında 340 nm' de NAD⁺' nın redüksiyonu spektrofotometrik olarak izlendi. Sonuçlar μmol redükte NAD⁺ /dk/mg protein olarak ifade edildi.

Malat dehidrogenaz aktivitesinin belirlenmesi

MD aktivitesi Gelpi ve arkadaşlarına göre belirlendi (Gelpi, Dordal, Montserrat, Mazo ve Cortes, 1992). Reaksiyon karışımı fosfat tamponu (0,1 M, pH 7,4), 0,14 mM NADH, oksaloasetat ve mitokondriyal proteinden oluşmaktadır. Reaksiyon 30 °C' de 340 nm' de NAD⁺' nın redüksiyonu spektrofotometrik olarak izlendi. Sonuçlar μmol redükte NAD⁺ /dk/mg protein olarak ifade edildi.

ATP seviyesinin belirlenmesi

ATP tayini ticari olarak satılan kolorimetrik/florometrik ATP tayin kiti kullanılarak yapıldı. Absorbanslar 570 nm' de numunelerin 30 dk' lık inkübasyonunun ardından mikropalak cihazında (Thermo, Multiskan GO) okundu. ATP kitindeki önergelere uygun olarak

hazırlanan ATP standart grafiğinden yararlanılarak konsantrasyonlar hesaplandı ve sonuçlar nmol/mg protein olarak ifade edildi.

Mitokondrial metabolik fonksiyonun belirlenmesi

Mitokondriyal metabolik fonksiyonun belirlenmesinde Berridge ve Tan' ın yöntemi kullanıldı (Berridge ve Tan, 1993). Kısaca mitokondri örnekleri 1 ml tampon (Mannitol-sükroz-HEPES, 20 mM sodyum süksinat, 1 mM NADH, pH 7,4) içinde inkübe edildi. Bu karışıma 15 mikrolitre MTT (5 mg/ml) ilave edildi ve 370 C⁰ de 1 saat inkübe edildi. Formazan kristaller sodyum dodesil sülfat-dimetil sülfoksit tamponunda saf suyla % 45' lik dimetil sülfoksit hazırlandı ve bu % 10' luk sodyum dodesil sülfatla birleştirilerek pH 4,7' ye ayarlandı. Çözeltinin absorbansı 570 nm' de absorbans değışimleri okundu. Sonuçlar ΔOD/ mg protein olarak ifade edildi.

İstatiksel analiz

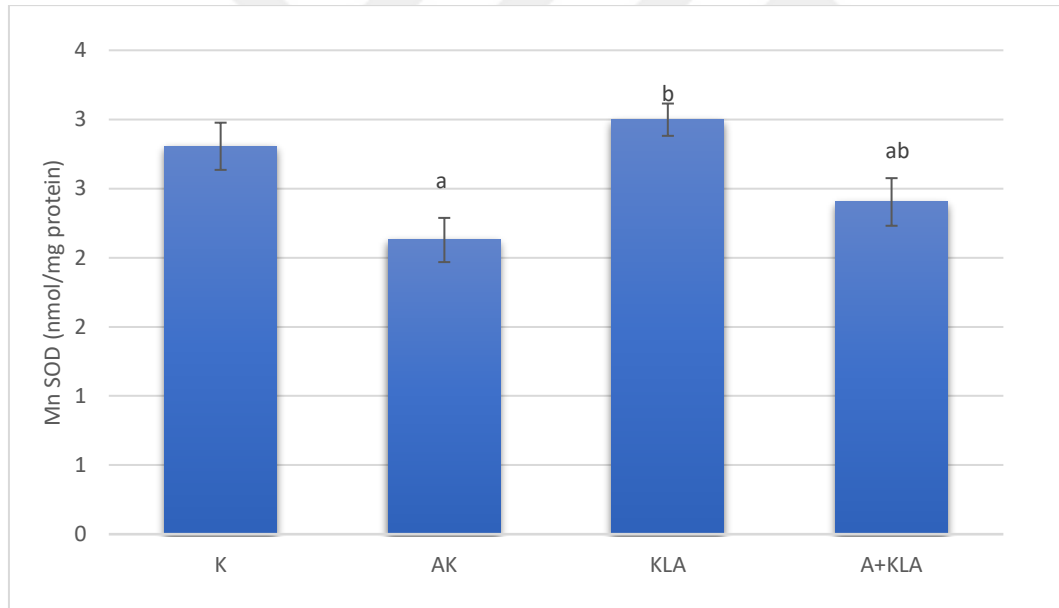
Çalışmamız sonucu deney gruplarından elde edilen verilerin değlendirilmesinde "SPSS 20,0 for Windows" paket programı ile "OneWayAnnova-Tukey" testi kullanılmıştır. Bütün uygulanan testlerde güven aralığı % 95 olup, p<0,05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Akrolein ve Konjuge Linoleik Asitin Beyin Mitokondrial Fraksiyonunda Enzimatik ve Enzimatik Olmayan Oksidatif Stres Parametreleri Üzerine Etkisi

4.1.1. Mn-süperoksit dismutaz üzerine etkisi

Şekil 4.1’ de gösterildiği gibi, AK verilen grupta Mn-SOD kontrol grubu ile kıyaslandığında % 24,28 oranında azalma göstermiştir ($p<0,05$). KLA ve AK+KLA gruplarında kontrol grubuna göre önemli farklar görülmemiştir ($p>0,05$). AK verilen grupla kıyaslandığında KLA ve AK+KLA gruplarında sırası ile % 41,03 ve % 9,43 oranında istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlemlenmiştir ($p <0,05$) (Şekil 4.1).

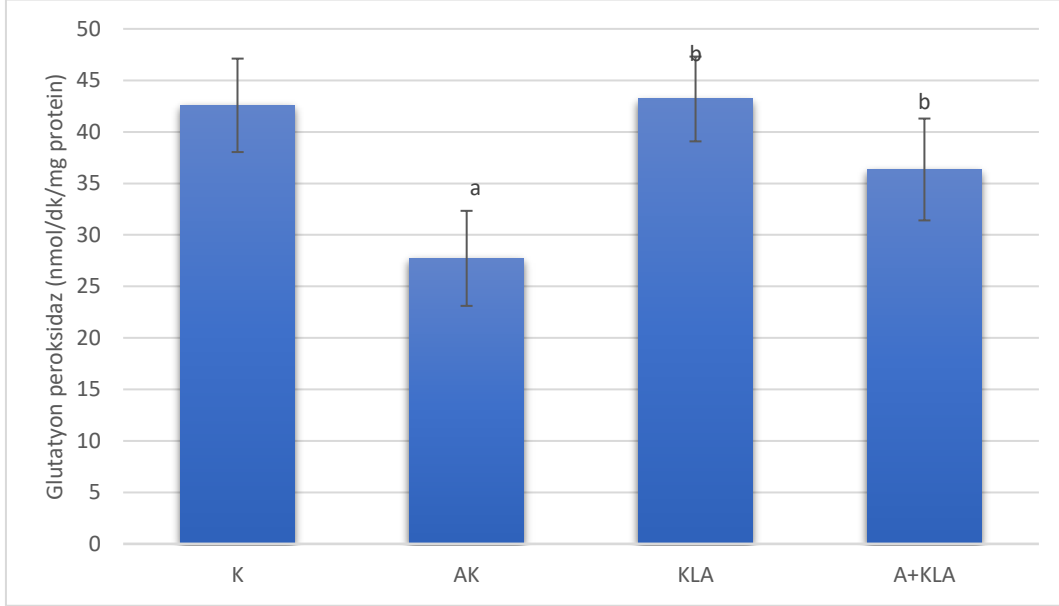


Şekil 4.1. Grupların beyinde MnSOD aktivitesi üzerine etkileri

4.1.2. Gpx üzerine etkisi

Önemli bir mitokondri enzimatik antioksidanı olan Gpx’ da da AK etkisi ile MnSOD gibi ile % 35,94 oranında azalma görülmüştür ($p<0,05$). KLA ve AK+KLA gruplarında kontrol grubuna göre önemli farklar görülmezken ($p>0,05$), AK verilen grupla kıyaslandığında KLA ve AK+KLA gruplarında sırası ile % 55,8 ve % 33,25 oranında istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Kontrol ve AK+KLA grubu arasında istatistiksel olarak

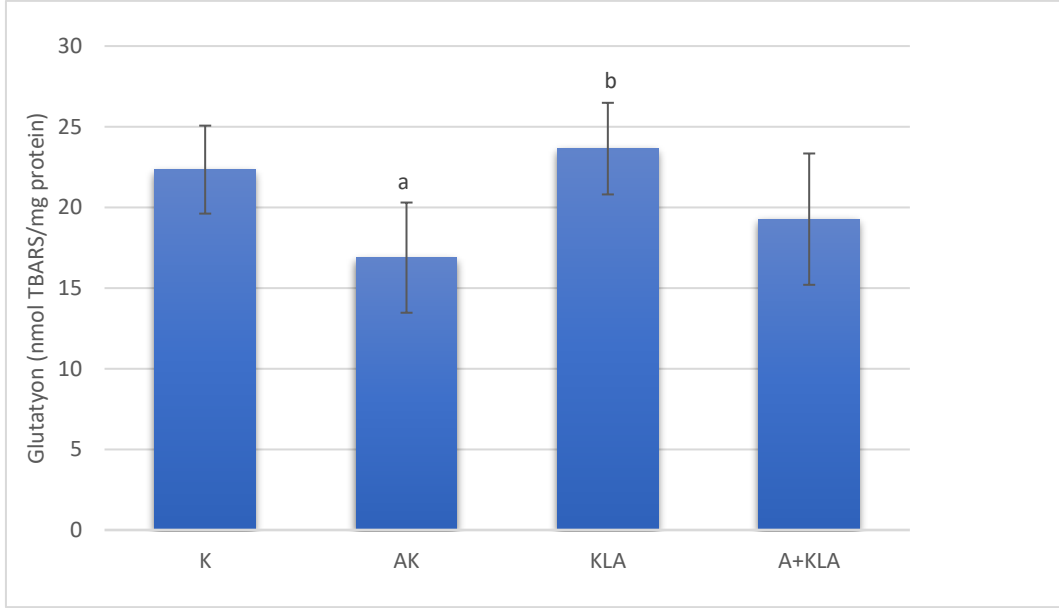
anlamli farklar bulunmamıştır; AK etkisi ile azalan Gpx aktivitesi KLA verilmesi ile normale dönmüştür (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Grupların beyinde Gpx aktivitesi üzerine etkileri

4.1.3. Redükte glutatyon üzerine etkisi

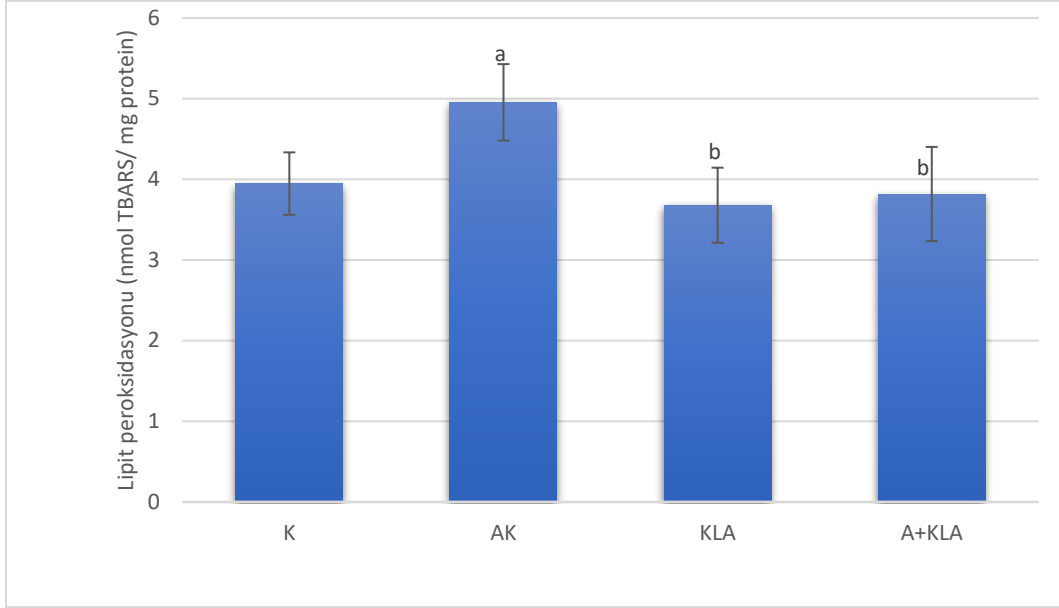
Önemli bir nonenzimatik antioksidan olan GSH' da AK etkisi ile % 24,42' lük istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür ($p < 0,05$). Beyin GSH miktarında KLA ve AK+KLA gruplarında kontrol grubuna göre önemli farklar görülmemiştir ($p > 0,05$). AK verilen grupla kıyaslandığında KLA grubunda % 40,04' lük anlamlı artış ($p < 0,05$) gözlemlenmesine rağmen AK+KLA grubundaki % 14,15' lük artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). Beyin dokusunda AK etkisi ile azalan GSH miktarı KLA etkisi ile normale döndüğü gözlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Grupların beyinde GSH miktarı üzerine etkileri

4.1.4. Lipit peroksidasyonu üzerine etkisi

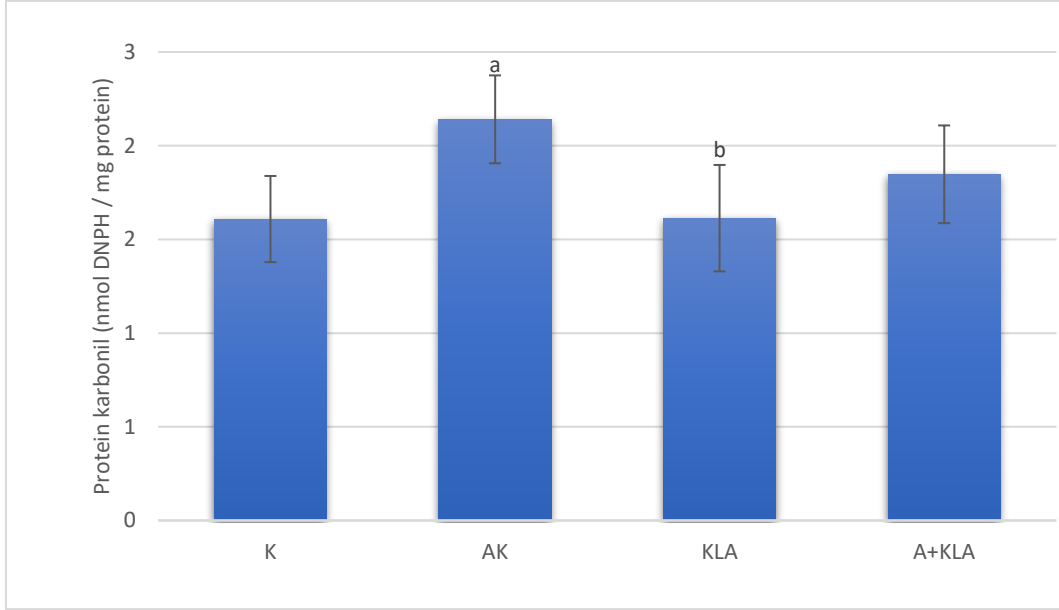
Serbest radikal hasarının en önemli belirteçlerinden biri olan lipit peroksidasyon seviyesi AK verilen grupta % 25,63 oranında anlamlı artış görülmüştür ($p < 0,05$). Bu durum verilen dozlarda AK' in beyinde önemli bir oksidatif stres hasarına neden olduğunu göstermektedir. Beyin LPO miktarında KLA ve AK+KLA gruplarında kontrol grubuna göre önemli farklar görülmemiştir ($p > 0,05$). AK verilen grupla kıyaslandığında KLA ve A+KLA gruplarında sırası % 25,85 ve % 23,03 oranında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). Kontrol grubu ile AK+KLA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmaması AK ile birlikte KLA verilmesinin AK ile oluşan LPO hasarını önemli ölçüde azalttığını göstermektedir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Grupların beyinde LPO miktarı üzerine etkileri

4.1.5. Protein karbonil miktarı üzerine etkisi

AK etkisi ile beyin dokusunda LPO miktarında olduğu gibi PK miktarında da anlamlı artış görülmüştür. AK verilen grupla kontrol grubu kıyaslandığında % 33,75' lik anlamlı artış görülmüştür ($p < 0,05$). Beyin PK miktarında KLA ve AK+KLA gruplarında kontrol grubuna göre önemli farklar görülmemiştir ($p > 0,05$). AK verilen grupla kıyaslandığında A+KLA grubunda % 24,76 oranında istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). LPO miktarında olduğu gibi kontrol grubu ile AK+KLA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmaması AK ile birlikte KLA verilmesinin AK ile oluşan PK hasarını ortadan kaldırdığını göstermektedir (Şekil 4.5).

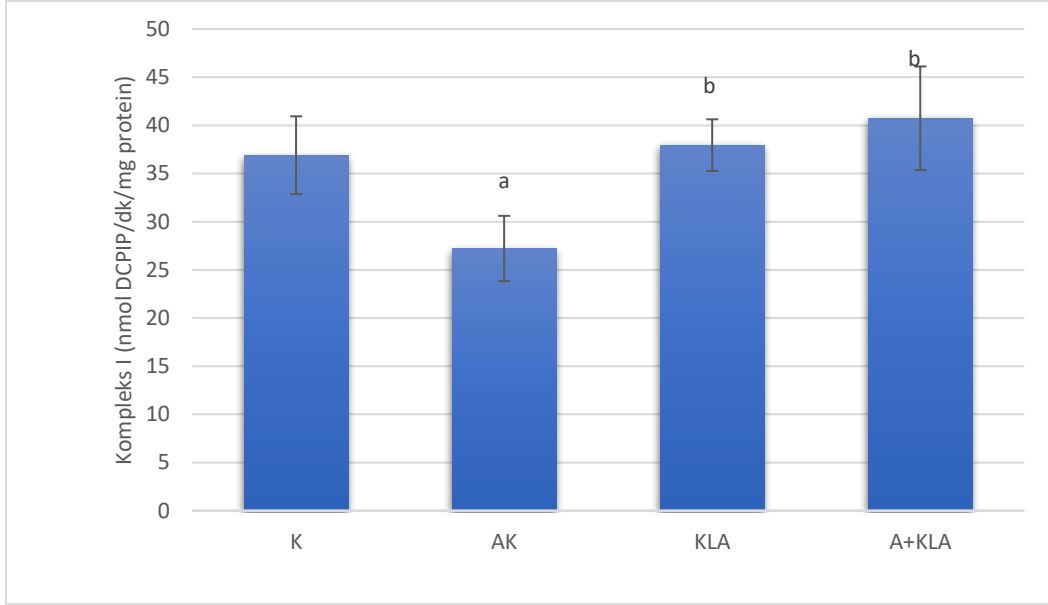


Şekil 4.5. Grupların beyinde protein karbonil miktarı üzerine etkileri

4.2. Akrolein ve Konjuge Linoleik Asitin Beyin Mitokondrial Oksidatif Fosforilasyon ve Trikarboksilik Asit Döngüsü Enzimleri ve ATP Üzerindeki Etkileri

4.2.1. Kompleks I üzerine etkisi

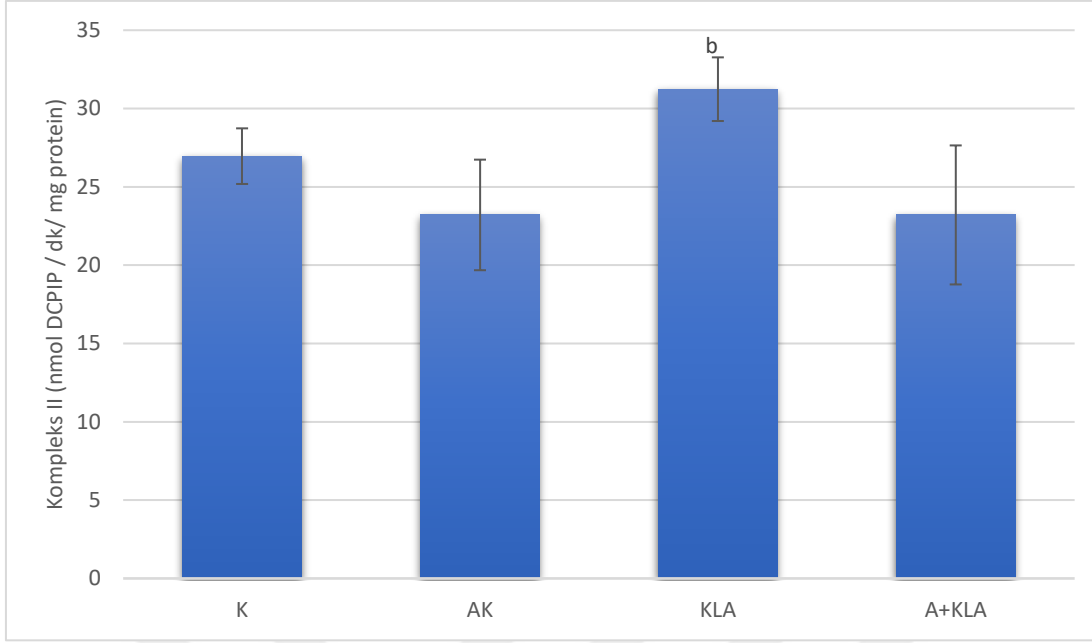
AK verilen grupla kontrol grubu kıyaslandığında AK verilen grupta Kompleks I aktivitesinde % 26,23' lük önemli bir düşüş görülmüştür ($p < 0,05$). AK verilen grupla kıyaslandığında AK+KLA grubunda % 49,66 oranında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). Hatta kontrol grubu ile karşılaştırıldığında AK+KLA grubunda istatistiksel olarak anlamlı ($p > 0,05$) olmasa bile % 10,4' lük artış görülmüştür. Bu durum AK etkisi ile baskılanmış kompleks I aktivitesinin KLA ile birlikte verilmesi ile arttığını göstermektedir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Grupların beyinde Kompleks I aktivitesi üzerindeki etkileri

4.2.2. Kompleks II üzerine etkisi

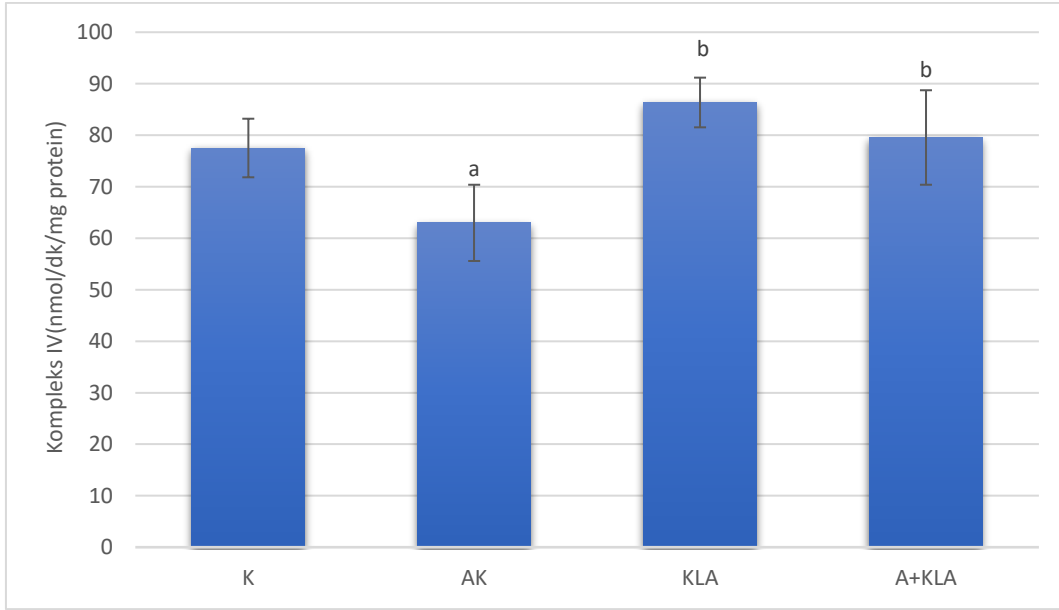
AK verilen grupla kontrol grubu kıyaslandığında AK verilen grupta Kompleks II aktivitesinde % 13,94' lik istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma meydana gelmiştir ($p>0,05$). Kompleks II aktivitesinde KLA ve AK+KLA gruplarında kontrol grubuna göre önemli farklar görülmemiştir ($p>0,05$). AK verilen grupla kıyaslandığında KLA ve AK+KLA gruplarında sırası ile % 34,61 anlamlı artış gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). AK etkisi ile azalan kompleks II aktivitesi KLA proteinle birlikte verildiğinde hiçbir etki etmediği ve AK ile aynı etkiyi verdiği görülmüştür (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Grupların beyinde Kompleks II aktivitesi üzerindeki etkileri

4.2.3. Kompleks IV üzerine etkisi

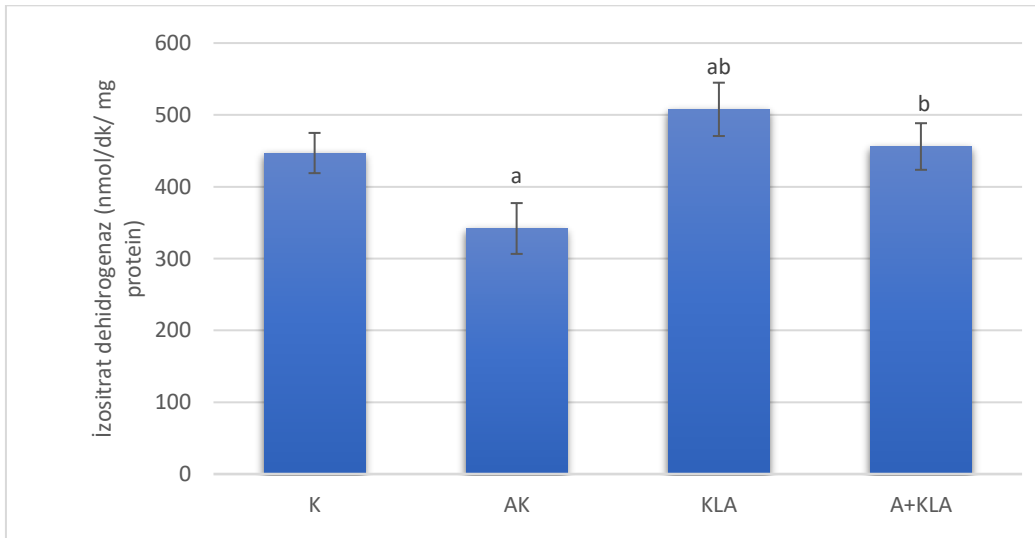
Kompleks IV aktivitesinde kontrol grubu ile kıyaslandığında AK etkisi ile istatistiksel olarak anlamlı azalm (% 23,82) olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). AK verilen grupla kıyaslandığında KLA ve AK+KLA gruplarında sırası ile % 37,12 ve % 26,32 oranında istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). Kontrol grubu ile AK+KLA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). dolayısı ile Kompleks II aktivitesinde olduğu gibi kompleks IV aktivitesinde de AK etkisi ile kompleks IV aktivitesinde görülen azalma KLA etkisi ile ortadan kalkmış ve normale dönmüştür (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Grupların beyinde Kompleks IV aktivitesi üzerindeki etkileri

4.2.4. İzositrat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkisi

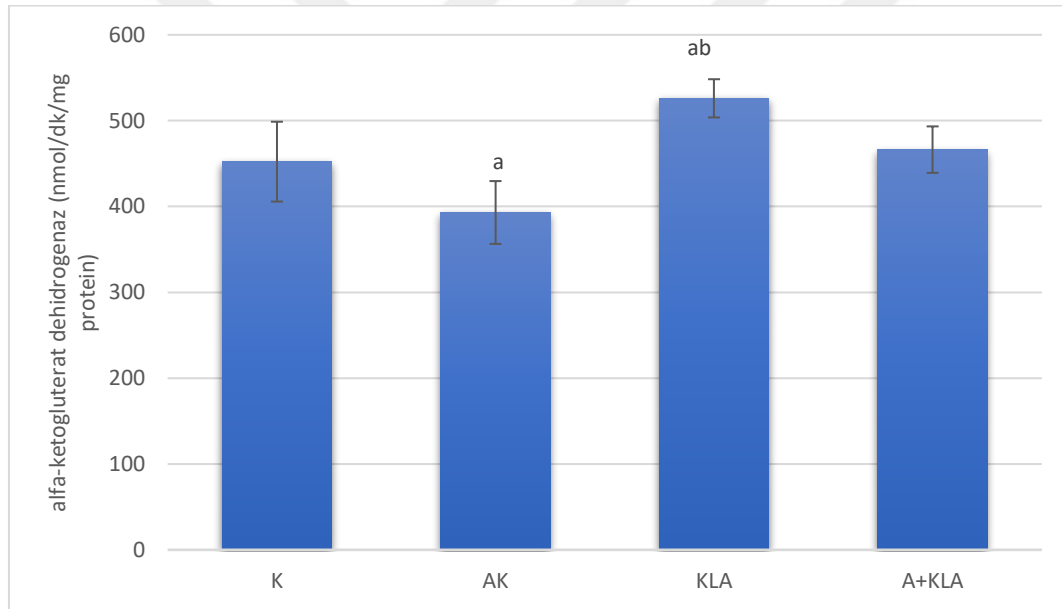
ISD aktivitesinde AK etkisi ile % 23,51' lik istatikselsel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür ($p < 0,05$). KLA grubunda kontrol grubuna göre % 13,65' lik istatikselsel olarak anlamlı bir artış görülmüştür ($p < 0,05$). AK verilen grupla kıyaslandığında KLA ve AK+KLA gruplarında sırası ile % 48,51 ve % 33,38 istatikselsel olarak anlamlı artışlar gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). Kısaca AK etkisi ile ISD aktivitesinde görülen azalma KLA ile birlikte verildiğinde ortadan kalkmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Grupların beyinde izositrat dehidrogenaz aktivitesi üzerindeki etkileri

4.2.5. Alfa ketoglutarat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkisi

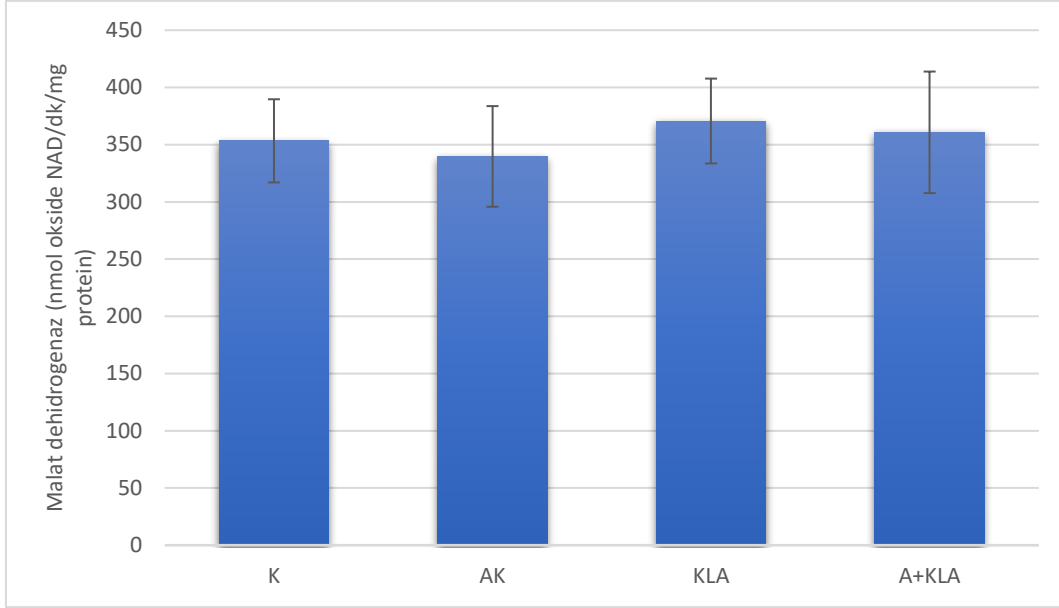
KGDH aktivitesinde AK etkisi ile % 13,29 oranında istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlenmiştir ($p<0,05$). ISD aktivitesinde olduğu gibi burada da KLA proteinin tek başına verilmesi kontrol grubuna göre KGDH aktivitesinde anlamlı olarak % 16,37' lik artışa neden olmuştur ($p<0,05$). KLA grubu ile AK' in tek başına verildiği grup kıyaslandığında yine KLA grubunda anlamlı bir aktivite artışı görülmüştür ($p<0,05$). AK verilen grupla kıyaslandığında AK+KLA grubunda % 18,64 oranında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Kontrol grubu ile AK+KLA grubu arasında anlamlı fark bulunmamıştır; bu nedenle KLA, AK etkisi ile baskılanan KGDH aktivitesinin tekrar normale dönmesine neden olmuştur (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Grupların beyinde alfa ketoglutarat dehidrogenaz aktivitesi üzerindeki etkileri

4.2.6. Malat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkisi

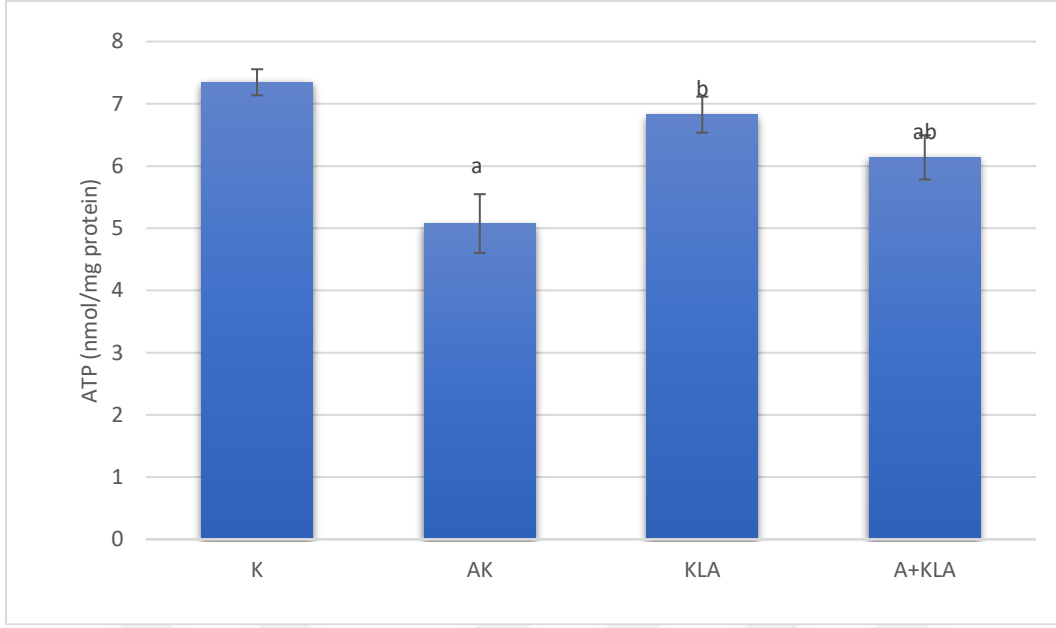
Değerlendirdiğimiz diğer oksidatif fosforilasyon ve Krebs döngüsü enzimlerinin aksine beyinde AK, KLA ve her ikisinin birlikte verilmesi MD aktivitesinde kontrol grubuna göre anlamlı değişiklikler yapmadığı görülmüştür ($p>0,05$) (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Grupların beyinde malat dehidrogenaz aktivitesi üzerindeki etkileri

4.2.7. Beyin ATP miktarı üzerine etkisi

AK etkisi ile birçok oksidatif fosforilasyon ve dehidrogenaz aktivitesinde olduğu gibi ATP miktarının azalmasına da neden olmuştur. Kontrol grubu ile kıyaslandığında bu azalmanın % 30,92 oranında anlamlı bir azalma olduğu görülmektedir ($p < 0,05$). AK verilen grupla kıyaslandığında KLA ve AK+KLA gruplarında sırası ile % 34,51 ve % 21,6 istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). Kontrol grubu ile AK+KLA grubu kıyaslandığında % 16,34' lük anlamlı bir azalma olduğu görülmektedir ($p < 0,05$). Diğer birçok parametrenin aksine KLA burada AK ile azalan ya da değişen parametreleri düzeltmeye yeterli olmamıştır. Beyin dokusunda AK ile azalan ATP miktarı KLA ile tam olarak normale dönmediği görülmüştür (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Grupların beyinde ATP miktarı üzerindeki etkileri

5. TARTIŞMA

Oksidatif stres nöral hücre ölümlerinin ve yaşlanmaya bağlı sinir sistemi hastalıklarının temelini oluşturmaktadır. Mitokondri ROT ve reaktif nitrojen türlerinin en fazla olduğu organeldir. Bu nedenle Parkinson, Alzaymır gibi nörodejeneratif hastalıklar mitokondriyal fonksiyonların bozulması, artan oksidatif stres ve hücrede oksidasyona uğrayan proteinlerin artışı ile direkt bağlantılıdır (Naoi ve diğerleri, 2005).

Çalışmamızda 5 mg/kg(haftada 6 gün) 30 gün boyunca AK' nin rat beyin dokusunda nonenzimatik antioksidan olan GSH seviyesini azalttığını, buna karşın lipit hasarı belirteci olan LP ve protein hasarını yani PK miktarını artırdığını gözlemledik. Deneysel olarak Alzaymır oluşturulmuş sıçanlarda uygulanan AK miktarı ile orantılı olarak sinaptosomal membran proteininin oksidasyona uğradığı yani PK miktarının arttığı görülmüştür. Bir GSH öncülü olan antioksidan N-asetilsistein verilmesi AK ile birlikte artan PK miktarını azalttığı rapor edilmiştir (Pocernich, Racine, Lauderback ve Butterfield, 2001).

AK mitokondriyal proteinlerin lizin, histidin ve sistein amino asitlerine Schiff bazı ile bağlanarak PK grupları oluştururlar. Dolayısı ile bu proteinlerdeki konformasyonel değişiklikler mitokondriyal fonksiyonların bozulmasına neden olur (Petersen ve Doorn,2004). Beyin dokusu, ROS' ne özellikle hassas olan çoklu doymamış yağ asitlerini diğer dokulara oranla daha fazla içerir. Dolayısı ile LP ve PK beyin mitokondrileri için kaçılmazdır. AK' nin mitokondriyal oksidatif strese neden olarak oksidatif fosforilasyonu ve ATP miktarını baskıladığı bilinmektedir (Hamann ve Shi, 2009). Subkronik AK toksitesine maruz kalan (3 mg/kg/ gün) sıçan serebral kortekslerinde lipit peroksidasyon miktarı artarken GSH miktarının önemli derecede düştüğü gözlemlenmiştir (Rashedinia, Lari, Abnous ve Hosseinzadeh, 2013). AK' nin oksidatif strese neden olarak nöral doku mitokondrilerinde hasara neden olduğu ve antioksidanların spinal kord dokusunda AK' le indüklenen bu oksidatif hasarı ortadan kaldırdığı rapor edilmiştir (Luo ve Shi, 2004).

Çalışmamızda AK etkisi ile TCA enzimlerinin ve kompleks IV (sitokrom oksidaz) enzim aktivitesinin baskılandığını gördük. Literatürde bizim bulgularımızı destekleyici *in vivo* ve *in vitro* bazı çalışmalarla desteklenmektedir. Kırkbeş gün boyunca (2,5 mg/kg) AK verilen rat karaciğer mitokondrilerinin membran yapısının bozulduğu, LP' nun arttığı ve TCA enzim

aktivitelerinde değişiklikler olduğu gözlemlenmiştir (Arumugam, Thanislass, Rangunath, Niranjali Devaraj ve Devaraj, 1999).

Çalışmamızda ETZ enzimlerinin AK ile değişik oranlarda baskılandığı özellikle kompleks I ve kompleks IV' ün anlamlı derecede azaldığını gözlemledik. Benzer sonuçlar *in vitro* beyin mitokondrilerinde de gözlemlenmiştir. Picke ve Montine (2011) yaptıkları çalışmalarda *in vitro* sıçan beyin mitokondrilerinde AK etkisi ile ETZ enzimlerinin baskılandığını rapor etmişlerdir (Picklo ve Montine, 2001). Kompleks I inhibisyon toksisitesinin mekanizması muhtemelen, mitokondriyal solunum zincir bloğunun neden olduğu mitokondri kaynaklı oksidatif stresten kaynaklanır. Oksidatif stres, aşırı ROT üretimi ile sınırlı antioksidan savunma arasındaki dengesizliğin bir sonucudur. Mitokondri, ROT' nin çoğunu oksidatif fosforilasyonun bir yan ürünü olarak üretir (Morais ve De Strooper, 2010).

In vitro sıçan beyin mitokondrilerine uygulanan AK' nin (3 mikromolar) mitokondrilerde PK miktarını artırdığını ve ETZ enzimlerinden kompleks I ve Kompleks II aktivitesinde azalmaya neden olarak mitokondriyal fonksiyonları bozduklarını göstermişlerdir.

AK' ye maruz bırakılan insan sinir hücreleri (PC12)' nin mitokondrilerinde oksidatif stresin arttığı, süksinat dehidrogenaz aktivitesinin ve ATP miktarının azaldığı görülmüştür. Ayrıca mitokondriyal membran potansiyelinde belirgin bir düşme kaydedilmiştir (Luo, Robinson ve Shi, 2005).

AK' nin beyin mitokondrilerinde pürivat dehidrogenaz ve KGDH, aktivitelerinde doza bağlı olarak azalmaya neden olduğu görülmüştür (Pocernich ve Butterfield, 2003). Bu bulgular bizim sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir. KGDH mitokondride NAD⁺ dan NADH oluşturan yeğane enzimlerden biridir. Bu enzimde meydana gelen azalma TCA döngüsünde azalan NADH miktarı anlamına gelmektedir. Bu durum ise ETZ' den gönderilen protonların azalması ve sonuç olarak ATP seviyesinin azalmasına neden olacaktır. Çalışmamızda AK etkisi ile ATP seviyesindeki azalmanın nedeni TCA döngünde NADH oluşturan enzimler KGDH ve MD enzimlerindeki azalmadan kaynaklandığını söylenilebilir.

Çalışmamızda sıçanlara verilen 5mg/kg (haftada 6 gün) 30 gün boyunca verilen AK' nin nonenzimatik antiokidan olan GSH seviyesini azalttığını buna karşın lipit hasarı belirteci olan LP ve protein hasarını yani PK miktarını artırdığını gördük. Aynı zamanda enzimatik

antioksidanlar mitokondriyal Mn-SOD ve GPx enzim aktivitelerini de önemli ölçüde baskıladığını gördük. Muhtemelen bütün bunların sonucu olarak diğer bir ifade ile mitokondriyal lipid ve proteinlerin oksidatif hasara uğraması ile mitokondriyal fonksiyonlarında bozulduğu görülmektedir. Mitokondriyal fonksiyonlar dendiğinde hiç kuşksuz biyoenergetik mekanizmaların bozulması yani besin maddelerinin mitokondride yakılarak su ve oksijene dönüşümünde problemler olduğu akla gelmektedir. ETZ' nin elemanları olan kompleks (I-IV) de ve TCA döngüsü enzimlerinde benzer şekilde baskıladığı görülmüştür.

Çalışmamızda ratlara 200 mg/kg (haftada 6 gün) 30 gün süresince verilen KLA' in AK' nin beyin mitokondrilerinde neden olduğu oksidatif stresi azalttığı, oksidatif fosforilasyon enzimleri ve TCA enzimlerini normal hale gerilediğini gördük. Literatürde KLA' in antioksidan özellikleri ile ilgili *in vivo* çalışmalar son derece sınırlıdır. Ayrıca, KLA' in antioksidan özellikleri ile ilgili yeteri kadar çalışma olmadığı gibi bazı çalışmalarında birbiri ile çeliştiği, KLA' in antioksidan özellikleri yanında pro-oksidan özelliklerinin de olabileceği vurgulanmıştır. Çalışmanın *in vitro* ya da *in vivo* olması, çalışılan canlı türü, değerlendirilen parametreler, uygulanan doz, süre vb. birçok parametre bu tartışmalı sonuçların nedenlerini oluşturmaktadır. Bu nedenle KLA ile yaptığımız bu *in vivo* çalışmanın literatüre önemli katkılar sağlayacağını düşünüyoruz.

Araştırmacılar KLA' in insanlarda izoprotelar, 8-izo-prostaglandin F2 gibi oksidatif stres markırlarının plasma ve idrarda arttığını rapor etmişlerdir (Dilzer ve Park, 2012). Buna rağmen, bazı araştırmacılar KLA kullanan insanlarda okside LDL, serum LP ve serum antioksidan konsantrasyonu gibi oksidatif stres parametrelerinin değişmediğini rapor etmişlerdir (Aryaeian, Djalali, Shahram, Djazayery ve Eshragian, 2014; Shadman, Taleban, Saadat ve Hedayati, 2013). KLA' ın insanlarda antioksidan özellik gösterdiği, MDA seviyesini azalttığı ve GPx aktivitesini artırdığı rapor edilmiştir (Eftekhari, Aliasghari, Babaei-Beigi ve Hasanzadeh, 2013). Son zamanlarda kronik obstrüktif akciğer hastalarında yapılan bir çalışmada 6 hafta boyunca günde 3,2 gr KLA verilen hastalarda verilmeyenlere göre serum LP seviyelerinin belirgin şekilde düştüğü ve KLA' ın antioksidan etkisinin görüldüğü rapor edilmektedir (Matin, Nemati, Ghobadi, Alipanah-Moghadam ve Rezagholizadeh, 2018). Hamile MRL/lpr farelere verilen KLA' in serum GSH miktarını ve plazma antioksidan statusunu artırdığı görülmüştür. Ayrıca karaciğer ve dalakta GSH yapımında rol oynayan enzimlerden gamma-glutamin sistein ligaz, GST ve NAD(P)H:

queino oksidoreduktaz (NQO1) enzim aktivitelerini artırdıklarını rapor etmişlerdir (Bergamo, Maurano ve Rossi, 2007).

Otuz gün boyunca (5 mg/kg) AK verilen ratlarda dalak, timüs ve polimorfonükleer lökositlerdeki GSH miktarını azalttığı buna karşın LP ve PK miktarını artırdığını, 200mg/kg dozunda verilen KLA' in bu parametreleri büyük ölçüde düzelttiğini rapor etmişlerdir (Aydın, Z. Şekeroglu Atlı ve V. Şekeroğlu, 2018). Hamile ratlara verilen % 1-% 3 KLA' in sıçanların döllerinde ansiyete ve serebral LP' nin verilmeyenlere göre daha az olduğu görülmüştür (Querioz ve diğerleri, 2019).

Sekiz hafta boyunca yüksek yağlı diyetle beslenen Sprague Dawley sıçanların diyetlerine katılan % 1 oranında KLA' in karaciğer mitokondriyal antioksidan enzimler Mn-SOD, Gpx, Gred ve mitokondriyal GSH miktarlarını artırdığını buna karşın yüksek yağlı diyetle artan LP seviyesini azalttığını gözlemlemişlerdir (Choi, Koh, Jung ve Song, 2007).

Memelilerde ISD' in değişik formları bulunmaktadır. Biz çalışmamızda mitokondriyal NADP⁺ bağımlı ISD aktivitesini inceledik. mISD mitokondriyal GSH' nun rejenerasyonunu sağlayan NADPH' ı üreten ve bu nedenle mitokondriyal oksidatif hasarın önlenmesinde çok önemli rol oynayan bir enzimdir. Mitokondride mISD aktivitesi ile NADP⁺ dan NADPH oluşturulur ve redükte NADPH GSSG' nin tekrar GSH' ye dönüşümünde etkilidir. Çalışmamızda, AK etkisi ile mISD aktivitesinin baskılandığını gözlemledik. Bu durum göz önüne alındığında AK etkisi ile beyin mitokondrisindeki GSH miktarının düşmesi beklenen bir sonuçtur. mISD enzimidaki sistein residülerinin enzimin katalitik fonksiyonunda önemli rol oynadıkları ve bu sistein residülerinin NO, peroksinitrit, membran lipit peroksidasyon ürünü 4- hidroksinonenal, H₂O₂, diamid ve ağır metaller tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (Lee, Yang ve Park, 2003).

AK ile birlikte KLA verildiğinde, AK tarafından baskılanan mISD enziminin normale döndüğü görülmektedir. Bu durum KLA' in bu enzimin muhtemel inhibitörleri olan membran lipit peroksidasyon ürünü 4- hidroksinonenal ve H₂O₂' in oluşumunun engellemesi ile açıklanabilir. KLA mitokondriyal Gpx gibi antioksidan enzimleri ya da GSH seviyesini artırarak bu enzim aktivitesinde artışa neden olmuş olabilir. Nitekim, mitokondriyal ISD enzimi nakavt olan deney hayvanlarında oksidatif stresin arttığı görülmüştür (Han, Choi,

Kim, J.W. Park ve K.M. Park, 2017). Benzer şekilde düşük NADPH seviyesi ile artan oksidatif stres arasında da pozitif korelasyon olduğu görülmüştür (Jo ve diğerleri, 2001).

Çalışmalarımızda AK etkisi ile bozulan mitokondriyal bioenergetik mekanizmanın KLA etkisi ile ortadan kalktığı ve değerlerin normale döndüğü görülmektedir. Gerek oksidatif fosforilasyon enzimlerinden Kompleks I ve kompleks IV gerekse TCA enzimlerinden alfa ketogluterat ve izositrat dehidrogenaz enziminde AK etkisi ile meydana gelen baskılanma KLA ile ortadan kalkmıştır. Buna bağlı olarak da AK etkisi ile belirgin şekilde azalan ATP miktarının da KLA etkisi ile tekrar normal haline geldiği görülmektedir. Altmış gün boyunca 3 g/mg KLA verilen farelerin karaciğer ve beyin mitokondrilerinde mitokondriyal bioenergetik fonksiyonların iyileştiği rapor edilmiştir. Bu sonuçlar bizim bulgularımızla benzerdir (Rossignoli ve diğerleri, 2018).



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmalar nörodejeneratif hastalıklar ve mitokontri kaynaklı oksidatif stres arasında güçlü bağlantılar olduğunu ortaya konmuştur. Aynı zamanda mitokondriyal bir toksin olan AK' nin oksidatif strete çok önemli rol oynadığı, potansiyel sitotoksik bir madde olduğu ve başta nörodejeneratif hastalıklar olmak üzere birçok hastalığın patogeneğinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. AK' nin serbest radikal oluşumunu hızla başlattığı, hücrenin bütün antioksidan sistemini zayıflattığı özellikle de çok önemli bir mitokondriyal ve hücrenel antioksidan molekül olan GSH miktarını azalttığı bilinmektedir.

Çalışmamızda AK verilen sıçanların beyin mitokondrilerinde belirgin şekilde oksidatif stresin olduğu buna bağlı olarak bioenergetik mekanizmanın bozulduğunu ortaya koyduk. Çalışma bu dozlarda beyin mitokondrilerinde *in vivo* olarak yapılan ilk çalışma olması nedeni ile oldukça orjinaldir. Hiç kuşkusuz memeli hücreleri hatta hücrelerin farklı kompartımanları özellikle de ROT' nin en fazla meydana geldiği mitokondriler çok iyi antioksidan savunmaya sahiptirler. Ancak AK' nin oluşturduğu ROT çok fazla olunca hücrenel ve mitokondriyal antioksidan sistem bununla baş edememiş ve oksidatif stres meydana gelmiştir. Şimdiye kadar *in vitro* izole mitokondrilerde birçok antioksidan maddenin mitokondriyal oksidatif stresi azalttığı ile ilgili çalışmalar olsa da *in vivo* çalışmalar çok sınırlıdır. Kilo vermeye yardımcı olan KLA' in birçok biyolojik özelliğinin yanında bir antioksidan görevi de görmektedir. Bu nedenle çalışmamızda KLA' in beyin mitokondrilerinde AK ile indüklenen oksidatif hasarı azalttığı ve bioenergetik metabolizmayı büyük oranda iyileştirdiği gözlemlenmiştir. Çalıştığımız doku beyin dokusu ve bu dokuya ait mitokondriler olduğu için KLA' in özellikle hızla artan nörodejeneratif hastalıklardan korunmak için tedavi edici, en azından önleyici rol oynayabileceğini düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

- Abramov, A.Y., Berezhnov, A.V., Fedotova, E.I, Zinchenko, V.P. and Dolgacheva, L.P. (2017). Interaction of Misfolded Proteins and Mitochondria in Neurodegenerative Disorders. *Biochemical Society Transactions*, 45(4), 1025-1033.
- Abraham, K., Andres, S., Palavinskas, R., Berg, K., Klaus, E. A. and Lampen, A. (2011). Toxicology and Risk Assessment of Acrolein in Food. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(9), 1277-1290.
- Adlof, R.O., Duval, S. ve Emken, E.A. (2000). Biosynthesis of Conjugated Linoleic Acid in Humans. *Lipids*, 35(2), 131-135.
- Akarsu, S. (2014). Şizofreni ve Mitokondri Disfonksiyonu, Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar. *Current Approaches in Psychiatry*, 6(4), 340-354.
- Akkuş, İ. (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Ed, Konya, Mimoza Basım Yayım ve Dağıtım.
- Antmen Ş. E. (2005). Beta talasemide oksidatif stres. Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Arumugam, N., Thanissar, J., Raganath, K., Niranjali Devaraj, S. and Devaraj, H. (1999). Acrolein Induced Toxicity Defective Mitochondrial Function As a Possible Mechanism. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36(4), 373-376.
- Aryaeian, N., Djalali, M., Shahram, F., Djazayeri, A. and Eshragian, M.R. (2014). Effect of Conjugated Linoleic Acid, Vitamin E, Alone or Combine Donimmunity and in Fammatory Parameters in Adults With Activer Heumatoidarthrit is: A Randomized Controlledtrial. *International journal of preventive medicine*, 5(12), 1567-1577.
- Auerbach, S. S., J. Mahler, G. S. Travlos, R. D. Irwin. (2008). A Comparative 90-Day Toxicity Study of Allyl Acetate, Allyl Alcohol and Acrolein. *Toxicology*, 253(1-3), 79-88.
- Avcı, D.E., Yağbasan, R. (2008). Beyin Yarı Kürelerinin Baskın Olarak Kullanılmasına Yönelik Öğretim Stratejileri GÜ, *Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 28(2), 1-17.
- Aydın, B., Şekeroglu Atlı Z. ve Şekeroğlu, V. (2018). Acrolein Induced Oxidative Stress and Genotoxicity in Rats: Protective Effects of Whey Protein and Conjugated Linoleic Acid. *Drug and chemical toxicology*, 41(2), 225-231.
- Aydın, R. (2005). Conjugated Linoleic Acid: Chemical Structure, Sources and Biological Properties. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29, 189-195.
- Aydın, R., Pariza, M.W. and Cook, M.E. (2001). Olive Oil Prevents the Adverse Effects of Dietary Conjugated Linoleic Acid on Chick Hatch Ability and Egg Quality. *The Journal of Nutrition*, 131(3), 800-806.

- Aydın, R. (2000). The Effects of Dietary Conjugated Linoleic Acid on Avian Lipid Metabolism. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi. University of Wisconsin, Madison. ABD.
- Azain, M.J., Hausman, D.B., Sisk, M.B., Flatt, W.P. and Jewell, D.E.(2000). Dietary Conjugated Linoleic Acid Reduces Rat Adipose Tissue Cell Size Rather Than Cell Number. *The Journal of Nutrition*, 130(6), 1548-1554.
- Bauman, D.E. (1998). Dietary Fatty Acid Sources Affect Conjugated Linoleic Acid Concentrations in Milk From Lactating dairy cows. *The Journal of Nutrition*, 128(5), 881-885.
- Beauchamp, R.O., Jr., Andjelkovich, D. A., Kligerman, A. D., Morgan, K. T. and Heck, H. D. (1985). A Critical review of the literature on Acrolein toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 14(4), 309-380.
- Belury, M.A., Bird, C., Nickel, K.P. and Wu, B. (1996). Inhibition of Mouse Skin Tumor Promotion by Dietary Conjugated Linoleate. *Nutrition and Cancer*, 26(2), 149-157.
- Bergamo, P., Maurano, F. and Rossi, M. (2007). Phase 2 Enzyme İnduction by Conjugated Linoleic Acid İmproves Lupus-Associated Oxidative Stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(1), 71-79.
- Berridge, M.V. and Tan, A.S. (1993). Characterization of The Cellular Reduction of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyl tetrazolium Bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and İnvolve ment of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303(2), 474-482.
- Büyükuslu, N. ve Yiğitbaşı, T. (2015). Reaktif Oksijen Türleri ve Obezitede Oksidatif Stres, *MÜSBED*, 5(3), 197-203.
- Burcham, P. C., Kaminskas, L. M., Tan, D. and Pyke, S. M. (2008). Carbonyl-Scaven Ging Drugs&Protection Against Carbonyl Stress-Associated Cellinjury. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 8(4), 319-330.
- Burçak, G. ve Andican, G. (2004). Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma. *Cerrahpaşa Journal of Medicine*, 35, 159-169.
- Büyükokuroğlu, M.E. ve Süleyman, H. (2001). Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Eksikliği, *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences Journal Identity*, 21(5), 415-9.
- Cankurtaran, M. (2005). Yaşlılık, Yaşlanma Mekanizmaları, Antiaging ve Yaşam Tarzı Değişiklikleri, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Geriatri Ünitesi, Ankara.
- Cardoso S.M., Proenca M.T., Santos S., Santana I. and Oliveira C.R. (2004). Cytochrome C Oxidase is Decreased in Alzheimer' s Disease Platelets. *Neurobiology of Aging*, 25(1), 105-110.

- Cesano, A., Visonneau, S., Scimeca, J.A., Kritchevsky, D. and Santoli, D. (1998). Opposite Effects of Linoleic Acid and Conjugated Linoleic Acid on Human Prostatic Cancer in SCID Mice. *Anticancer research*, 18(3A), 1429-1434.
- Chamruspollert, M. and Sell, J.L. (1999). Transfer of Dietary Conjugated Linoleic Acid to Egg Yolks of Chickens. *Poultry Science*, 78(8), 1138-1150.
- Chauhan, A., Chauhan, V., Brown, W.T. and Cohen, I. (2004). Oxidative stress in autism: Increased Lipid Peroxidation and Reduced Serum Levels of Ceruloplasmin and Transferrin - The Antioxidant Proteins. *Life Sciences*, 75(21), 2539-2549.
- Chin, S.F., Storkson, J.M., Liu, W., Albright, K.J. and Pariza, M.W. (1994). Conjugated Linoleic Acid (9, 11- and 10, 12-Octadecadienoic Acid) Is Produced in Conventional But Not Germ-Free Rats Fed Linoleic Acid. *The Journal of nutrition*, 124(5), 694-701.
- Chin, S.F., Liu, W., Storkson, J.M., Ha, Y.L. and Pariza, M.W. (1992). Dietary Sources of Conjugated Diene Isomers of Linoleic Acid, A Newly Recognized Class of Anticarcinogens. *Journal of Food Composition and Analysis*, 5(3), 185-197.
- Choi, N., Kwon, D., Yun, S.H. and Jung, M.Y. (2004). Selectively Hydrogenated Soybean Oil With Conjugated Linoleic Acid Modifies Body Composition and Plasma Lipids in Rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(7), 411-417.
- Choi, J.S., Koh, I.U., Jung, M.H. and Song, J. (2007). Effects of Three Different Conjugated Linoleic Acid Preparations on Insulin Signaling, Fat Oxidation and Mitochondrial Function in Rats Fed A High-Fat Diet. *British Journal of Nutrition*, 98(2), 264-275.
- Clark, J.B. and Nicklas, W.J. (1970). The Metabolism of Rat Brain Mitochondria. Preparation and Characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, 245(18), 4724-4731.
- Cook, M.E., Miller, C.C., Park, Y. and Pariza, M.W. (1993). Immune Modulation by Altered Nutrient Metabolism: Nutritional Control of Immune-Induced Growth Depression. *Poultry Science*, 72(7), 1301-1305.
- Cook M., Jerome D., Crenshaw T., Buege P., Pariza M., Albright K., Schmidt S., Scimeca J., Lotgren P. and Hentges E. (1999). *Feeding conjugated linoleic acid improves feed efficiency and reduces carcass fat in pigs*. Adipocyte Biology and Hormone Signaling Symposium, Wisconsin, ABD.
- Çaylak, E. (2011). Hayvan ve Bitkilerde Oksidatif Stres ile Antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 9(1), 73-83.
- Çelik, İ. (2007). Bir Biyoreaktörde pH' ın İç Model Kontrolü (IMC). Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Çelik, C., Yiğitbaşı, K., Tuç, Ö. ve Kurular, D., Mitokondri Kalite Kontrolü PİNK 1/ Parkin İlişkisi

- Delibaş, N. ve Özçankaya, R. (1995). Serbest Radikaller. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2(3), 11-17.
- Develioğlu, A.H. ve Taner İ.L. (1998). Myeloperoksidad' ın Özellikleri ve Periodontal Hastalığıdaki Önemi, *Cumhuriyet Üniversitesi Diş hekimliği Fakültesi Dergisi* 1(1), 24-27.
- Dilzer, A. and Park, Y. (2012). Implication of Conjugated Linoleic Acid (CLA) in Human Health. *Critical Reviewa Food Science and Nutrition*, 52(6), 488-513.
- Eftekhari, M.H., Aliasghari, F., Babaei-Beigi, M.A. and Hasanzadeh, J. (2013). Effect of Conjugated Linoleic Acid and Omega-3 Fatty Acid Supplementation on İnflammatory and Oxidative Stress Markers in Atherosclerotic Patients. *ARYA Atherosclerosis*, 9(6), 311-318.
- Ekmekci, Ö., Karasoy, H. ve Yüceyar, N. (2012). Mitokondriyal Bozukluğu Olan Hastalarda Klinik ve Histopatolojik İnceleme. *Journal of Neurological Sciences*, 29(4), 810-818.
- Engin M.S. (2007). Taflan (*Laurocerasus officinalis Roem.*) Bitkisinin Meyve Çekirdek ve Yapraklarının Mevsim Değişikliğine Göre Göre Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi ve Fenolik Bileşik Tayini, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Eulitz, K., Yurawecz, M.P., Sehat, N., Fritsche, J., Roach, J.A.G., Mossoba, M.M., Kramer, J.K.G., Adlof, R.O. and Ku, Y. (1999). Preparation, Separation, and Confirmation of the Eight Geometrical Cis/Trans Conjugated Linoleic Acid İsomers 8,10-Through 11,13-18:2. *Lipids*, 34(8), 873-877.
- Er, R. (2017). Akrilamit Verilen Ratlarda Argan Yağı' nın Karaciğer ve Böbrek Mitokondriyal Oksidatif Stres ve Solunum Enzimleri Üzerine Etkisi. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Amasya Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, Amasya.
- Erduran Avcı, D. ve Yağbasan, R. (2008). Beyin Yarı Kürelerinin Baskın Olarak Kullanılmasına Yönelik Öğretim Stratejileri. *Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 28(2), 1-17
- Ergezer, H., Gökçe, R. Hozer, Ş. ve Akcan, T. (2016). Et ve Ürünlerinde Protein Oksidasyonu: Etki Mekanizması, Tespit Yöntemleri ve Etkileri. *Akademik Gıda*, 14(1) 54-60.
- Esterbauer, H. and Chessman, K.H. (1990). Determination of aldeydic lipid peroxidation products: malonaldeyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, 186, 407-21.
- Faroon, O., Roney, N., Taylor, J., Ashizawa, A., Lumpkin, M.H. and Plewak, D.J. (2008). Acrolein Environmental Levels and Potential For Human Exposure. *Toxicology and Industrial Health*, 24(8), 543-564.
- Faroon, O., Roney, N., Taylor, J., Ashizawa, A., Lumpkin, M.H. and Plewak, D.J. (2008) Acrolein Health Effects. *Toxicology and Industrial Health*, 24(7), 447-490.

- Fatania, H., Nassar, K.E. and Sidhan, V. (1993). Purification and Partial Characterisation of NADP(+)-Linked Isocitrate Dehydrogenase From Rat Liver Cytosol. *FEBS Letters*, 320(1), 57-60.
- Franklin, S.T., Martin, K.R., Baer, R.J., Schingoethe, D.J. and Hippen, A.R. (1999). Dietary Marine Algae (*Schizochytrium* Sp.) Increases Concentrations of Conjugated Linoleic Acid, Docosahexaenoic and Trans Vaccenic Acids in Milk of Dairy Cows. *The Journal of Nutrition*, 129(11), 2048-2052.
- Freeman, B.A. and Crapo, J.D. (1982). Biology of disease: Free Radicals and Tissue Injury. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 47(5), 412-26.
- Fritsche, J., Teter, B., Sehat, N., Roach, J.A.G., Mossoba, M.M., Ku, Y., Kramer, J.K.G., Adlof, R.O., Sampugna, J. and Yurawecz, M.P. (1999). Determination of CLA isomers in human milk. *Inform*, 10: 5 S1.
- Flohe, L. and Gunzler, W.A. (1984). Assays of Glutathione Peroxidase. *Methods Enzymology*, 105, 114-121.
- Gelpi, J.L., Dordal, A., Montserrat, J., Mazo, A. and Cortes, A. (1992). Kinetic Studies of Their Regulation of Mitochondrial Malate Dehydrogenase by Citrate. *Biochemical Journal*, 283(1), 289-97.
- Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E. and Pelicci, P.G. (2007). Hydrogen Peroxide: a Metabolic by-Product a Common Mediator of Aging Signals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 722-728.
- Gutteridge, J.M. (1995). Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clinical Chemistry*, 41(12), 1819-1828.
- Ha, Y.L., Storkson, J.M. and Pariza, M.W., Inhibition Of Benzo(A)Pyrene-Induced Mouse Forestomach Neoplasia By Conjugated Dienoic Derivatives Of Linoleic Acid. *Cancer Research*, 15;50(4), 1097-101.
- Han, S.J., Choi, H.S., Kim, J.I., Park, J.W. and Park, K.M. (2017). IDH2 Deficiency Increases The Liver Susceptibility To Ischemia Reperfusion Injury Via Increased Mitochondrial Oxidative Injury. *Redox Biology*, 14, 142-153.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1984). Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metals and Disease. *Biochemica Journal*, 219, 1-14.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (1990). Role of Free Radicals And Catalytic Metal Ions in Human Disease : An overview. *Methods in Enzymology*, 186, 1-85
- Hamann, K. and Shi, R. (2009). Acrolein Scavenging: A Potential Novel Mechanism of Attenuating Oxidative Stress Following Spinal Cord Injury. *Journal and Neurochemistry*, 111, 1348-1356.
- Harfoot, C.G. and Hazelwood, G.P. (1988). Lipid Metabolism in The Rumen, Microbial Ecosystem. *Elsevier Science Publishers*, 285-322.

- Hargrave, K.M., Meyer, B.J., Li, C., Azain, M.J., Baile, C.A. and Miner, J.L. (2004). Influence of Dietary Conjugated Linoleic Acid and Fat Source on Body Fat and Apoptosis in Mice. *Obesity Research*, 12(9), 1435-1444.
- Hargrave, K.M., Azain, M.J. and Miner, J.L. (2005). Dietary Coconut Oil Increases Conjugated Linoleic Acid Induced Body Fat Loss in Mice Independent of Essential Fatty Acid Deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1737(1), 52-60.
- Ip, C., Singh, M., Thompson, H.J. and Scimeca, J. A. (1994). Conjugated Linoleic Acid Suppresses Mammary Carcinogenesis and Proliferative Activity of The Mammary Gland in The Rat. *Cancer Research*, 54(5), 1212-1215.
- Ip, C., Briggs, S.P., Haegele, A.D., Thompson, H.J., Storkson, J. and Scimeca, J. (1996) The Efficacy of Conjugated Linoleic Acid in Mammary Cancer Prevention is Independent of The Level or Type of Fat in the Diet. *Carcinogenesis*, 17(5), 1045-1050.
- Ip, C. and Scimeca, J.A. (1997). Conjugated Linoleic Acid and Linoleic Acid are Distinctive Modulators of Mammary Carcinogenesis. *Nutrition Cancer*, 27(2), 131-135.
- Ip, C., Carter, C.A. and Ip, M.M. (1985). Requirement of Essential Fatty for Mammary Tumor Genesis in The Rat. *Cancer Research*. 45(5), 1997-2001.
- Ip, C., Banni, S., Angioni, E., Carta, G., McGinley, J., Thompson, H.J., Barbano, D. and Bauman, D. (1999). Conjugated Linoleic Acid-Enriched Butter Alters Mammary Gland Morphogenesis and Reduces Cancer Risk in Rats. *The Journal Nutrition*, 129(12), 2135-2142.
- İnanç, N. (2006). KLA: Obezitede Etkileri. *Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences)*, 15(2), 137-141.
- Janssen, A.J., Trijbels, F.J., Sengers, R.C., Smeitink, J.A., van den Heuvel, L.P., Wintjes, L.T., Stoltenberg-Hogenkamp, B.J. and Rodenburg, R.J. (2007). Spectrophotometric Assay For Complex I of The Respiratory Chain in Tissue Samples and Cultured Fibroblasts. *Clinical Chemistry*, 53(4), 729-34.
- Jensen, E. (1998). *Teaching With the Brain in Mind*. Alexandria, Virginia: Association for Supervision and Curriculum Development.
- Jeong M. S. and Kang, J. H. (2008). Acrolein, The Toxic Endogenous Aldehyde, Induces Neurofilament-L Aggregation. *BMB Reports*, 41(9), 635-639.
- Jo, S.H., Son, M.K., Koh, H.J., Lee, S.M., Song, I.H., Kim, Y.O., Lee, Y.S., Jeong, K.S., Kim, W.B., Park, J.W., Song, B.J. and Huh, T.L. (2001). Control of Mitochondrial Redox Balance and Cellular Defense Against Oxidative Damage by Mitochondrial NADP⁺-Dependent Isocitrate Dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 16168-16176.
- Kara, O.O. (2009). Konjuge Linoleik Asit Metabolizması ve Sağlık Üzerine Etkileri, Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Tekirdağ.

- Karabulut, H. ve Gülay, M.Ş.(2016). Serbest Radikaller. *MAKÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1), 50-59.
- Kausar, S., Wang, F. and Cui, H. (2018). The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Generation and Its Implications for Neurodegenerative Diseases. *Cells*, 7(12), 274.
- Kayış, T. (2010). Diazinon' un Subletal Konsantrasyonlarının *Pimpla turionellae L.*' nın Eşey Oranı ve Bazı Biyokimyasal Parametreleri Üzerine Etkileri, Yayınlanmamış Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, İ. (2010). *Biyokimya Kitabı* (7.Baskı). Türkiye: Aktif Kitabevi, 301-323
- Keil, U., Bonert, A., Marques, C.A., Strosznajder, J.B., Muller-Spahn, F., Muller, W.E. and Eckert, A., (2004) Elevated Nitricoxide Production Mediates Beta-Amyloid-Induced Mitochondria Failure. *Polish Journal of Pharmacology*, 56(5), 631-634
- Kelly, M.L., Berry, J.R., Dwyer, D.A., Grinari, J.M., Chouinard, P.Y., Van Amburgh, M.E., Mir, Z., Goonewardene, L.A., Okine, E., Jaegar, S. and Scheer, H.D. (1999). Effect of Feding Canola Oil on Constituents, Conjugated Linoleic Acid (CLA) and Long Chain Fatty Acids in Goats Milk. *Small Ruminant Research*, 33(2), 137-143.
- Kepler, C.R., Hirons, K.P., McNeill, J.J. and Tove, S.B. (1966). Inter Mediates and Products of The Biohydrogenation of Linoleic Acid By *Butyrivibrio Fibrisolvens*. *The Journal of Biological Chemistry*, 241, 1350-1354.
- Knekt, P., Järvinen, R., Seppänen, R., Pukkala, E. and Aromaa, A. (1996). Intake of Dairy Products and The Risk of Breast Cancer. *British Journal Cancer*, 73(5), 687-691.
- Koç, M. (2007). Ratlarda İndometazin ile Oluşturulan Gastrik Hasar Üzerine Askorbik Asitin Gastroprotektif Etkileri ve Bu Etkilerin Antioksidan Sistem ile İlişkisi. Yayınlanmamış Yüksek lisans tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Fakültesi, Erzurum.
- Koç, F. ve Sarıca, Y. (2003). Mitokondrial Hastalıklar; Klinik Özellikleri Hastaya Yaklaşım. 12 (Ek Sayı):14
- Koç, F. Sarıca, Y. ve Yerdenen, D. (2003). Mitokondrial Hastalıklar. 12 (Ek Sayı): 32
- Konukoğlu, D. (1997). Serbest Radikaller ve Önemleri. *Türkiye Aile Hekimliği Dergisi*, 1(4), 197-200.
- Kramer, J.K.G., Sehat, N., Dugan, M.E.R., Mossoba, M.M., Yurawecz, M.P., Roach, J.A.G., Eulitz, K., Aalhus, J.L., Schaefer, A.L. and Ku, Y. (1998). Distributions of Conjugated Linoleic Acid (CLA) İsomers in Tissue Lipid Classes of Pigs Fed A Commercial CLA Mixture Determined by Gas Chromatography and Silver İon-High Performance Liquid Chromatography. *Lipids*, 33(6), 549-558.

- Kunwar, A. and Priyadarsini, K.I. (2011). Free Radicals, Oxidative Stress and Importance of Antioxidants in Human Health. *Journal of Medical & Allied Sciences*, 1(2), 53-60
- Kurban, S., Akpınar, Z. ve Mehmetoğlu, İ. (2010). Multiple Skleroz Hastalarında Serum Paraoksonaz ve Arilesteraz Aktiviteleri ile Oksidatif Stresin Araştırılması. *Genel Tıp Dergisi*, 20(1), 13-17.
- Kurt, N. (2008). Yaşa Bağlı Olarak Antioksidan Enzimlerinin Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (KAT) Aktivitelerinin ve Malondialdehit (MDA) Seviyesinin İncelenmesi, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Lee, J.H., Yang, E.S. and Park, J.W. (2003). Inactivation Of NADP⁺-Dependent İsocitrate Dehydrogenase by Peroxynitrite. Implications for Cytotoxicity and Alcohol-İnduced liver Injury. *Journal of Biological Chemistry*, 278(51), 51360-51371.
- Lenaz, G. (2001). The Mitochondrial Production Of Reactive Oxygen Species: Mechanisms and İmplications in Human Pathology. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 52(3-5), 159-164.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S. and Stadtman, E.R. (1990). Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. *Methods Enzymol*, 186, 464-478.
- Liew, C., Shut, H.A.J., Chin, S.F., Pariza, M.W. and Dashwood, R.H. (1995). Protection of Conjugated Linoleic Acids Against 2-Amino-3-methylimidazole[4,5-F]Quinolin-İnduced Colon Carcinogenesis in The F344 Rat: A Study of İnhibitory Mechanisms. *Carcino genesis*, 16(12), 3037-3043.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein Measurement With The Folin Phenolreagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- Lovell, M.A., Ehmann, W.D., Buffer, B.M. and Markesberry, W.R. (1995). Elevated Thiobarbituric Acid Reactive Substancesand Antioxidant Enzyme Activity in the Brain in Alzheimer Disease. *Neurology*, 45(8), 1594-1601.
- Lucas, D.T., Aryal, P., Szweda, L.I., Koch, W.J., Leinwand, L.A. (2003). Alterations in Mitochondrial Function in A Mouse Model of Hypertrophic Cardiomyopathy. *American Journal and Physiology- Heart and Circulatory Physiology*, 284(2), H575-583.
- Luo, J. and Shi, R. (2004). Acrolein in Ducesaxolemmal Disruption, Oxidative Stress, and Mitochondrial İmpairment in Spinal Cord Tissue. *Neurochemistry International*, 44(7), 475-486.
- Luo, J., Robinson, J.P. and Shi, R.Y. (2005). Acrolein-İnduced Cell Death in PC12 Cells: Role of Mitochondria Mediated Oxidative Stress. *Neurochemistry International*, 47(7), 449-457.

- MacDonald, H.B. (2000). Conjugated Linoleic Acid and Disease Prevention: A Review of Current Knowledge. *Journal of the American College of Nutrition*, 19(2), 111S-118S.
- Madamanchi, N.R., Donahue, J.I., Cramer, C.I., Alschler, R.G. and Pedersen, K. (1984). Differential Response of Cu, Zn-Superoxide Dismutases in Two Pea Cultivars During A Short Term Exposure to Sulphur Dioxide. *Plant Molecular Biology*, Springer Netherlands, 95-103.
- Matin, S., Nemati, A., Ghobadi, H., Alipanah-Moghadam, R. and Rezagholizadeh, L. (2018). The Effect of Conjugated Linoleic Acid on Oxidative Stress and Matrix Metalloproteinases 2 And 9 In Patients With COPD. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 13, 1449-1454.
- Maxwell, S.R.J. (1995). Prospect for the Use of Antioxidant Therapies. *Drugs*, 49(3), 345-361.
- Mello, C.F., Sultana, R., Piroddi, M., Cai, J., Pierce, W.M., Klein, J.B. and Butterfield, D.A. (2007). Acrolein Induces Selective Protein Carbonylation in Synaptosomes. *Neuroscience*, 147(3), 674-679.
- Memişoğulları, R. (2005). Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi”, *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3, 30-39.
- Miller, C.C., Park, Y., Pariza, M.W. and Cook, M.E. (1994). Feeding Conjugated Linoleic Acid to Animals Partially Overcomes Catabolic Responses Due to Endotoxin Injection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 198(3), 1107-1112.
- Mir, Z., Goonewardene, L.A., Okine, E., Jaegar, S. and Scheer, H.D. (1999). Effect of Feeding Canola Oil on Constituents, Conjugated Linoleic Acid(CLA) and Long Chain Fatty Acids in Goats Milk. *Small Ruminant Research*, 33, 137-143.
- Monaco, A., Ferrandino, I., Boscaino, F.,Cocca, E., Cigliano, L., Maurano, F., Luongo, D., Spagnuolo, M.S., Rossi, M. and Bergamo, P. (2018). Conjugated Linoleic Acid Prevents Age-Dependent Neurodegeneration in A Mouse Model of Neuropsychiatric Lupus Via The Activation of An Adaptive Response. *Journal of Lipid Research*, 59(1), 48-57.
- Morais, V.A. and De Strooper, B. (2010). Mitochondria Dysfunction and Neurodegenerative Disorders: Cause or Consequence. *Journal of Alzheimers Disease*, 20(Suppl 2), S255-263
- Moron, M.S., Depierre, J.W. and Mannervik, B. (1979). Levels of Glutathione Reductase and Glutathione-S-Transferase Activities in Rat Lung and Liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, 582(1), 67-78
- Mossakowski Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 02-106 Warsaw, Poland, Neurochemistry International 2015

- Mülâyimçelik, G. (2012). Akroleinin Nörotoksik Etkilerinin Sıçanlarda Araştırılması. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Ankara.
- Naoui, M., Maruyama, W., Nagai, M. S., Yi, H., Akao, Y. And Tanaka, M. (2005). Oxidative Stress in Mitochondria-Decision to Survival and Death of Neurons in Neurodegenerative Disorders. *Molecular Neurobiology*, 31(1-3), 81-93.
- Oğuz, A. (2015). Nörodejeneratif Hastalıklarda Mitokondrinin Rolü(seminer), Amasya Üniversitesi, Fen Bilimler Endtitüsü, Amasya.
- Ostrowska, E., Muralitharan, M., Cross, R.F., Bauman, D.E. and Dunshea, F.R. (1999). Dietary Conjugated Linoleic Acids Increase Lean Tissue and Decrease Fat Deposition in Growing Pigs. *The Journal of Nutrition*, 129(11), 2037 - 2042.
- Öber A. (2008). Alzheimer Hastalığında Moleküllerin Rolü. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 1(1), 23-31.
- Öğüt, S. ve Atay, E. (2012). Yaşlılık ve Oksidatif Stres. *Süleyman Demirel üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 19(2), 68-74.
- Özkul, A. ve Akyol, A. (2012). Mitokondriyal Hastalıklar. *Türkiye Klinikleri Journal Neurology-Special Topics*, 5(1), 35-44.
- Panov, A., Dikalov, S., Shalbuyeva, N., Taylor, G., Sherer, T. and Greenamyre, J.T. (2005). Rotenone Model of Parkinson Disease: Multiple Brain Mitochondria Dysfunctions After Short Term Systemic Rotenone Intoxication. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(51), 42026-42035.
- Pariza, M.W., Park, Y. and Cook, M.E. (2000). Mechanisms of Action of Conjugated Linoleic Acid: Evidence and Speculation. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 223(1), 8-13.
- Pariza, M.W. and Hargraves, W.A. (1985). A Beef-Derived Mutagenesis Modulator Inhibits Initiation of Mouse Epidermal Tumors by 7,12-Dimethylbenz[A]Anthracene. *Carcinogenesis*, 6(4), 591-593.
- Park, Y., Albright, K.J., Liu, W., Cook, M.E. and Pariza, M.W. (1997). Effect of Conjugated Linoleic Acid on Body Composition in Mice. *Lipids*, 32(8), 853-858.
- Park, Y., Albright, K.L., Storkson, J.M., Liu, W., Cook, M.E. and Pariza, M.W. (1999). Changes in Body Composition in Mice During Feding and With Drawal of Conjugated Linoleic Acid. *Lipids*, 34(3), 243- 248.
- Parodi, P.W. (1977). Conjugated Octadecadienoic Acids of Milk Fat. *Journal of Dairy Science*, 60(10), 1550-1553.
- Petersen, D.R. and Doorn, J.A. (2004). Reactions of 4-Hydroxynonenal With Proteins and Cellular Targets. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(7), 937-945.

- Picklo, M.J. and Montine, T.J. (2001). Acrolein Inhibits Respiration in Isolated Brain Mitochondria. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1535(2), 145-152.
- Pocernich, C.B. and Butterfield, D.A. (2003). Acrolein Inhibits NADH-Linked Mitochondrial Enzyme Activity: Implications for Alzheimer's Disease. *Neurotoxicity Research*, 5(7), 515-519.
- Pocernich, C.B., Cardin, A.L., Racine, C.L., Lauderback, C.M. and Butterfield, D.A. (2001). Glutathione Elevation and its Protective Role in Acrolein-Induced Protein Damage in Synaptosomal Membranes: Relevance to Brain Lipid Peroxidation in Neurodegenerative Disease. *Neurochemistry International*, 39(2), 141-149.
- Poljsak, B. (2011). Strategies for Reducing or Preventing the Generation of Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 15.
- Queiroz, M.P., Lima, M.D.S., de Melo, M.F.F.T., Bertozzo, C.C.M.S., de Araújo, D.F., Guerra, G.C.B., Queiroga, R.C.R.D.E. and Soares, J.K.B. (2019). Maternal Supplementation With Conjugated Linoleic Acid Reduce Anxiety and Lipid Peroxidation in the Offspring Brain. *Journal of Affective Disorders*, 243, 75-82.
- Rashedinia, M., Lari, P., Abnous, K. and Hosseinzadeh, H. (2013). Proteomic analysis of rat cerebral cortex following subchronic acrolein toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 272(1), 199-207.
- Riel, R.R. (1963). Physico-Chemical Characteristics of Canadian Milk Fat. Unsaturated Fatty Acids. *Journal of Dairy Science*, 46(2), 102-106.
- Rossignoli, C.P., Dechandt, C.R.P., Souza, A.O., Sampaio, I.H., Vicentini, T.M., Teodoro, B.G., Neto, M.P.C., Ferrari, G.D., Couto-Lima, C.A. and Alberici, L.C. (2018). Effects of Inter Mittent Dietary Supplementation With Conjugated Linoleic Acid and Fish Oil (EPA/DHA) on Body Metabolism and Mitochondrial Energetics in Mice. *Journal of Nutritional biochemistry*, 60, 16-23.
- Ruszkiewicz, J., Albrecht, J. (2015). Changes in the Mitochondrial Antioxidant Systems in Neurodegenerative Diseases and Acute Brain Disorders, *Neurochemistry International*, 88, 66-72.
- Selmanoğlu, G., Özgün, Gökçen M. ve Karacaoglu, E. (2018). Acrolein-Mediated Neurotoxicity in Growing Wistar Male Rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 149, 37-43.
- Shadman, Z., Taleban, F.A., Saadat, N. ve Hedayati, M. (2013). Effect of Conjugated Linoleic Acid and Vitamin E on Glycemic Control, Body Composition, and Inflammatory Markers in Overweight Type 2 Diabetics. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 12(1), 12-42.
- Shi, R., Rickett, T. and Sun, W. (2011). Acrolein-Mediated Injury in Nervous System Trauma and Diseases. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(9), 1320-1331.

- Singh, M., Murthy, V. and Ramassamy, C. (2010). Modulation of Hydrogen Peroxide and Acrolein-Induced Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunctions and Redox Regulated Pathways by the Bacopa Monniera Extract: Potential Implication in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimers Disease*, 21(1), 229-247.
- Shultz, T.D., Chew, B.P., Seaman, W.R. and Luedecke, L.O. (1992). Inhibitory Effect of Conjugated Dienoic Derivatives of Linoleic Acid and Beta-Carotene on the in Vitro Growth of Human Cancer Cells. *Cancer Letters*, 63(2), 125-33.
- Suabjakyong, P., Saiki, R., Van Griensven, L., Higashi, K., Nishimura, K., Igarashi, K. and Toida, T. (2015). Polyphenol Extract From Phellinus Signiarius Protects Against Acrolein Toxicity In Vitro and Provides Protection in a Mouse Stroke Model. *Plos One*, 10, 1-15.
- Sun, L., Luo, C., Long, J., Wei, D. and Liu, J. (2006). Acrolein is a Mitochondrial Toxin: Effects on Respiratory Function and Enzyme Activities in Isolated Rat Liver Mitochondria. *Mitochondrion*, 6(3), 136-142.
- Stevens, J. F. and Maier, C. S. (2008). "Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease." *Molecular Nutrition Food Research*, 52, 7-25.
- Spinazzi, M., Casarin, A., Pertegato, V., Salviati, L. and Angelini, C. (2012). Assessment of Mitochondrial Respiratory Chain Enzymatic Activities on Tissues and Cultured Cells. *Nature Protocols*. 7(6), 1235-1246.
- Şener, G. ve Yeğen, B.Ç. (2009). İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim*, 22, 5-13.
- Trounce, I.A., Kim, Y.L., Jun, A.S. and Wallace, D.C. (1996). Assessment of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Patient Muscle Biopsies, Lymphoblasts, and Transmitted Cell Lines. *Methods in Enzymology*, 264, 484-509.
- Tsuboyama-Kasaoka, N., Takahashi, M., Tanemura, K., Kim, H.J., Tange, T., Okuyama, H., Kasai, M., Ikemoto, S. and Ezaki, O. (2000). Conjugated Linoleic Acid Supplementation Reduces Adipose Tissue by Apoptosis and Develops Lipodystrophy in Mice. *Diabetes*, 49(9), 1534-1542.
- Umamo, K. and Shibamoto, T. (1987). Analysis of Acrolein From Heated Cooking Oils and Beef Fat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35(6), 909-912.
- Yazıcı, T.G. ve Şahin, H.A. (2010). Alzaymır Hastalığı. *Klinik Gelişim*, 48-52.
- Yu, L. (2001). Free Radical Scavenging Properties of Conjugated Linoleic Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3452-3456.
- Zejniliović, J. (2007). Akciğer Kanseri Hastalarda Mangan Süperoksit Dismutaz (MnSOD) Gen Polimorfizminin İncelenmesi, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Zhu, Q., Sun, Z., Jiang, T., Chen, F. and Wang, M. (2011). Acrolein Scavengers: Reactivity, Mechanism and Impact on Health. *Molecular Nutrition Food Research*, 55(9), 1375-1390.

Zu, H.X. and Schut, H.A.J. (1992). Inhibition of 2-Amino-3-methylimidazo (4, 5-F) Quinoline-DNA Adduct Formation in CDF1 Mice by Heat-Altered Derivatives of Linoleic Acid. *Food Chemical Toxicology*, 30(1), 9-16.

Wahle, K.W., Heys, S.D. and Rotondo, D. (2004). Conjugated Linoleic Acids: Are They Beneficial or Detrimental to Health ?. *Progress in Lipid Research*, 43(6), 553-587.

Wallace D.C. (2005). A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn For Evolutionary Medicine. *Annual Review of Genetics*, 39, 359-407.

Willcox, J.K., Ash, S.L. and Catignani, G.L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 275-295.

URL-1 -- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/acrolein>

URL-2 -- <https://tr.khanacademy.org/science/biology/structure-of-a-cell/tour-of-organelles/a/chloroplasts-and-mitochondria>

URL-3 -- <https://tr.khanacademy.org/science/biology/cellular-respiration-and-fermentation/glycolysis/a/glycolysis>

URL-4 -- <http://www.biyolojidersnotlari.com/biyoloji-canlilarda-solunum-enerjinin-aciga-cikisi.html>

URL-5 -- <http://biyokimya20.blogspot.com/>

URL-6 -- [http://194.27.141.99/dosya-depo/ders-notlari/remisagelisgen/Elektron Transport Zinciri ve Oksidatif Fosforilasyon.pdf](http://194.27.141.99/dosya-depo/ders-notlari/remisagelisgen/Elektron%20Transport%20Zinciri%20ve%20Oksidatif%20Fosforilasyon.pdf)

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : GÜLER ŞAHİN, Cansu

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri : 08.04.1990, Artova / TOKAT

Medeni hali : Evli

Telefon :----

e-mail : ----

Eğitim Derecesi	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Amasya Üniversitesi	2019
Lisans	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi	2012
Lise	Darıca Lisesi	2007

Bilimler faaliyetler

Güler Şahin, C., Kılıç Aydın, B. (2017, Ekim). Akrolein Verilen Ratlarda Konjuge Linoleik Asit' in Beyin Mitokondrial Fonksiyonları Üzerine Etkisi, *6. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*, Çukurova Üniversitesi, Adana, Turkey.