

**AKRİLAMİT VERİLEN RATLARDA ARGAN YAĞI'NIN
KARACİĞER VE BÖBREK MİTOKONDRIYAL OKSİDATİF STRES
VE SOLUNUM ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Rahime ER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**AMASYA
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KASIM 2017

AMASYA

**AKRİLAMİT VERİLEN RATLARDA ARGAN YAĞI'NIN
KARACİĞER VE BÖBREK MİTOKONDRIYAL OKSİDATİF STRES
VE SOLUNUM ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Rahime ER

DANIŞMAN

Doç. Dr. Birsen KILIÇ AYDIN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AMASYA
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KASIM 2017

AMASYA

Rahime ER tarafından hazırlanan AKRİLAMİT VERİLEN RATLARDA ARGAN YAĞI'NIN KARACİĞER VE BÖBREK MİTOKONDRİYAL OKSİDATİF STRES VE SOLUNUM ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİSİ adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Birsen KILIÇ AYDIN

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Birsen KILIÇ AYDIN
Biyoloji Anabilim Dalı, A.Ü.

Doç. Dr. Yasemin ÖZDENER KÖMPE
Biyoloji Anabilim Dalı, O.M.Ü.

Doç. Dr. Tuba YILDIRIM
Biyoloji Anabilim Dalı, A.Ü.

Tarih: 21/11/2017

Bu tez Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Doç. Dr. Mehmet KARA
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Rahime ER



**AKRİLAMİT VERİLEN RATLARDA ARGAN YAĞI'NIN KARACİĞER VE
BÖBREK MİTOKONDRIYAL OKSİDATİF STRES VE SOLUNUM
ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİSİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

Rahime ER

**AMASYA
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KASIM 2017**

ÖZET

Akrilamit (AA) halk sağlığı için risk oluşturan önemli bir kimyasaldır. Argan yağı (AR), antioksidanlar ve fenolik bileşikler bakımından zengindir. Bu çalışmada, rat karaciğer ve böbreğinde AA ile oluşabilecek olası mitokondriyal oksidatif stres ve mitokondriyal fonksiyonlar üzerine AR'nın koruyucu etkisinin çalışılması amaçlanmıştır. Bu nedenle, Sprague Dawley ratlara AA (50 mg / kg i.p, haftada 3 gün), AR (6 ml / kg o.p, her gün) ve AA ile birlikte AR olmak üzere 30 gün boyunca verildi.

Genel olarak, AA verilen rat karaciğer ve böbreğinde sitozolik glutatyon s-transferaz (GST), glukoz-6P-dehidrogenaz (G6PD) aktivitelerinde azalma buna karşın miyeloperoksidaz (MPO) ve total nitrik oksit (NOx) seviyelerinde önemli artışlar görüldü. AA etkisi ile mitokondriyal redükte glutatyon (GSH) seviyesi ve antioksidan enzimlerde azalma olurken, mitokondriyal lipid peroksidasyonu (LP) ve protein karbonil (PK) seviyelerinde önemli artışlar meydana geldi. Ayrıca, AA verilen hayvanların karaciğer ve böbrek dokularında elektron transport zincir (ETS) ve trikarboksilik asit (TCA) döngüsü enzim aktiviteleri, ATP ve mitokondriyal metabolik fonksiyon (MTT) seviyeleri önemli derecede azaldı. AA ile birlikte AR verilmesi, AA etkisi ile oluşan oksidatif stres ve

mitokondriyal fonksiyon parametrelerini önemli ölçüde iyileştirdi ve çoğu parametre tamamen normale döndü. Elde ettiğimiz bulgular, AR'nın AA etkisi ile rat karaciğer ve böbrek dokusunda artan oksidatif stres ve bozulan mitokondriyal fonksiyonların iyileştirilmesinde etkili olduğunu göstermektedir.



Bilim Kodu:

Anahtar Kelimeler: Akrilamit, organ yağı, oksidatif stres, oksidatif fosforilasyon, Krebs döngüsü enzimleri, mitokondriyal membran fonksiyonu, ATP.

Sayfa Adedi: 96

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Birsen Kılıç Aydın

**EFFECT OF ARGAN OIL ON LIVER AND KIDNEY MITOCHONDRIAL
OXIDATIVE STRESS AND RESPIRATORY ENZYMES IN ACRYLAMIDE
GIVEN RATS
(MSc.Thesis)**

Rahime ER

**AMASYA
UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
November 2017**

ABSTRACT

Acrylamide (AA) is an important chemical that pose a risk to public health. Argan oil (AR) is rich in antioxidants and phenolic compounds. We aimed to study the protective effect of AR on mitochondrial oxidative stress and mitochondrial functions that may occur with AA in rat liver and kidney. For this purpose, Sprague Dawley rats were given with AA (50 mg / kg i.p., 3 days a week), AR (6 ml / kg o.p, per day) and AA together with AR for 30 days.

Cytosolic enzymes glutathione s-transferase (GST), glucose-6P-dehydrogenase (G6PD) enzyme activities decreased but myeloperoxidase (MPO) and total nitric oxide (NOx) levels increased in the AA treated rats. By the effect of AA, mitochondrial reduced glutathione (GSH) level and mitochondrial antioxidant enzyme activities decreased. In contrast, significant increases were seen in mitochondrial lipid peroxidation (LP) and protein carbonyl (PC) levels. In addition, significant decreases were observed in the activities of electron transport chain (ETC) and the tricarboxylic acid (TCA) cycle enzymes and also ATP and mitochondrial metabolic function (MTT) levels decreased by the effects of AA. AR administration together with AA improved significantly oxidative stress and mitochondrial function parameters caused by AA and most parameters were completely normalized. Findings show that AR is effective in

improving mitochondrial oxidative stress and deteriorating mitochondrial functions in rat liver and kidney tissue with AA effect.



Science Code:

Key Words: Acrylamide, argan oil, oxidative stress, oxidative phosphorylation, Krebs cycle enzymes, mitochondrial membran function, ATP.

Page Number: 96

Adviser: Assoc. Prof. Birsen Kılıç Aydın

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde, tezimin her aşamasında desteğini ve yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübesiyle bana rehberlik eden saygıdeğer hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Birsen KILIÇ AYDIN'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca ders aldığım hocalarım Doç. Dr. Tuba YILDIRIM'a, Yrd. Doç. Dr. Adnan SARIKAYA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez araştırmalarımın laboratuvar deneyleri aşamasında birlikte çalıştığım gösterdikleri sabır ve verdikleri destek ile yardımcı olan arkadaşlarım Cansu GÜLER, Gülşah GÜNDOĞDU, Hicran AKYOL, İbrahim TÜRKEK, Hamdi ÖZKUL ve diğer tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİGİLER.....	3
2.1. Akrlamit	3
2.1.1. Akrlamitin yapısı, kimyasal özellikleri ve oluşum mekanizmaları	3
2.1.2. Akrlamit metabolizması ve akrlamitle ilgili yapılan deneysel çalışmalar	7
2.2. Argan Yağı.....	9
2.2.1. Argan yağının içeriği ve biyolojik aktivitesi.....	9
2.2.2. Argan ile ilgili yapılan çalışmalar	12
2.3. Reaktif Oksijen Türleri	14
2.3.1. Süperoksit radikali	14
2.3.2. Hidrojen peroksit.....	15
2.3.3. Hidroksil radikali	15
2.3.4. Nitrik oksit ve peroksinitrit	15
2.3.5. Singlet oksijeni.....	16
2.4. Serbest Radikallerin Kaynakları	16
2.5. Serbest Radikallerin Yol Açtığı Hasarlar.....	18
2.5.1. Karbonhidratlar üzerine etkileri	18
2.5.2. Membran lipitlerine etkileri (Lipit peroksidasyonu).....	19
2.5.3. Proteinler üzerine etkileri	20
2.5.4. Nükleik asitler ve DNA'ya etkileri.....	22
2.6. Oksidatif Stres	22
2.7. Antioksidanlar	23
2.7.1. Enzim olan endojen antioksidanlar	24
2.7.2. Enzimatik olmayan endojen antioksidanlar	30

2.8. Mitokondri	32
2.8.1. Mitokondrinin yapısı.....	32
2.8.2. Hücresel solunum ve mitokondriyal enzimler	34
2.9. Miyeloperoksidaz.....	42
2.10. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz.....	43
2.11. Mitokondri ve Oksidatif Stres.....	44
2.12. Mitokondriyal Hastalıklar	45
2.13. Karaciğer.....	49
2.13.1. Karaciğerin yapısı ve görevleri	49
2.13.2. Karaciğer hastalıkları ve mitokondri.....	49
2.14. Böbrek.....	51
2.14.1. Böbreğin yapısı ve görevleri	51
2.14.2. Böbrek hastalıkları ve mitokondri.....	52
3. MATERYAL VE METOT	56
3.1. Materyal	56
3.1.1. Analizlerde kullanılan cihazlar ve malzemeler.....	56
3.1.2. Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler ve hazırlanışları	56
3.1.3. Deney hayvanları ve deney grupları	57
3.2. Metod	58
3.2.1. Dokularının elde edilmesi ve analizlere hazırlanması	58
3.2.2. Karaciğer ve böbrekten mitokondri izolasyonu	58
3.2.3. Miyeloperoksidaz aktivitesinin belirlenmesi	59
3.2.4. Dokularda total nitritin belirlenmesi	59
3.2.5. Glutasyon-S-transferaz ve glukoz-6P-dehidrogenaz aktivitelerinin belirlenmesi.....	59
3.2.6. Mitokondriyal oksidatif stresin belirlenmesi	60
4. BULGULAR.....	65
4.1. Karaciğer ve Böbrekte Sitolitik G6PD ve GST, MPO Aktiviteleri ve Toplam NOx Seviyeleri	65
4.2. Karaciğer ve Böbrek Mitokondrisindeki Enzimatik ve Enzimatik Olmayan Oksidatif Stres Parametreleri.....	67

4.3. Karaciğer ve Böbrek Mitokondrisindeki Oksidatif Fosforilasyon, TCA Enzimleri, ATP Seviyesi ve Mitokondriyal Metabolik Fonksiyonun Değerlendirilmesi.....	70
4.4. Karaciğer ve Böbrekte ATP Miktarı ve Mitokondriyal Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi.....	73
5. TARTIŞMA	75
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	81
KAYNAKLAR	82
ÖZGEÇMİŞ	97



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Türkiye kaynaklı bazı gıdalardaki akrilamid analiz sonuçları.....	6
Çizelge 2.2. Organik Fas argan yağının yağ asidi, sterol ve tokoferol	10



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Akrilamitin kimyasal yapısı.....	3
Şekil 2.2. Farklı şekillerde akrilamit oluşum mekanizmaları	4
Şekil 2.3. Argan yağında bulunan antioksidanlar	11
Şekil 2.4. Serbest radikallerin oluşturduğu hasarlar	18
Şekil 2.5. Protein oksidasyonunun en yaygın sonuçları.....	22
Şekil 2.6. Hücrede antioksidan mekanizmaları.....	24
Şekil 2.7. SOD'un üç farklı formu ve hücrede bulunduğu kısımlar	25
Şekil 2.8. Hidrojen peroksidin, NADPH tarafından glutatyon	31
Şekil 2.9. TCA döngüsü ve enzimleri	35
Şekil 2.10. Oksidatif mtdna hasarı ve yaşlanma	44
Şekil 4.1. Grupların karaciğer ve böbrekte GST aktivitesi	64
Şekil 4.2. Grupların karaciğer ve böbrekte G6PD aktivitesi.....	65
Şekil 4.3. Grupların karaciğer ve böbrekte MPO aktivitesi	65
Şekil 4.4. Grupların karaciğer ve böbrekte NOx düzeyleri.....	66
Şekil 4.5. Grupların karaciğer ve böbrekte Mn-SOD aktiviteleri	66
Şekil 4.6. Grupların karaciğer ve böbrekte GPx aktiviteleri.....	67
Şekil 4.7. Grupların karaciğer ve böbrekte GSH seviyeleri.....	67
Şekil 4.8. Grupların karaciğer ve böbrekte LP seviyeleri	68
Şekil 4.9. Grupların karaciğer ve böbrekte PK seviyeleri.....	68
Şekil 4.10. Grupların karaciğer ve böbrekte kompleks I aktiviteleri	69
Şekil 4.11. Grupların karaciğer ve böbrekte kompleks II aktiviteleri.....	69
Şekil 4.12. Grupların karaciğer ve böbrekte kompleks IV aktiviteleri	70
Şekil 4.13. Grupların karaciğer ve böbrekte ISD aktiviteleri.....	70
Şekil 4.14. Grupların karaciğer ve böbrekte α -KD aktiviteleri.....	71
Şekil 4.15. Grupların karaciğer ve böbrekte MD aktiviteleri.....	71
Şekil 4.16. Grupların karaciğer ve böbrekte ATP seviyeleri	72
Şekil 4.17. Grupların karaciğer ve böbrekte MTT seviyeleri	73

RESİMLERİN LİSTESİ

	Sayfa
Resim 2.1. Mitokondri yapısı.....	32
Resim 2.2. Elektron taşıma sistemi birimleri	39



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
HO₂•	Perhidroksi radikali
H₂O₂	Hidrojen peroksit
O₂	Moleküler oksijen
OH•	Hidroksil radikali
O₂•	Süperoksit radikali
Kısaltmalar	Açıklama
AR	Argan Yağı
AA	Akrilamit
ATP	Adenosin Trifosfat
CAT	Katalaz
CoQ	Koenzim Q10
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ETS	Elektron Transport Zincir
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid
GST	Glutasyon-S-Transferaz
GSH	Redükte Glutasyon
GSSG	Glutasyonun Okside Formunun
GPx	Glutasyon Peroksidaz

Kısaltmalar**Açıklama****GR**

Glutasyon Redüktaz

G6PD

Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz

HTAB

Hexadecyltrimethylammonium Bromide

IARC

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı

ISD

İzositrat Dehidrogenaz

İ.P

İntraperitoneal

İ/R

İskemi/Reperfüzyon

KBY

Kronik Böbrek Yetmezliği

 α -KD

Alfa Ketoglutarat Dehidrogenaz

L•

Lipit Radikali

LOO•

Lipit Peroksit Radikalleri

LOOH

Lipit Peroksitleri

LP

Lipit Peroksidasyonu

MD

Malat Dehidrogenaz

MDA

Malondialdehit

MPO

Miyeloperoksidaz

MtDNA

Mitokondriyal DNA

MTT

Mitokondriyal Metabolik Fonksiyon

NADPH

Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat

NADH

Nikotinamid Adenin Dinükleotit

Kısaltmalar**Açıklama****NO**

Nitrik Oksit

NO_x

Total Nitrik Oksit

OF

Oksidatif Fosforilasyon

PK

Protein Karbonil

PUFA

Doymamış Çoklu Yağ Asitleri

RAT

Reaktif Azot Türevleri

ROT

Reaktif Oksijen Türleri

RNA

Ribonükleik Asit

SOD

Süperoksit Dismutaz

TCA

Trikarboksilik Asit

1. GİRİŞ

Mitokondri, tüm bitki ve hayvan hücrelerinin sitoplazmasında bulunan büyük organellerdir. Hücrede bulunan oksijeni kullanan mitokondri, kimyasal enerjiyi, hücredeki gıdalardan hücrenin kullanabileceği bir biçimde enerjiye dönüştürür. Bu işleme oksidatif fosforilasyon denir ve mitokondrinin içinde meydana gelir. Mitokondri matrisinde sitrik asit veya krebs döngüsü olarak bilinen reaksiyonlar NADH (Nikotinamid adenin dinükleotit) adı verilen bir kimyasal üretir. NADH daha sonra adenozin trifosfat (ATP) üretmek için mitokondriyal iç zar içerisinde gömülü enzimler tarafından kullanılır. ATP' de enerji, kimyasal bağlar biçiminde saklanır. Mitokondriyal hücreler kendi dairesel deoksiribonükleik asit (DNA) zincirlerini kullanarak bölünürler ve sonuç olarak bir hücrede birçok mitokondri olabilir [Boveris, 1984]. Mitokondriler çok önemli enerji dönüştürücüleridir ve süreçte reaktif oksijen türleri (ROT) olarak adlandırılan “serbest radikaller” üretirler. ROT' lar mitokondriyal DNA' ya zarar verebilir, mitokondriyal DNA enerji dönüştürücülerine çok yakın bulunduğu için ağırlıkla saldırıya uğrayabilir, bazen sıradan bir hücredeki nükleer DNA on kat daha hızlı değişir [Drose ve ark., 2012]. Bu mutasyonlar, beyin, kaslar, kalp, karaciğer, böbrek ve göz gibi yüksek enerji talebi olan dokuları etkileyerek hastalıklara neden olmaktadır. Nitekim Parkinson veya Alzheimer hastalığı olan insanlar sağlıklı insanlara kıyasla çok daha yüksek bir mitokondriyal mutasyon oranına sahiptir ve bu nedenle bu hastalıklarda mitokondrinin büyük etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Mitokondrinin çağın hastalıkları olarak nitelendirilen ve hipertrigliseridemi, kolestrol, insülin direnci, anormal glukoz toleransı ve hipertansiyon gibi belirtilerle karakterize olan metabolik sendromun mitokondri fonksiyonlarının bozulması ile yakın ilişkili olduğu bilinmektedir [Akalin, 2005; Degli Esposti ve ark., 2012].

Çok yüksek kimyasal aktiviteye sahip doymamış karbonil bileşiği olan AA, kozmetik ve kağıt ambalajlama gibi endüstriyel imalattan laboratuvar çalışmalarına kadar birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır [Alturfan ve ark., 2012]. Gıdalardaki AA miktarlarını açıklayan Dünya Sağlık Örgütü'nün 2002 yılında yayınladığı rapor AA toksitesine olan ilgiyi artırmıştır [WHO, 2002]. Deney hayvanları ve insan üzerinde yapılan çalışmalarda AA'in vücutta hızlı bir şekilde dağılım gösterdiği fakat

diğer dokulara göre en fazla karaciğer ve böbrek dokusunda bulunduğu görülmüştür [NTP-CERHR monograph, 2005].

AA hayvanlarda nörotoksik, genotoksik, karsinojenik ve üreme toksitesine sahiptir [Shipp et al., 2013]. Mitokondriyal hasarı oluşturarak ortaya çıkardığı bu nörotoksik özelliğinin yanında AA'in son zamanlarda karaciğerde de mitokondriyal oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir [Zhao et.al., 2015].

AR, üretildiği ağacın dünya üzerinde tek bir yerde Afrika kıtasının kuzey bölgesinde yer alan Fas'ta yetiştiğinden dolayı oldukça kıymetli bir yağdır. Bu bölgede AR, çok eski zamanlardan itibaren sağlık amaçlı olarak kullanılmış ve hala da kullanılmaya devam etmektedir. AR, oleik ve linoleik asit başta olmak üzere yağ asitlerini içerir, tokoferol (E vitamini), fenol, karoten, skualen diğer temel bileşenleridir. AR'ın antioksidan özellikleri bir çok in vivo ve in vitro çalışma ile gösterilmiştir [Khallouki ve ark.,2003; El Abbassi ve ark., 2014]. AR geleneksel tıpta karaciğer koruyucu olarak kullanılmaktadır [Necip ve ark., 2013; El Abbassi ve ark., 2014] ve hemodiyaliz hastalarında oksidatif stres ve lipid değerlerini olumlu yönde etkilediği görülmüştür [Eljaoudi ve ark., 2015].

Mitokondrinin oksidatif stresin önemli bir kaynağı olduğu göz önüne alındığında oksidatif stres kaynaklı doku hasarlarının iyileştirilmesinde mitokondriyal antioksidanların çok önemli olduğu görülecektir. Bizde buradan yola çıkarak AA'in karaciğer ve böbrek dokusu üzerinde oluşturacağı muhtemel oksidatif stres ve mitokondriyal hasar üzerine AR'ın etkisini incelemeyi amaçladık. Zira AR bol miktarda tokoferol, polifenol ve koenzim Q-10 (CoQ-10) gibi mitokondriye özgü antioksidanlar içermektedir [López ve ark., 2013].

Bu nedenle çalışmamızda karaciğer ve böbrekte olası AA toksitesine karşı AR'ın etkisi, sitozolik (GST, G6PD,NO, MPO) ve mitokondriyal oksidatif stres parametreleri (Mn-SOD, GPx, GSH, LP, PK değerlerini), mitokondriyal elektron taşıma zinciri enzimleri (kompleks I-IV), TCA döngüsü enzimleri, MTT ve ATP seviyeleri değerlendirildi.

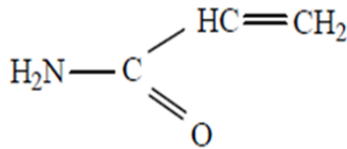
2. GENEL BİGİLER

2.1. Akrilamit (AA)

2.1.1. Akrilamitin yapısı, kimyasal özellikleri ve oluşum mekanizmaları

Doğal şartlarda gıdalarda bulunmayan ama işleme esnasında yüksek sıcaklıklarda meydana gelen AA'nın, nörotoksik ve karsinojenik etkiler gösterdiği ispatlanmış ve AA uluslararası kanser araştırma ajansı (IARC) tarafından insanlar için olası karsinojen madde olarak (2A grubu) sınıflandırılmış toksik bir bileşiktir [IARC, 1994; Yerlikaya ve arkadaşları, 2012].

AA renksiz, erime noktası 84,5°C ve kaynama noktası 125°C olan beyaz renkli, kokusuz, kristal şeklinde bir maddedir. Buhar basıncı 20°C'de 0,007 mmHg şeklindedir. Molekül ağırlığı 71,08 g/mol olan AA suda, asetonda, kloroform ve etanolde çözünebilmektedir fakat sudaki çözünürlüğü oldukça yüksektir [Friedman, 2003].

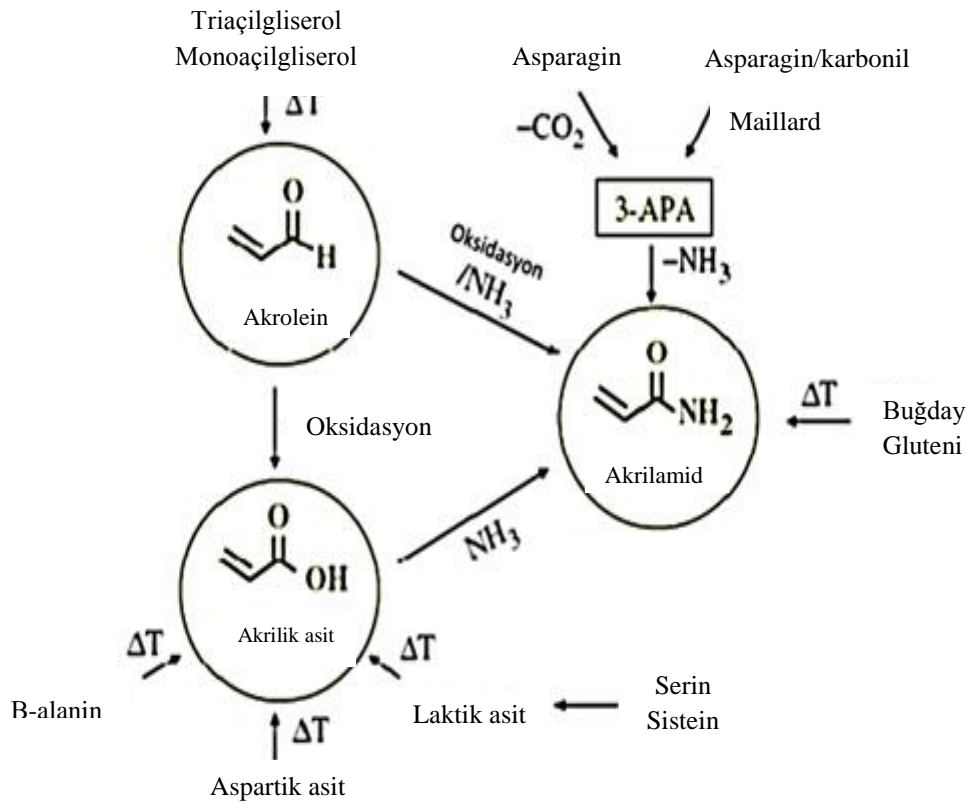


Şekil 2.1. Akrilamitin kimyasal yapısı [Altınöz, 2009]

AA, monomerik ve polimerik olmak üzere iki farklı formda bulunmaktadır. Besinlerde ısı etkisi ile oluşan formu monomerik formudur. Polimerik formu su geçirmeyen bir jel olması nedeniyle eşsiz bir bileşiktir. Poliakrilamit endüstriyel uygulamalarda oluşan polimerik AA formudur. İçme ve atık suların iyileştirilmesinde, sabun yapımında, zenginleştirilmiş petrolün geri kazanımında, plastik üretiminde, partiküllerin ve diğer katışık maddelerin temizlenmesinde, kâğıt ve kozmetiklerden yapıştırıcı madde yapımında ve ayrıca makromoleküllerin elektroforezinde olmak üzere çeşitli kimyasal ve çevresel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [Arusoğlu, 2015].

Besinlerde AA oluşumu, pişme süresine, besinsel kaynağın çeşidine, pişen besinin şekline ve pişme ısısına bağlıdır. Ortam sıcaklığı 180°C'ye çıkarıldığında AA oluşumu en yüksek düzeye ulaşmaktadır [Arusoğlu, 2015]. En fazla AA oluşumu karbonhidrat bakımından zengin besinlerin ısıtılması sonucunda oluşmaktadır. AA'nin oluşumu akrolein ya da akrilik asit reaksiyonu yoluyla, malik asit, laktik asit ve sitrik asit içeren temel bazı organik asitlerin dehidrasyon-dekarboksilasyonu yoluyla ve serbest halde bulunan asparajin amino asitinin indirgen şekerler ile oluşturduğu Maillard reaksiyonu ile gerçekleşebilir [Yıldız ve ark., 2010].

Maillard reaksiyonlarında AA'nin oluşabilmesi için tepkimeye giren aminoasidin asparajin olması önem taşır [Stadler et al., 2002; Richmond and Borrow, 2003]. Buna karşın glikoz ile glisin, sistein veya metionin aminoasitleri 185°C ısıtıldığında, AA meydana gelmemektedir (oluşma sınırı, 0,5 mg/mol). Glutamin ve aspartik asit ısıya maruz kaldıklarında sadece eser miktarlarda AA meydana gelir (0,5–1 mg mol-1) [Becalski et al., 2003].



Şekil 2.2. Farklı şekillerde akrilamid oluşum mekanizmaları [Guenther et al., 2007]

Gıdalarda AA oluşumunun en önemli yolu maillard reaksiyonudur. Bunun dışında da akrolein bileşiği, azotlu bileşikler, 3-amino propiyonamide ve okside olmuş lipitler üzerinden de AA oluşabilmektedir [Yıldız, 2014]. Akroleinlerin akrilik asite oksidasyonu ile devam eden reaksiyonda, amonyak ile tepkimeye girmesi sonucu AA meydana gelmektedir. Bunun yanı sıra lipit oksidasyon ürünlerinden 2-alkenaller ve 2,4-dekadienaller asparajinin strecker parçalanmasında karbonil kaynağı olarak kullanılarak AA meydana getirebilirler [Mottram et al., 2006; Özçandır Kıvanç, 2013].

Yağların yüksek sıcaklıkta parçalanması sonucu akrolein bileşiği oluşturduğu gözlenmiştir. Bu bileşiğin oksidasyonu sonucu oluşan akrilik asidin amonyak ile tepkimeye girerek AA oluşturduğu bildirilmiştir [Yasuhara et al., 2003]. Başka bir çalışmada yağların, asparajin ile birlikte ısıtılması sonucu AA meydana geldiği ve daha yüksek oranda doymamış yağ asiti içeren balık yağının, hayvansal yağ ve mısır yağına oranla yaklaşık on kat daha fazla AA meydana getirdiği rapor edilmiştir [Yıldız, 2014].

Çizelge 2.1. Türkiye kaynaklı bazı gıdalardaki akrilamid analiz sonuçları
[Ölmez ve ark., 2008; Altınöz, 2009]

GIDA MADDESİ	AKRİLAMİT($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Pirinç pilavi	Ölçülebilir değerin altında
Tahin helvası	Ölçülebilir değerin altında
Kebap, döner, ızgara	Ölçülebilir değerin altında
Çavdar ekmeği	Ölçülebilir değerin altında
Beyaz ekmek (kabukta)	40-160
Kızarmış ekmek (hazır)	200
Hazır çorbalar	40-60
Tulumba tatlısı	40-45
Bebe bisküvileri	150-610
Bisküviler	260-1450
Krakerler	180-420
Kahvaltılık gevrekler	80-350
Ekmek	40-160
Kızarmış ekmek	90-1430
Sade kek	150-400
Zencefilli kek	1070-1450
Çeşitli fırıncılık ürünleri	230-3200
Kahvaltılık tahıllar	30-1400
Patates kızartması	330-3700
Kahve(bir bardak)	25

2.1.2. Akrilamit metabolizması ve akrilamitle ilgili yapılan deneysel çalışmalar

Fare, sıçan, domuz ve tavşanlarda AA'in letal dozunun (LD 50) 107-203 mg/kg vücut ağırlığı değerleri arasında değiştiğini, insanlarda akut zehirlenme dozunun 375 mg/kg vücut ağırlığı olduğu ve bu dozun karaciğerde olumsuzluklar ile periferik nöropati (omurilik sinirlerinde görülen fonksiyon bozukluğu) gibi etkilere sebep olduğu bildirilmektedir [Brent and Stanley, 2003]. AA'in insanlarda 2A grubu bir kanserojen olduğunu belirten IARC, bu kararını AA'in kemirgenlerin üreme ve somatik hücrelerinde yaptığı kromazomal anormalliklere ve gen mutasyonlarına dayandırmıştır, ayrıca laboratuvarında hücre kültüründe yapılan çalışmalarda da AA'in gen mutasyonları ve kromazomal anormallikler yaptığı görülmüştür [Besaratina and Pfeifer, 2003].

Ratlar, domuzlar ve köpekler üzerinde yapılan çalışmalarda AA'in vücutta hızlı bir şekilde dağılım gösterdiği fakat diğer dokulara göre en fazla karaciğer ve böbrek dokusunda bulunduğu görülmüştür [NTP-CERHR monograph, 2005]. Tüm vücutta bulunan GSH'ın yaklaşık % 60'ının karaciğerde bulunması nedeniyle çok daha yüksek bir kapasite ile AA, karaciğerde AA-GSH konjugatına çevrilerek büyük oranda idrarla vücut dışına atılır. Ancak, sulu ortamlarda kolaylıkla çözünebilme özelliği nedeniyle AA'in bir kısmında bütün vücut dokularına dağılım gösterir. AA'nın esas transformasyon yolu hepatik GST enziminin AA'i glutatyona bağlayarak fare ve ratlarda bir idrar metaboliti olan N-asetil-S-(3-amino-3-oksiopropil) sistein ve insanlarda ise N-asetil-S-(2-karbamoetil) sisteine çevirmesidir. Diğer bir transformasyon yolu ise insanlarda ve hayvanlarda sitokrom P450 tarafından AA'in glisemide dönüştürülmesidir. Yüksek dozda AA, GST enzimini inhibe etmekte ve GSH düzeyini düşürmektedir [Kirman et al., 2003; NTP-CERHR monograph, 2005].

Ratlara 10 gün süresince 40 mg/kg intraperitoneal (i.p.) AA verildiğinde karaciğer ve böbrek fonksiyonlarında bozulmalar görülmüştür. Buna ilave olarak dokularda oksidatif stresin arttığı, bir DNA hasar markırı olan 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHDG) miktarının ve dokulara nötrofil infiltrasyonunun (MPO aktivitesinde artış) arttığı görülmüştür [Alturfan ve ark., 2012].

Ratlar 3 hafta boyunca (20 mg/kg) AA ile muamele edildiğinde nefrotoksititeye maruz kaldıkları görülmüştür. Plazma üre ve kreatin konsantrasyonlarında artış ve böbrek dokusunda LP ve PK seviyesinin arttığı buna karşılık redükte glutatyon (GSH), non-protein thiol, vitamin C seviyesinin düştüğü ve bütün bunlara ilave olarak katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitelerinde de düşme görülmüştür [Ghorbel et al., 2015].

Ratlara 15 gün süresince verilen AA (6 mg/kg i.p.) sonucunda bazı serum enzimlerinin (AST, ALT,ALP, LDH, BUN, kreatin gibi) arttığı, karaciğer CAT, süperoksit dismutaz (SOD), GPx, GST enzimlerinin ve GSH seviyesinin azaldığı buna karşın LP ve PK miktarının arttığı görülmüştür [Khan et al., 2011]. Ratlara 21 gün süreyle gavajla 25 mg/kg AA verilerek ince bağırsak, kalın bağırsak, karaciğer ve kan örnekleri alınarak yapılan bir çalışmada AA'in başta karaciğer olmak üzere genel olarak dokularda GSH miktarını düşürdüğü buna karşın LP'yi artırdığı görülmüştür. Lenfositlerin Comet analizinde DNA hasarının arttığı görülmüştür [Altınöz, 2009].

Yapılan çalışmalar AA'in biyolojik makromoleküllere zarar vererek ve normal metabolizmayı bozarak oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir. Bunun yanında genotoksik etkileride bilinmektedir. Son zamanlarda AA'in genotoksik olduğu, gen interaksiyonlarına ve kromozomal anomalilere sebep olduğu belirlenmiştir. Beş gün boyunca 50 mg/kg AA verilen rat karaciğerinde DNA hasar markırı 8-OHDG seviyesinin arttığı buna karşın GST enzim aktivitesinin azaldığı görülmüştür [Ansar et al., 2016]. AA, fare ve sıçanlar için kanserojendir. AA'in içme suyu ya da diğer yollarla uzun süre verilmesi, her iki türde de çeşitli organlarda tümör gelişmesine sebep olmaktadır. AA, farelerde alveol kaynaklı akciğer tümörlerinin gelişim oranını artırır ve dermal uygulamadan sonra deri tümörlerinin oluşumunda da bir artış gözlenmiştir. Sıçanlarda yapılan bu AA uygulaması testis, tiroid ve memeye ilgili tümör oluşumunu tetiklediğini gözlenmiştir. Kısacası AA hayvanlarda nörotoksik, genotoksik, karsinojenik ve üreme toksititesine sahiptir [Shipp et al., 2013].

AA'in gerek endüstriyel çalışanlarda gerekse deney hayvanlarında nörotoksik etkiler gösterdiği bilinmektedir [Crofton et al., 1996]. Dahası Muralidhara [2013]; El-Beltagi ve Mohamed [2013] çalışmalarında siyatik sinirlerde ve beynin farklı bölgelerinde (korteks, serebellum) AA'in malondialdehit (MDA), NO gibi oksidatif stres parametrelerini artırdığı gözlemlenmiştir. AA'in bir metaboliti olan glisamid, spermatit protoaminlerine bağlanarak sperm morfolojisini etkilemekte ve sperm ölümlerine neden olmaktadır [Tyl and Friedman, 2003]. Buna ilave olarak 10 hafta boyunca 0,5, 5, 25, 50, 250 ve 500 mikrogram/kg olarak içme suyuna katılan AA'in ratlarda karaciğer ve testislerde transaminaz ve fosfataz enzim aktivitelerini, plazma ve beyin asetilkolin esteraz aktivitesini azalttığını gözlemlenmiştir. Ayrıca doza bağlı olarak plazma, karaciğer, testis, beyin ve böbrekte sülfidril gruplarının azaldığı, antioksidan enzim aktivitelerinde bozulmalar ve LP 'nda artışlar gözlemlenmiştir [Yousef and El-Demerdash, 2006]. Son zamanlarda AA kaynaklı hepatik, renal ve beyin dokularındaki hücresel hasarda oksidatif stresin anahtar rol oynadığına dair çalışmalar bulunmaktadır [Abdel-Daim et al., 2014].

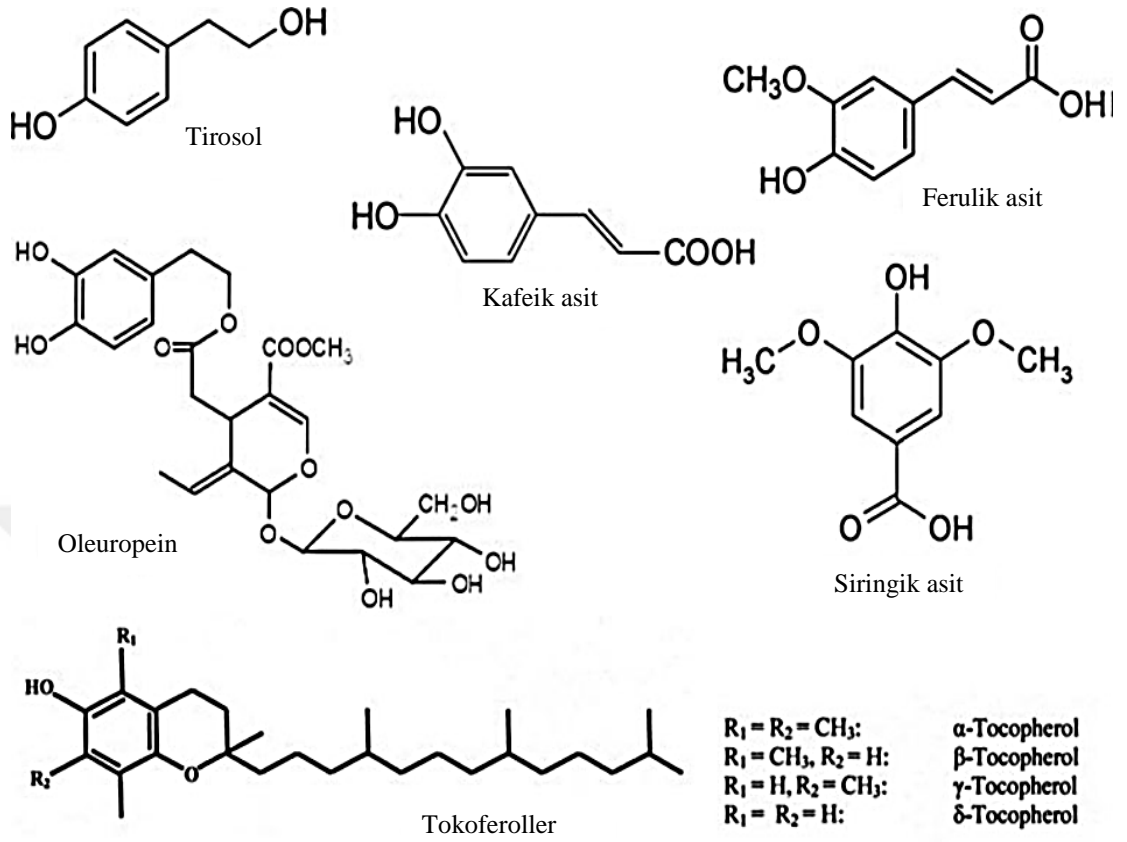
2.2.Argan Yağı (AR)

2.2.1. Argan yağının içeriği ve biyolojik aktivitesi

Son yıllarda kozmetikte oldukça yaygın kullanılan AR, *Argania spinosa L.* (Sapotaceae) bitkisinin meyvelerinden elde edilmektedir. Argan bitkisi (*Argonia spinosa(L.)*) sadece Güney Batı Fas'ın kısır topraklarında yavaş büyüyen endemik bir ağaçtır. Kozmetik AR şampuan, nemlendiriciler ve kozmetik ürünler hazırlanırken bileşen olarak kullanılır. Fas yerlileri tarafından AR'ın tedavide kullanımı 800 yıldır devam etmektedir. Fakat uzun bir süre üzerinde bilimsel araştırmalar yapılmamıştır [Guillaume ve Charrouf, 2011].

Çizelge 2.2. Organik Fas argan yağının yağ asiti, sterol ve tokoferol içerikleri [Aydın, 2017]

Yağ asitleri	%	Spinasterol	34,0
Miristik asit (C14:0)	0,1	A 7-avenasterol	4,0-7,0
Palmitik asit (C16:0)	12	Stigmasta-8,22-dien-3p-ol.	3,2-5,7
Palmioleik asit (C16:1)	0,1	Kampesterol ve Kolesterol	≤0,4
Heptadekanoik asit	0,1	Tokoferoller (637 mg/kg oil)	
Stearik asit (C18:0)	5,6	Alfa tokoferol	6,0-9,0
Oleik asit (C18:1)	46,1	Beta tokoferol	0,1-0,3
Linoleik asit (C18:2)	34	Gama tokoferol	80,0-91,0
Linoleik asit (C18:3)	0,1	Delta tokoferol	5,0-10,2
Araşidik asit (C20:0)	0,4	Fenolik Bileşikler (3,262 mg/kg oil)	
Gadoleik asit (C20:1)	0,4	Ferulik asit	96,47
Helenik asit (C22:0)	0,1	Vanilik asit	2,05
Steroller	%	Syringik asit	1,13
Schottenol	44	Tyrosol	0,36



Şekil 2.3. Arğan yağında bulunan antioksidanlar

[El-Abbasi, 2014; Charrouf & Guillaume, 2002; Khallouki et al., 2005].

AR son zamanlarda kozmetik alanda dünyadaki en değerli olan yağlardan biri haline gelmiştir. AR ve preparatları Fas tıbbında kuru cilt, akne, sedef, egzama, kırışiklıklar, suçiçeği kabarcıkları, eklem ağrısı ve deri iltihabı gibi çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde yüzyıllardır kullanılmaktadır. Son zamanlarda içerdikleri saponin türevlerinin, enfektif mantarlara karşı koruyucu maddeler oldukları ileri sürülmektedir. AR nemlendirici, onarıcı ultraviole-B ışığından kaynaklanan kırışiklıkların giderilmesinde, kollojen yıkımının ve inflamasyonun önlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Kozmetikte kullanılmasının en önemli nedeni anti-inflamasyonel olması ve bol miktarda polifenol özellikle de ve zararlı ışınlar karşı etkili olduğu bilinen iki önemli bileşik ferulik asit ve kafeik asit içeriğinin fazla olmasıdır [Saija et al., 2000].

Genel olarak değerlendirildiğinde yara iyileştirici, akne önleyici, anti-proliferatif, obezite önleyici, yaşlanma karşıtı, nemlendirici ve karaciğer koruyucu özellikleri bulunmaktadır [Guillaume ve Charrouf, 2011].

AR'ın %99'unu trigliseritler oluşturmaktadır. Bileşimlerinde ise %80 oranında oleik ve linoleik asit bulunmaktadır. Linolenik asit eser miktardadır. Sabunlaşmayan kısmın bileşiminde %37 karoten, %8 tokoferol, %20 triterpenik alkol, %20 sterol ve %5 ksantofil bulunmaktadır. AR zeytinyağından yaklaşık iki kat daha fazla tokoferol içermektedir (Tokoferol miktarı zeytinyağında 300 mg/kg iken argan yağında 600 mg/kg'dır). Tokoferol içeriği değişkenlik göstermesine rağmen AR'da en fazla bulunan tokoferol formu γ -tokoferol'dür. γ -tokoferol'ün prostat (LNCap and PC-3) ve akciğer kanser (A549) hücrelerindeki çoğalmayı α -tokoferole göre çok daha fazla inhibe ettiği görülmüştür [Jiang et al., 2004].

δ -tokoferol daha düşük oranda bulunur. α -, β -, γ -ve δ -tokoferol antioksidan özelliktedir ve yağın stabilitesinden sorumludur. AR'da spinasterol ve schottenol diye adlandırılan steroller mevcuttur. AR'nun sabunlaşmayan kısımlarından çeşitli triterpen alkoller izole edilmiştir. Butirospermol, tirukallol ve β -amirin ana maddelerdir. Lupeol, 24-metilen sikloartanol ve sitrostadienol az miktarda bulunan triterpen alkollerdir. Ekstraksiyon artığının bileşiminde; glusitler, proteinler ve saponinler yer almaktadır. Son zamanlarda özellikle saponin bileşikleri dikkat çekmektedir. Ekstraksiyon artığı %26.3 nem, %3.6 kül, %24.6 azotlu bileşikler, %18.5 lipit, %26.6 glukozit ve %17.6 selülozdan oluşmaktadır [Çetin ve Deliorman Orhan, 2015].

2.2.2. Argan ile ilgili yapılan çalışmalar

AR ayrıca zeytinyağında bulunmayan fenolik bileşiklerden, özellikle ferulik asit ve syringik asitce (sırasıyla 3147 ve 37 ug / kg) zengindir. AR'da spinasterol ve schottenol diye isimlendirilen sterollerde bulunmaktadır. Antikanser özellikleri ile bilinen bu iki sterol ailesi, diğer bitkisel yağlarda nadiren görülür. AR eser miktarda antikanser özelliği olan skualen içerir (zeytinyağında 4990 mg / kg'a karşı 3140 mg / kg) içermektedir. Bu bileşikler aynı zamanda oksidasyonu önleyerek yağın stabilitesine katkıda bulunurlar [Guillaume ve Charrouf].

Fas piyasasından toplanmış 22 virgin AR'ın, antioksidan kapasitesinin araştırıldığı çalışmanın sonucunda, yağın gıda olarak tüketilen diğer yağlara (virgin zeytinyağı, keten tohumu, soya fasülyesi, mısır, fıstık, ayçiçeği, kolza ve üzüm yağları) göre yüksek bir antioksidan kapasiteye sahip olduğu tespit edilmiştir [Marfil et al., 2011].

Sıçan ve insan plazmasında yapılan çalışmalarda AR, LP'yi önlemekte ya da azaltmaktadır. AR'ın kimyasal bileşiminde bulunan tokoferol bileşiklerinin içerisinde güçlü antioksidan aktivite gösteren γ -tokoferol, AR'da oldukça yüksek oranda bulunmaktadır. Bunun yanında yüksek oranda bulunan skualen bileşikleri de kansere karşı koruyucu etki göstermektedir. AR'ın polifenol ve sterollerini insan prostat hücre dizilerinde doz bağımlı olarak sitotoksik ve antiproliferatif etki göstermiştir. Bu etkinin prostat kanserinin tanımlayıcısı olan ornitin dekarboksilaz enziminin ve epitelyal büyüme faktörü reseptörünün otofosforilasyonunun inhibisyonu ile gerçekleştiği düşünülmektedir [Bennani et al., 2007; Çetin ve Deliorman, 2015]. Geniş ölçekli epidemiyolojik çalışmalar ile γ -tokoferolden zengin beslenme ile γ -tokoferolün prostat kanserine karşı koruyucu etkili olduğu gösterilmiştir [Çetin ve Deliorman Orhan, 2015].

Bu bileşiğin sıçanlarda alloksan ile indüklenmiş diyabet üzerinde iyileştirici etki yaptığı bu nedenle antidiyabetik etkisi olduğu bilinmektedir. Bir hafta boyunca 2ml/kg AR verilen ratlarda hepatik glukojen seviyesinin arttığı buna karşın kan şekerinin anlamlı derecede düştüğü görülmüştür [Bellahcen et al., 2012]. AR'ın antidiyabet özelliklerinin yanında antitrombotik etkisinin de olduğu ve bu etkinin antikoagulan aktiviteden ziyade antiplatelet aktivitesinden kaynaklandığı görülmüştür [Mekhfi et al., 2012]. Diyetle günlük olarak alınan AR'ın kalp hastalıklarını önlediği, kan şekeri ve kolesterol seviyesini düşürdüğü ve romatizmal ağrıları iyileştirdiği bilinmektedir [Charrouf and Guillaume, 1999]. Drissi ve ark (2004) yaptıkları çalışmada AR tüketen Fas yerlilerinin tüketmeyenlere göre daha düşük LDL kolesterol (Düşük yoğunluklu lipoprotein), plazma lipit peroksidleri ve daha fazla a-tokoferol ve plazma antioksidan miktarına sahip oldukları görülmüştür [Drissi et al., 2004]. AR sıçanlara 3 hafta boyunca 5 ml / kg verildiğinde böbrekte civa klörür kaynaklı oksidatif stresi önlediği GSH, GPx ve GST gibi oksidatif

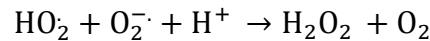
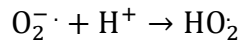
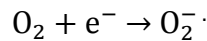
stress parametrelerini iyileştirdiği görülmüştür [Necib et al., 2013]. Ratlara 10 gün boyunca 0,5ml/kg AR verildiğinde civa klorür (HgCl₂) ile baskılanmış fagositik aktivitenin düzeldiği ve AR'ın immünomodülatör bir etkiye sahip olduğunu gösterilmiştir [Necib et al., 2013].

2.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

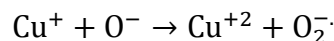
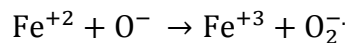
Radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron çıkmasıyla ya da atom veya moleküle bir elektron ilavesiyle serbest radikaller oluşurlar. Oluşan bu radikaller çok reaktif ve aynı zamanda kararsızdırlar. Diğer moleküllere elektron verebildiklerinden ya da onlardan elektron alabildiklerinden dolayı vücutta indirgeyici veya yükseltgeyici olarak davranırlar [Çaylak, 2011].

2.3.1. Süperoksit radikali (O₂⁻)

Süperoksit radikali organizmada meydana gelen ilk radikal olup kararsız yapıdadır. Oksidatif fosforilasyonun ana bileşeni olan oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikali meydana gelir. Süperoksit radikalinin kendisi direkt olarak zarar vermez, asıl önemi hidrojen peroksit (H₂O₂) kaynağı olmasıdır. Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde daha reaktif olmaktadır. Oksidan (O₂⁻) perhidroksi radikali (HO₂⁻) oluşturmak üzere protonlanabilir. Süperoksit radikali ile perhidroksi radikali birbirleriyle reaksiyona girebilmekte ve biri okside olurken diğeri indirgenmektedir. Bu dismutasyon reaksiyonuyla moleküler oksijen (O₂) ve H₂O₂ meydana gelmektedir [Turan, 2014; Wickens, 2001].

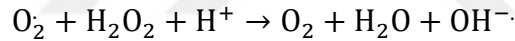


Süperoksit radikali geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi (Fenton reaksiyonu) olması açısından önemlidir [Bozkurt, 2014].



2.3.2. Hidrojen peroksit (H₂O₂)

Hidrojen Peroksit, süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksidin, iki proton (H⁺) ile birleşmesi sonucu meydana gelir. Biyolojik sistemlerdeki hidrojen peroksidin asıl üretimi, süperoksidin dismutasyonu ile gerçekleşir. İki süperoksit molekülü, iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar. Hidrojen peroksitin, yapısında paylaşılmamış elektron bulunmadığı için radikal özellik göstermez. Hidrojen peroksit radikal özellikte olmadığı halde ROT kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü hidrojen peroksitin Fe⁺² veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu; süperoksit radikalinin varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali (OH•) oluşturur [Bozkurt, 2014; URL-2]



2.3.3. Hidroksil radikali (OH•)

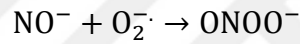
Hidroksil radikali, hidrojen peroksitten Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu meydana gelir. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması ve UV ışığına maruz kalması sonucuyla da hidroksil radikali oluşabilmektedir. Hidroksil radikali biyolojik sistemlerin tanıdığı en aktif tür olup çok reaktif bir radikaldir. Yarılma ömrü çok kısa olmasına rağmen su da dahil ortamda rastladığı her biyomolekülle tepkimeye girerek oluştuğu yerde büyük hasara sebep olur. Hidroksi radikalının en çok bilinen hasarı LP'dir. Hidroksil radikali biyomembranlardaki çoklu doymamış yağ asitlerinin metilen grubundan bir hidrojen atomu kopmasına ve LP'nin başlamasına neden olmaktadır [Lloyd et al., 1997]

2.3.4. Nitrik oksit (NO) ve peroksinitrit (ONOO⁻)

NO, gaz yapısındadır ve radikal özelliktedir. NO, oldukça basit bir yapıya sahip olmasına rağmen farklı ve zıt etkilere sahip olup bazı durumlarda bir antioksidan gibi

davranıp LP'ye karşı koruma sağlarken, bazı durumlarda süperoksitle reaksiyona girerek prooksidan gibi davranırlar. Oksijen varlığında nitrik oksit sentaz enzimi aracılığıyla damar endotel hücreleri, nötrofiller, aktive olmuş makrofajlar ve diğer hücre tiplerinin uyarılmasıyla, L-arjininden nitrik oksit ve L-sitrullin sentezlenir. Bu reaksiyon için ortamda oksijen ile birlikte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), flavin adenin dinükleotid (FAD) gibi bazı kofaktörlerin de bulunması gerekir. Nitrik oksit yağda çözünebilen özeliğe olup biyolojik zarlardan kolay geçebilir [Liew et al., 1990; Uyumlu, 2007].

Süperoksit radikalinin, radikal olan NO ile birleşmesi sonucu bir reaktif oksijen türü olan peroksinitrit meydana gelir. Reaksiyon çok hızlı oluşur. Sadece ksantin oksidaz ile aktive nötrofillerin hızlı süperoksit oluşturması ve nitrik oksit sentetaz aktivasyonu sonucu oluşur. Reaksiyon şu şekilde gerçekleşir [Turan, 2014]:



2.3.5. Singlet oksijeni (¹O₂)

Moleküler oksijende eşleşmemiş iki dış elektronun spinleri aynıdır fakat farklı yörüngelerde bulunurlar. Moleküler oksijen yüksek enerji ile uyarıldığında bu eşleşmemiş elektronlardan biri ya kendi spininin tersi yönünde hareket eder veya bulunduğu orbitalden başka bir orbitale geçiş yapar. Bu şekilde singlet oksijen (¹O₂) ortaya çıkar. Serbest radikal reaksiyonları sonucu oluştuğu gibi, serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da neden olur. Radikal olmadığı halde çok reaktif olması ve radikal tepkimelerinin başlamasına sebep olması sebebiyle radikal sınıfına kabul edilir. Doymamış yağ asitleri ile doğrudan tepkimeye girerek peroksil radikalini (RO₂·) meydana getirir ve lipid peroksidasyonunu başlatabilir [Wright et al., 2002].

2.4.Serbest Radikallerin Kaynakları

Hücrelerde en fazla serbest oksijen radikali, mitokondriyal elektron transport zincirinden sızıntıyla meydana gelir. Mitokondri iç zarında bulunan oksidatif fosforilasyon zinciri elemanları indirgendiği zaman mitokondriyal süperoksit radikali üretimi artar. Hayvan hücrelerinde süperoksit radikalinin bir başka kaynağında

askorbik asit, tiyoller, adrenalin ve flavin koenzimleri gibi bazı bileşiklerin otooksidasyonudur. Membrana bağlı sitokromların oksidasyonu, endoplazmik retikulum ve nükleer membranda serbest radikal üretimi artar. Birçok enzimin katalitik döngüsü sırasında da serbest radikaller meydana gelir [Yeloğlu, 2012].

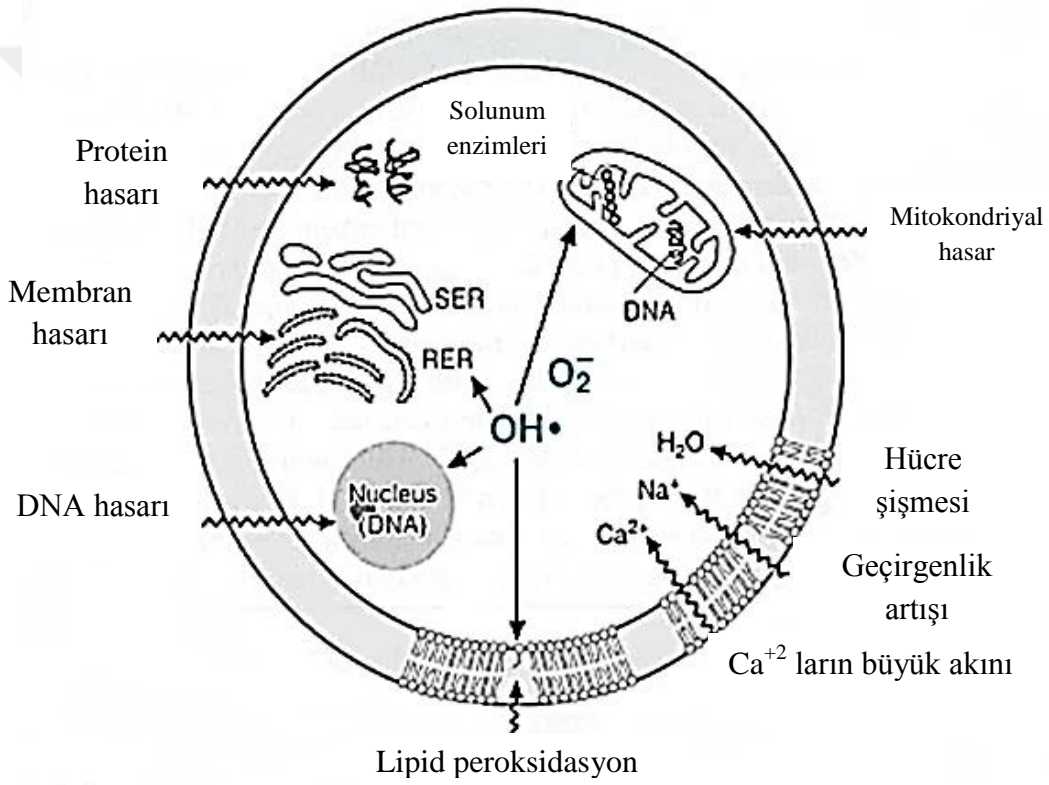
ROT'un diğer önemli bir metabolik kaynağı da araşidonik asit metabolizmasıdır. Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna ve plazma membranından araşidonik asidin serbestleşmesine sebep olur. Araşidonik asidin enzimatik oksidasyonu da çeşitli serbest radikal ara ürünleri oluşur. Araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine enzimatik LP denir [Pham-Huy et al., 2008].

Özellikle demir ve bakır gibi geçiş metalleri, fizyolojik şartlarda elektron alış veriş şeklinde gerçekleşen oksidoredüksiyon reaksiyonlarında rol alırlar. Geçiş metalleri bu özellikleri nedeniyle serbest radikal reaksiyonlarını hızlandıran katalizör görevi görürler. Demir ve bakır, tiyollerden tiyil sentezini, H_2O_2 ve $O_2\cdot^-$ den $OH\cdot$ sentezini katalizler. Metal iyonlarının serbest radikal reaksiyonlarındaki esas önemi LP'deki etkileriyle ilgilidir. Geçiş metalleri, LP'yi başlatmaktan ziyade sentezlenmiş olan lipid hidroperoksitlerinin (LOOH) parçalanmalarını sağlayıp, LP'nin zincir reaksiyonlarını katalize ederler. Böylece daha az zararlı olan radikalleri daha çok zararlı hale getirirler [Halliwell and Gutteridge, 1990].

Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerde, fagositik solunumsal patlama sırasında da çeşitli serbest radikaller oluşur. Bazı yabancı toksik maddeler hücrede serbest radikal üretimini artırır. Bu maddeler ya doğrudan serbest radikal üretirler ya da serbest radikallerin ortadan kaldırılmasını sağlayan antioksidan aktiviteyi düşürürler. Ayrıca diyet faktörleri, ilaçlar, ksenobiyotikler, alkol, sigara, uyuşturucu maddeler, çevresel ajanlar, hava kirliliğine sebep olan fotokimyasal ajanlar, pestisitler, hiperoksi, solventler, aromatik hidrokarbonlar, radyasyon, x-ray, UV ışınları, sıcak şokuda serbest radikal üretimini artırır [Konukoğlu, 1997].

2.5.Serbest Radikallerin Yol Açtığı Hasarlar

Reaktif oksijenler elektron almak üzere lipidler, proteinler, karbonhidratlar ve DNA ile reaksiyona girmektedirler. Bu oksidanlar fazla miktarda olduğunda membrandaki lipidlerin peroksidasyonuna yol açarak permeabilitenin bozulmasına, dolayısıyla hücre içi iyon dengesizliğine neden olmaktadır. Ayrıca karbonhidratların, proteinlerin, DNA ve RNA gibi moleküllerin yapısını bozarak birçok hastalığın oluşumunda önemli rol oynamaktadırlar [Sezer ve Keskin, 2014].



Şekil 2.4. Serbest radikallerin oluşturduğu hasarlar [URL-2]

2.5.1. Karbonhidratlar üzerine etkileri

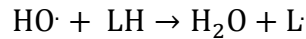
Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve oksoaldehitler oluşur. Açığa çıkan oksoaldehitler proteinlere bağlanabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki göstererek tesir ederler. Oksoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanır ve antimitotik etki göstererek kanser ve yaşlanmaya neden olurlar [Kayış, 2010].

2.5.2. Membran lipitlerine etkileri (Lipit peroksidasyonu (LP))

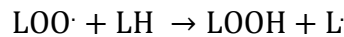
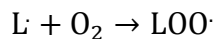
Biyomoleküller serbest radikaller tarafından etkilenir ancak serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan grup lipitlerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve doymamış çoklu yağ asitlerinin (PUFA) doymamış bağları, serbest radikallerle hızlıca tepkimeye girerek peroksidasyon ürünleri oluşturur ve bu olay kendi kendini devam ettiren zincir tepkimeler şeklinde ilerlemektedir. ROT'lar, hücre membranlarında lipit serbest radikalleri (L•) ve lipit peroksit radikallerinin (LOO•) meydana gelmesine neden olmaktadır. Serbest radikallerin sebep olduğu LP nonenzimatik lipit peroksidasyonu olarak adlandırılmaktadır [Çetik, 2014].

LP zinciri şu şekilde gerçekleşir:

- 1- Başlangıç: Hidroksil radikali ve süperoksit, bir yağ asidinin metilen kısmından bir hidrojen atomu kopararak bir lipit radikali oluşturur. LP, yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipit radikali özelliği kazanmasıyla başlar. Lipit radikali (L•) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Bu reaksiyon hem membran lipitleri hem besinsel yağlar için geçerlidir [Yarsan, 1998].



- 2- İlerleme: Lipit radikallerinin (L•) moleküler oksijenle (O₂) etkileşmesi sonucunda lipit peroksit radikalleri (LOO•) oluşmaktadır. Lipit peroksit radikalleri (LOO•), membran yapısındaki diğer doymamış çoklu yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipitperoksitlerine (LOOH) dönüştürürler ve böylece bu olay kendi kendini katalizleyerek devam eder. Bu LP'nin ilerleme aşamasıdır [Memişoğulları, 2005].



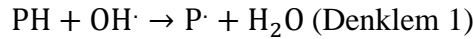
3- Sonlanma: LP, lipit peroksitlerinin (LOOH), aldehit ve diğer karbonil bileşiklerine yıkılması ile son bulur. Yıkıldıklarında, çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler meydana gelir ve bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilir ya da başlangıçtaki etki bölgelerinden hücreye difüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu MDA oluşur [Chauhan et al., 2004]. LP'nin çok rastlanan iki sonucundan birincisi membranların yapısal hasarı, ikincisi ise sekonder ürünlerin oluşmasıdır. Membran hasarı, endosiklizasyon, lipid-protein çapraz bağları, lipid-lipid çapraz bağları ve fragmente yağ açıl zincirlerinin oluşumu sonucu meydana gelirken, LP'nin ikincil ürünleri ise MDA, akrolein, 4-hidroksi-2-hekzenal (HHE) ve 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) gibi kimyasal olarak reaktif aldehitlerdir. Ürettiği reaktif aldehitlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar vererek doku hasarına ve birçok hastalığa sebep olur. LP ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür [Uyumlu, 2007].

2.5.3. Proteinler üzerine etkileri

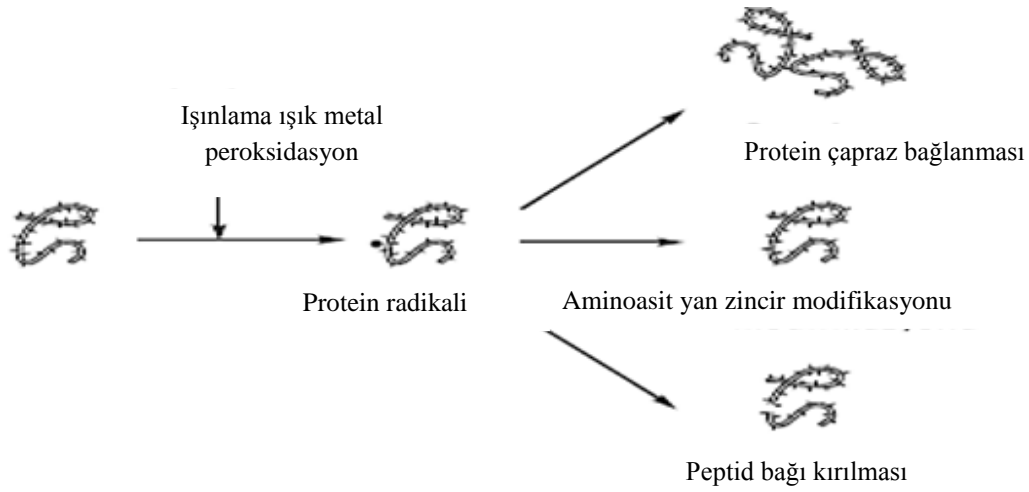
Protein oksidasyonu, proteinlerin ROT veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyonu sonucu oluşur. Protein oksidasyonu lipid oksidasyonuna benzeyip başlangıç, yayılma ve bitiş aşamalarından oluşan bir dizi zincirleme reaksiyon (otooksidasyon) ile gerçekleşir. Protein oksidasyonunun başlayabilmesi için ROT veya reaktif azot türevlerinin (RAT), protein molekülünden bir H atomu uzaklaştırması gerekmektedir. ROT ve RAT'lar biyolojik sistemlerde özellikle mitokondriyal elektron taşıma sistemlerinin reaksiyon ürünleri olarak oluşur. Ayrıca bu bileşikler radyasyona (x ve gamma ışınları), endüstriyel kimyasallara, metallere, v.b. maruz kalma gibi dış etkenler sonucu da oluşabilmektedir [Ergezer ve ark., 2014].

Protein molekülünden ROT ve RAT'lar aracılığı bir hidrojen atomunun ayrılmasıyla birlikte karbon merkezli bir radikal protein meydana gelir (P•) (Denklem 1). Oksijen varlığında bu radikal protein peroksi radikale (POO•) dönüşmekte (Denklem 2) ve peroksi radikali sağlam başka bir proteini hedef alarak buradan bir hidrojen atomunu kopartmak suretiyle hidroperoksit (POOH) oluşumuna sebep olmakta ve böylece

zincir reaksiyonları devam etmektedir (Denklem 3). Hidroperoksitler kararsız olup hızla bozunarak alkoksi ($PO\bullet$) ve hidroksi radikaline ($HO\bullet$) dönüşürler (Denklem 4) ve son aşamada protein, alkoksi ve peroksi radikalleri birleşerek radikal özellik göstermeyen protein karbonilleri gibi (Denklem 5) bileşiklere dönüşürler [Lund et al., 2011; Soladoye et al., 2015].



Lipid oksidasyonunda hedef molekül doymamış yağ asitleri olup ROT'lar çift bağ içeren karbonlara bitişik karbon molekülünden hidrojen atomunu ayırarak başlangıç reaksiyonlarını tetiklemekte ve lipid oksidasyonu tüm doymamış yağ asitlerinde aynı şekilde meydana gelmektedir. Ancak protein oksidasyonunda ROT ve RAT'ların hedefinde, aminoasitlerin hem merkezi karbon atomu hem de yan zincirleri bulunmaktadır ve dolayısıyla protein oksidasyonu reaksiyonları lipid oksidasyonu reaksiyonlarından biraz daha karmaşıktır. Protein oksidasyonu sonucu aminoasit yan zincirinde modifikasyonlar, peptid bağlarında kopmalar ve farklı proteinlerin birbirine çapraz bağlanmaları söz konusu olabilir (Şekil 2.5.). Aminoasit yan zincir modifikasyonu sonucu PK'lar ve protein hidroperoksitleri meydana gelir. Protein oksidasyonunun kantitatif olarak belirlenmesinde PK'lar en yaygın kullanılan belirteçlerdir. Bununla birlikte protein çapraz bağlanmaları sonucunda da disülfid ve ditirozin oluşumları meydana gelmektedir [Ergezer ve ark., 2014].



Şekil 2.5. Protein oksidasyonunun en yaygın sonuçları [Ergezer ve ark., 2014]

2.5.4. Nükleik asitler ve DNA'ya etkileri

DNA serbest radikallerden kolay etkilenen bir moleküldür. İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücre mutasyonuna ve hücre ölümüne sebep olabilir. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçer, hücre çekirdeğine kadar ulaşır ve burada hidroksil radikali oluşur. Oluşan hidroksil radikali dört DNA bazıyla kolayca reaksiyona girerek baz modifikasyonlarına yol açar ve böylece DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Süperoksit maruz kalan DNA molekülleri hayvanlara enjekte edildiklerinde daha fazla antijenik özellik gösterirler. Çünkü otoimmün bir hastalık olan sistemik lupus eritematozusta ve romatoid artritte dolaşımda anti-DNA antikorlar bulunur [Turan, 2014; Uyumlu, 2007].

2.6. Oksidatif Stres

Serbest radikaller organizmalarda devamlı oluşturulur, antioksidan savunma sistemiyle de düzenli olarak ortadan kaldırılırlar. Sağlıklı organizmalarda serbest radikaller ile antioksidan savunma mekanizması denge halinde çalışır. Bu dengenin bozulmasıyla oksidatif stres oluşur. Oksidatif stres, serbest radikaller üretildiği zaman artar; serbest radikallerin temizlenmesiyle veya oksidatif modifiye moleküllerin onarımıyla azalır. Oksidatif stresin azaltılması üç farklı basamakta gerçekleştirilebilir. Oksidasyona sebep olan çevresel zararlı maddeler azaltılabilir,

endojen ve eksojen antioksidanları arttırılabilir ve mitokondriyal enerji üretimini ve etkinliğini arttırılarak, oksidatif stres oluşumunu azaltılabilir [Kurt, 2008; Poljsak, 2011].

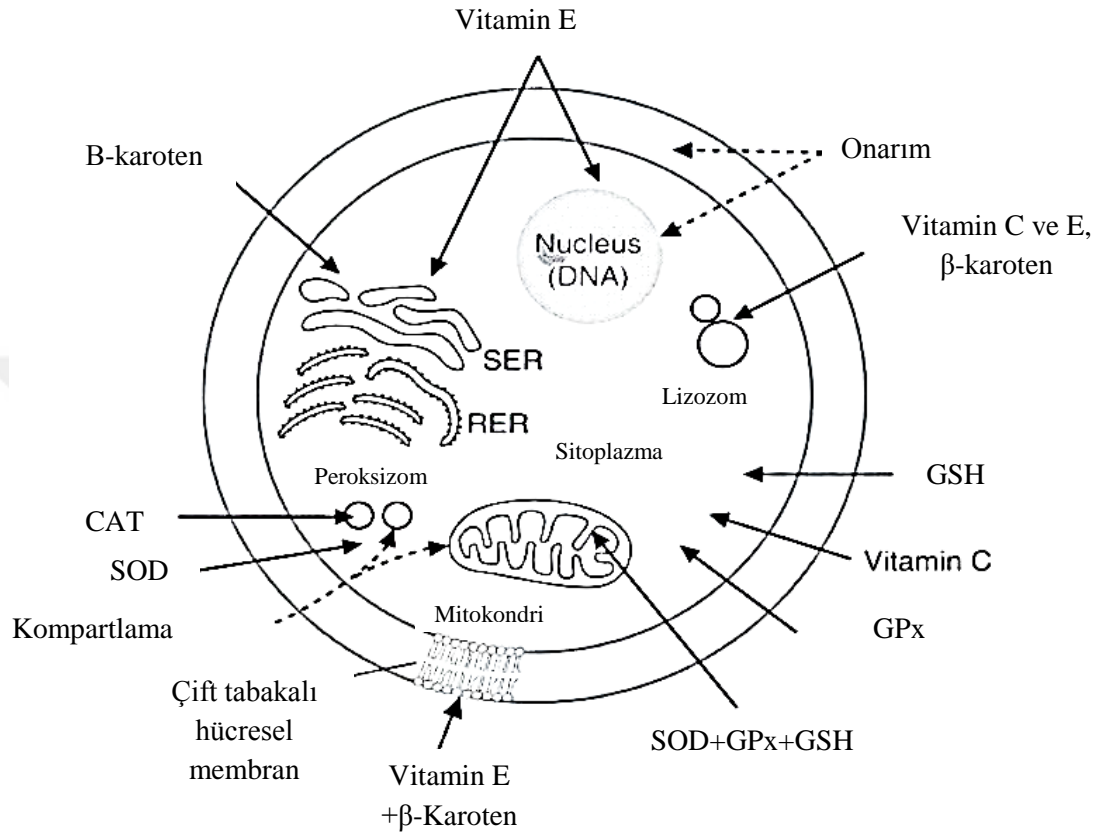
2.7. Antioksidanlar

ROT'ların oluşmasını ve ROT'ların meydana getirdiği hasarı önlemek amacıyla birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar kısaca "antioksidanlar" olarak bilinmektedirler. Antioksidanlar adından da anlaşılacağı üzere oksijenin diğer maddelerle birleşmesini önleyerek canlıdaki maddelerin okside olmasını engellerler [Karabulut ve Gülay, 2016]. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya ROT'ları toplayarak LP'yi engellerler. Antioksidan sistem bütün bunları yaparken serbest radikalleri hücre zarına, nükleik asitlere ve hücre bileşenlerine saldırmadan kendine çeker ve bağlar. Serbest radikalleri nötralize eden, serbest radikal hasarlarını tamir etmeye yardımcı olan ve vücudun onlardan etkilenmesini minimize eden veya kendini yenilemesini sağlayan besinlerde antioksidan sınıfındadır [Kunwar and Priyadarsini, 2011].

Antioksidanlar dört farklı şekilde etki ederler. Bunlar:

- 1) Toplayıcı Etki: Antioksidanlar serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları yakalar ya da daha zayıf yeni moleküle çevirirler. Antioksidanların bu etkisi toplayıcı etkidir. Antioksidan enzimler, trakeo bronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler [Memişoğulları, 2005].
- 2) Bastırıcı Etki: Antioksidanlar serbest oksijen radikallerini etkileyip onlara bir hidrojen aktarırlar. Böylece radikallerin aktivitelerini azaltır veya inaktif şekle dönüştürürler. Antioksidanların bu etkisi bastırıcı etkidir. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler [Şener ve Yeğen, 2009].
- 3) Zincir Kırıcı Etki: Antioksidanlar serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırar ve böylece radikallerin fonksiyonlarını engelleyici etki yapar. Antioksidanların bu etkisi zincir kırıcı etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler [Barber and Haris; Yıldız, 2014].

4) Onarıcı Etki: Antioksidanların serbest radikallerin oluşturdukları hasarı onarması onarıcı etkisidir.



Şekil 2.6. Hücrede antioksidan mekanizmaları [URL-2]

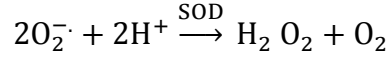
Antioksidanlar, endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olabilirler. Eksojen antioksidanlar; vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere üçe ayrılırlar. Endojen (doğal) antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

2.7.1. Enzim olan endojen antioksidanlar

Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1)

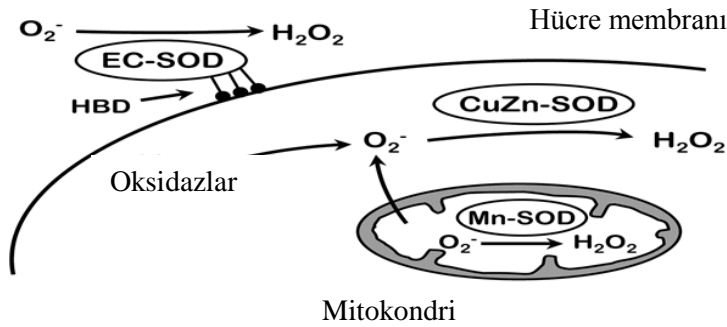
SOD enzimi hemen hemen bütün aerobik organizmalarda bulunup, antioksidan savunma sisteminin ilk basamağını oluşturur. Yani serbest radikallere karşı organizmadaki ilk savunma SOD enzimiyle gerçekleşir. SOD enzimi, süperoksit radikalının, hidrojen perokside ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize ederek

bu radikallerin etkisini azaltmaktadır. SOD ayrıca LP'yi inhibe eden bir metalloenzimdir [Karabulut ve Gülay].



SOD enzimi hem antioksidan (süperoksit anyonunu uzaklaştıran) hem de prooksidan (hidrojen peroksidin enzimatik oluşumunu sağlayan) olarak görev yapmaktadır. SOD enzimi H_2O_2 ürettiği için, H_2O_2 uzaklaştırıcı enzimler olan GPx ve CAT enzimleriyle işbirliği halinde çalışıp H_2O_2 'yi etkisiz hale getirmektedir. Oksijen kullanımı fazla olan dokularda SOD aktivitesi yüksek olurken, hücre dışı sıvılarda SOD aktivitesi çok düşüktür [Tuna, 2007].

İnsanlarda SOD'un üç farklı formu bulunur. Bunlardan Cu ve Zn içeren bakır çinko süperoksit dismutaz (Cu/Zn-SOD) sitozolde, Mn içeren mangan süperoksit dismutaz (Mn-SOD) mitokondride ve ekstrasellüler süperoksit dismutaz (EC-SOD) hücre dışı sıvılarda bulunmaktadır [Karabulut ve Gülay].



Şekil 2.7. SOD'un üç farklı formu ve hücrede bulunduğu kısımlar

SOD izoenzimlerinden sitozolik dimerik Cu/Zn-SOD, 32 kda molekül ağırlığına sahiptir ve iki eşit alt üniteden oluşmaktadır. Her bir alt ünitesinde bir Cu ve bir Zn atomu içerip, hücrelerde en çok bulunan SOD formudur. Bir diğer SOD izoenzimi olan mangan Mn-SOD, 80 kda molekül ağırlığındadır. Mitokondriyal bir enzim olup dört eşit alt üniteye sahiptir. Aktif bölgesinde Mn^{+3} bulunur ve farklılıklara rağmen Cu/Zn-SOD ile aynı tepkimeleri katalizlemektedir. Mitokondrideki süperoksit radikaline etki eden tek enzim Mn-SOD'dur. Mn-SOD organizmadaki tüm SOD

aktivitesinin sadece %10-15'ini oluşturduğu halde yapılan araştırmalarda doğuştan Mn-SOD eksikliği olan fareler 5-10 gün içinde ölürken, Cu/Zn-SOD ve EC-SOD eksikliği olan fareler hayatta kalabilirler [Zejnıloviç, 2007].

Mn-SOD mitokondride süperoksit radikallerinin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eden çok önemli bir antioksidan enzimdir. Normal fizyolojik koşullar altında, mitokondri süperoksid üretiminin başlıca kaynağıdır. Birçok çalışma, Mn-SOD' un hücrelerin oksidatif stresden korunmasında ve tümör oluşumunu inhibe etmesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Mn-SOD, bakterilerden insanlara kadar neredeyse tüm aerobik ve hatta anaerobik organizmalarda bulunan bir metaloenzimdir [Weisiger and Fridovich, 1973].

Mn-SOD, prokaryotik hücrelerdeki sitoplazma boyunca eşit olarak dağıtılır. Çok hücreli ökaryotik hücreler için, Mn-SOD sadece mitokondri ile ilişkilidir. İnsan Mn-SOD bir homotetremerdir. Aktif bölge metal kompleksi ve dört protein yan zincirinden oluşur. Aktif bölgedeki manganez, iki süperoksit radikali arasında bir elektron transferi gerçekleştirir. Mn-SOD ailelerinde kesinlikle muhafaza edilen bir dizi kalıntı, katalitik işlev için esastır. Pek çok farklı tümör türü düşük Mn-SOD seviyesini ifade eder. Mn-SOD' nun aşırı ekspresyonu tümörü bastırır. Çok sayıda bulgu Mn-SOD' un bir tümör giderici olduğunu desteklemektedir [Oberley and Buettner, 1979].

Mitokondriyal enzim bir nükleer gen tarafından kodlanır ve iki mitokondriyal membrandan matrikse taşınması gerekir. Mn-SOD' un mitokondriyal matrikse verilmesi organel fonksiyonu için gereklidir. Mn-SOD katalizör mekanizmasındaki temel çalışmalar kinetik çalışmalarla aydınlatılmıştır. Enzimatik reaksiyon, iki farklı yarım reaksiyonu içeren bir katalitik döngü ile bir bimoleküler reaksiyondan oluşur; Süperoksit substratın oksijene oksidize edildiği bir oksidatif reaksiyon ve süperoksitin H₂O₂' ye dönüştüğü bir indirgeme yarım reaksiyonundan oluşur [Bull et al., 1991].



Bu iki reaksiyon, metal iyonunun oksidasyon durumunda ve indirgeyici yarı reaksiyonda proteinlerin tutulumunda farklılık gösterir. Mn-SOD için kristal yapılar yüksek çözünürlükte çözülmüştür.

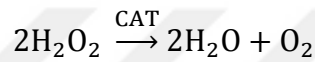
Mn-SOD, hücrelerin oksidatif hasarlara karşı korunmasında ve hücrel metabolizmanın aşırı oksidan ve istenmeyen bir yan ürünü olan süperoksitin hücrel konsantrasyonunun düzenlenmesinde anahtar rol oynar. Mn-SOD düzeylerindeki değişiklikler, Parkinson hastalığı, Duchenne kas distrofisi, Charcot-Marie-Diş hastalığı ve Kennedy-Alter-Sung sendromu dahil bir dizi nörodejeneratif hastalıkla ilişkilendirilmiştir [Luo, 2001].

Pek çok farklı tümör türünde düşük Mn-SOD aktivitesi olduğu gösterilmiştir. Mn-SOD' nun aşırı ekspresyonu (ifade edilmesi), insan melanom hücrelerinin, meme kanseri hücreleri ve glioma hücrelerinin tümörjenisitesini bastırır, bu Mn-SOD' un çok çeşitli kanserlerde bir tümör baskılayıcı olduğunu düşündürmektedir. Örneğin, St. Clair ve arkadaşları, Mn-SOD ile tümör metastazının bastırılmasının, azaltılmış tümörjenitesi ve yüksek fibronektin ile ilişkili olduklarını bildirmiştir. Tüm Mn-SOD ile transfekte edilen hücrelerden türetilen tümörlerin median tümör büyüme sürelerinin ebeveyn hücrelerinkinden daha uzun olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca, Mn-SOD ile transfekte edilen hücre hatlarında artmış hücre dışı matris fibronektin seviyeleri bildirilmiştir [Clair et al., 1997].

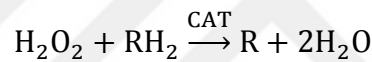
EC-SOD, 135.000 kDa moleküler ağırlığındadır. EC-SOD, her bir alt ünitesinde bir Cu ve bir Zn atomu bulundurup, enzimatik aktivite için gereklidir. EC-SOD' ın öncelikli yeri ekstrasellüler matriks ve hücre yüzeyleridir. Bu bölgelerde plazmada bulunandan daha yüksek yoğunlukta EC-SOD bulunur. EC-SOD, fibroblast hücreleri, glia hücreleri ve endotel hücreleri tarafından sentezlenip, salgılanmaktadır. Akciğer dokusunda tip II epitel hücrelerinin, solunum yolları ve kan damarlarını çevreleyen düz kas hücrelerinin yoğunluğuna bağlı olarak EC-SOD seviyeleri yüksektir. Ekstrasellüler düzeyde enzimatik olarak süperoksitleri etkisizleştirebilen tek antioksidan olması sebebiyle, EC-SOD oksidan hasarı, yangı ve fibrozis gibi birçok akciğer hastalıklarından korunmada çok önemli bir göreve sahiptir [Karabulut ve Gülay, 2016].

Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6)

Katalaz yapısında Fe⁺³ bulduran 4 hem grubundan oluşmuş bir hemoproteindir. Peroksizomlarda yuşsek derişimlerde bulunur. Daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. Katalaz aktivitesi eritrosit, karaciğer ve böbrekte yoğundur. SOD'un oluşturduğu H₂O₂' yi CAT enzimi peroksidazlarla beraber oksijen ve suya parçalar. H₂O₂, CAT tarafından paralanmazsa vucut için çok tehlikeli bir serbest radikal olan hidroksil radikalinin nculu olarak davranır ve böylece bu radikal hucrede kalıcı hasarlara sebep olur [Memişoğulları, 2005].



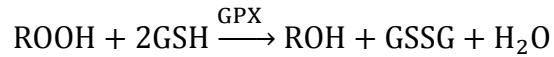
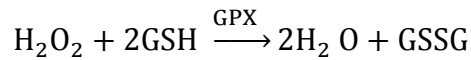
Ayrıca katalaz fenol, alkol gibi farklı substratların, hidrojen peroksitin ift redüksiyonu ile detoksifikasyonunu sağlar [Antmen, 2005].



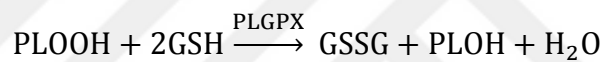
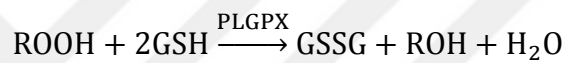
Glutasyon peroksidaz (GPx, EC 1.11.1.9)

GPx, 85 kd molekuler ağırlığındadır, sitozolde bulunur, 4 selenyum atomu içerir, tetramerik yapıdadır ve hidroperoksitlerin detoksifikasyonundan sorumlu enzimdir. Ayrıca, GPx lipit peroksidasyonunun başlamasını ve gelişimini engelleyici özellikte olan bir enzimdir. Selenyuma bağımlı ve bağımsız olmak uzere iki farklı tipi bulunur. Bağımsız GPx sadece lipit hidroperoksitleri, buna karşılık selenyuma bağımlı olanı ise H₂O₂' yi ve lipit hidroperoksitleri metabolize ettiği saptanmıştır. Enzim aktivitesinin en yoğun olduğu dokular eritrosit ve karaciğerdir [Kıran, 2007; avuşoğlu, 2009].

GPx organik hidroperoksitlerin (lipit hidroperoksitler, DNA hidroperoksitler) veya H₂O₂' nin GSH tarafından indirgenmesi tepkimesini katalize eder. GPx, GSH' ı okside ederek H₂O₂' yi H₂O' ya indirgemekte ve glutasyonun okside formunun (GSSG) tekrar GSH' ya indirgenmesi ise glutasyon reduktaz (GR) tarafından gerçekleştirilmektedir [aylak, 2011].

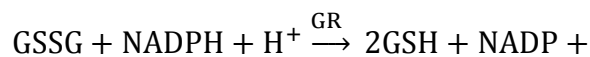


Molekül ağırlığı 20 kd olan fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PLGPx) monomerik yapıda, selenyum ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz enzimi membran fosfolipid hidroperoksitleri (PLOOH) alkole indirger ve ayrıca E vitamini yetersizliğinde PLGPx membranı peroksidasyona karşı korur.



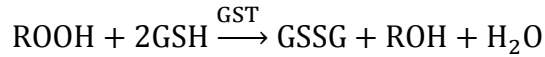
Glutatyon redüktaz (GR, EC 1.6.4.2)

GR, FAD içeren flavoprotein bir enzimdir ve NADPH'nin bir elektronunu okside glutatyonun disülfid bağlarına aktararak yeniden GSH'ye dönüşümünü katalizler. Bu nedenle NADPH serbest radikal hasarını engellemek için gereklidir olup en önemli kaynağı heksoz monofosfat (pentoz fosfat) yoludur [Gülay ve Karabulut].



Glutatyon S-transferazlar (GST, EC 2.5.1.18)

GST, sitozolde bulunup dimerik yapıya sahiptir. GST, başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipit peroksitlerine karşı selenyum-bağımsız GPx aktivitesi göstererek bir antioksidan savunma mekanizması meydana getirir. GST, ksenobiyotik ve karsinojenlere karşı hücrel savunmada yer alan, taşıdığı bir elektrofilik merkez ve indirgenmiş GSH ile konjugasyon yoluyla daha çözünebilir ve daha kolay ayrıştırılabilir bileşiklere dönüştüren, intraselüler bir protein ailesidir [Kıran, 2007, URL-2].



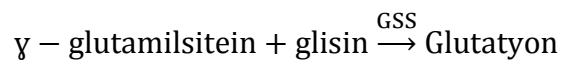
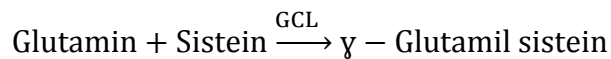
Karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi tarafından reaktif ara ürünlere dönüştürülen yabancı maddeleri, glutatyon transferazlar daha az reaktif konjugatlara dönüştürür. Bu işlemi yaparken GSH'daki sisteine ait –SH grubunu yabancı maddelere bağlayarak elektrofilik bölgelerini nötralize eder ve böylece ürünü daha fazla suda çözünür hale getirerek organizmadan atılımını sağlar [Akkuş, 1995].

2.7.2. Enzimatik olmayan endojen antioksidanlar

Glutatyon, melatonin, seruloplazmin, transferrin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, sistein, metiyonin, ürat, laktoferrin ve albümin enzimatik olmayan antioksidanlara örnek verilebilir.

Glutatyon (GSH)

Suda kolayca çözünebilen, organizmanın tüm hücrelerinde bulunan glutamikasit-sistein-glisinden sentezlenen bir tripeptittir. Glutatyonun sentezlenmesi iki aşamada gerçekleşir. İlk aşamada glutamin-sistein ligaz (GCL), glutamin ve sisteini bağlayarak γ -glutamilsisteini oluşturur. İkinci aşamada glutatyon sentetaz (GSS), γ -glutamilsisteine glisini bağlayarak GSH molekülünü oluşturur. Glutamin-sistein ligaz, katalitik (GCLC) ve düzenleyici (GCLM) alt birimlerden meydana gelir. Glutamin-sistein ligazın katalitik alt birimi, katalitik aktivite için sistein ve glutaminin bağlanmasından sorumludur; düzenleyici alt birimi ise GCLC'nin etkisini artırır [Gülay ve Karabulut].

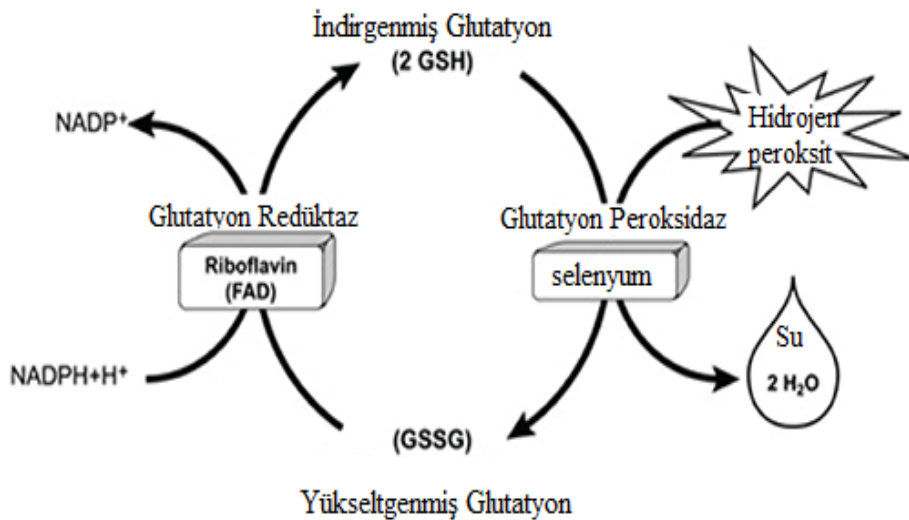


GSH redoks döngüsünün bir substratı olarak, hidroksil radikalleri ile singlet oksijenin temizlenmesinde rol alır. Direk olarak serbest radikalleri temizlemesinin yanısıra; GPx ile birlikte enzimatik olarak da etki gösterir. GSH hücrelerde enzim ve diğer hücre sel bileşenlerin redükte halde tutulmamaları için hayati rol oynar. GSH en çok karaciğerde sentezlenir ve yaklaşık % 40'ı safra ile atılır. Safradaki bu GSH'nın

diyetteki ksennobiyotiklere karşı vücudu koruduğu, barsak lümenindeki lipid peroksidasyonu önlediği ve barsak epitelyumunu oksijen radikallerine karşı savunduğu düşünülmektedir [Çaylak, 2011; Maher et al., 2008]

GSH, hücreleri oksidan hasara karşı koruyan hücre içindeki en önemli antioksidan bileşiktir. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino asitlerin membranlardan transportunu da sağlar. GSH eritrositleri, lökositleri ve göz merceğini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir [Şener ve Yeğen].

Birçok hücrede bulunan ve bir tripeptid-tiol olan GSH, H_2O_2 'yi kimyasal olarak detoksifiye edebilir. GPx tarafınan katalizlenen bu reaksiyon sonucu, artık koruyucu özellikte olmayan GSSG oluşur. Hücre, indirgeyici elektronların kaynağı olarak NADPH'ı kullanan GR'nin katalizlediği bir reaksiyon ile GSH'ı tekrar oluşturur. Böylece, NADPH hidrojen peroksidin indirgenmesinde indirekt olarak elektronları sağlar.

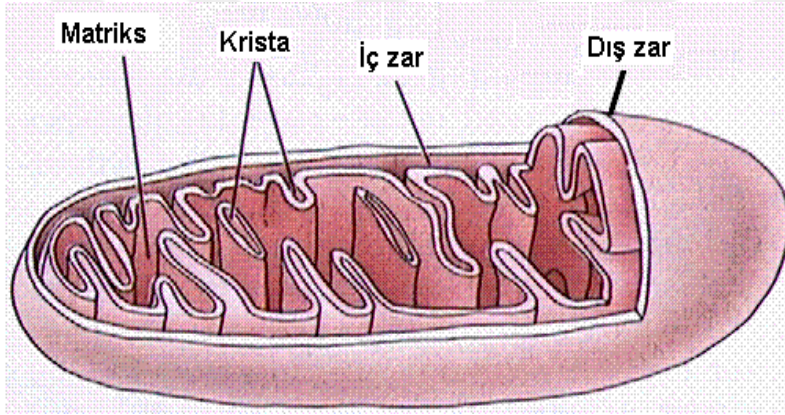


Şekil 2.8. Hidrojen peroksidin, NADPH tarafından glutasyon aracılığıyla indirgenmesi

2.8. Mitokondri

2.8.1. Mitokondrinin yapısı

Mitokondri sitoplazmada bulunan ve besinden enerji üreten organeldir. Hücre içindeki sayıları hücrenin enerji ihtiyacına göre doğru orantılı olarak değişir. Mitokondriler hücrenin toplam hacminin yaklaşık % 20 gibi büyük bir kısmını kaplar. Mitokondri organellerinin büyüklüğü ve şekli değişiklik gösterebilir. Bunlar birkaç yüz mikron çapında küresel şekilde olabilecekleri gibi, bir mikron çapında iplikçi şekilde de olabilmektedirler. Mitokondrinin yapısında iç ve dış membran, membranlar arası boşluk, matriks ve krista bulunur [Coşkun, 2011].



Resim 2.1. Mitokondri yapısı

Dış zar birçok iyonun ve küçük moleküllerin serbest geçişini sağlayan porlar taşır. Membranlar arasındaki boşluk bu moleküllerin geçişine engel olmaz. İntermembranal boşluk, mitokondriyal matriks ile sitoplazma arasında sıkı bir bariyer kurar. Dış zar krebs çemberinde katalizör rolü oynayan monoamine oksidaz, sitokrom-c redüktaz enzimleri yanısıra fosfolipit ve fosforik asit sentezi için gerekli birçok enzime sahiptir [Shao et al., 2008; Akarsu, 2014].

Mitokondri iç zarı çok kıvrımlıdır. Bu kıvrımlara krista adı verilir ve membran yüzey alanını ileri derecede artırırlar. Elektron transport zinciri enzimleri ve oksidatif fosforilasyona ait enzimler burada yerleşmiştir. Mitokondri iç zarı beş ayrı enzim kompleksine ayrılabilir ve bunlara kompleks I, II, III, IV, V adı verilir.

Kompleks I (Nikotinamid adenin dinükleotit (NADH): ubikinon oksidoredüktaz), kompleks II (süksinat:ubikinon oksidoredüktaz), kompleks III (ubikinol: ferrositokrom c oksidoredüktaz), kompleks IV (ferrositokrom c: oksijen oksidoredüktaz veya sitokrom c oksidaz), ve kompleks V (ATP sentaz)'dır. Kompleks I, II, III, IV' ün her birisi elektron transport zincirinin bir bölümünü içerir. Kompleks V ise ATP sentezini katalize eder [Clay et al., 2011].

Her kompleks elektronlarını, koenzim Q ve sitokrom C gibi göreceli olarak hareketli elektron taşıyıcılarına verir. Ayrıca ATP, ADP ve P₁, piruvat, süksinat, malat, sitrat ve α -ketoglutarat gibi özel maddeler için taşıma sistemine sahiptirler. İç zar seçici geçirgenlik gösterir. İç zar H⁺, Na⁺, K⁺ da dahil olmak üzere küçük iyonların çoğuna, ATP, ADP, piruvat gibi küçük moleküllere ve mitokondri fonksiyonu için önemli olan diğer metabolitlere geçirgen olmayan özelleşmiş bir yapıdır. İyonların ve moleküllerin bu membrandan geçebilmesi için özelleşmiş taşıyıcılara veya transport sistemlerine gerek vardır [Harvey et al., 2007].

Matriks jel kıvamında olup içinde erimiş birçok enzim bulunur. Bu enzimler, iç membranda yerleşmiş oksidatif enzimlerle işbirliği yaparak besinlerin CO₂ ve H₂O' ya çevrilmesine sonuç ATP adı verilen yüksek enerjili bir maddenin oluşumuna neden olurlar. Matriks sıvısı yüzde elli proteinden oluşur. Bu sıvı piruvat, aminoasitler ve yağ asitlerinin oksidasyonundan sorumlu enzimleri (beta oksidasyon) ve TCA döngüsü enzimlerini içerir. Ayrıca matrikste NAD⁺ ve FAD ile ATP sentezi için gerekli olan ADP ve Pi bulunur. Mitokondrilerde matrikste ayrıca hücre çekirdeğindeki benzeyen fakat tamamen aynı olmayan mitokondriyal DNA, RNA ve mitokondriyal ribozomlar da bulunmaktadır. Mitokondriyal DNA mitokondrilerin çoğalmasında rol oynar. İntron ve histondan yoksun sirküler ve polisistronik DNA'sı ile mitokondri bakterilere benzetilmektedir. Mitokondriyal DNA 16.6-kilobayt (kB)'lık genoma sahiptir ve 37 gen içerir. Bu genlerden 22'si transfer RNA, 2'si ribozomal RNA'dan sorumludur. Diğer genlerden 7'si ETS kompleks I, 1'i kompleks III, 3'ü kompleks IV, 2'si kompleks V fonksiyonlarında yer alır [Wallace, 2005].

2.8.2. Hücresel solunum ve mitokondriyal enzimler

Hücresel solunum glikoliz, TCA döngüsü ve ETS olmak üzere üç evrede gerçekleşir.

Glikoliz

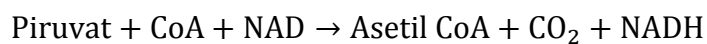
Glikozun çeşitli enzimler yardımıyla pirüvata kadar yıkımına glikoliz denir. Glikoliz oksijenli ve oksijensiz solunumun ortak basamağı olup tüm canlı hücrelerde sitoplazmada gerçekleşir. Ara ürünlerden kopan hidrojen atomları NAD^+ koenzimi tarafından yakalanır. Glikozun aktivasyonu için 2 ATP harcandıktan sonra, substrat seviyesinde fosforilasyon ile 4 ATP üretilir. Böylece hücrenin net kazancı 2ATP'dir.

AsetilCoA Oluşumu

Pirüvatin TCA döngüsüne girebilmesi için önce mitokondri içine alınması gerekir. Bu olay pirüvatin iç mitokondriyel membrandan geçmesine yardımcı olan, özgün bir pirüvat taşıyıcısı ile sağlanır. Glikoliz sonucu oluşan iki pirüvatin oksidatif dekarboksilasyonu ile asetil CoA meydana gelir. Bu aktifleşmiş asetil birimi, mitokondri matriksinde bir seri reaksiyonla CO_2 'ye kadar tamamen oksitlenir.

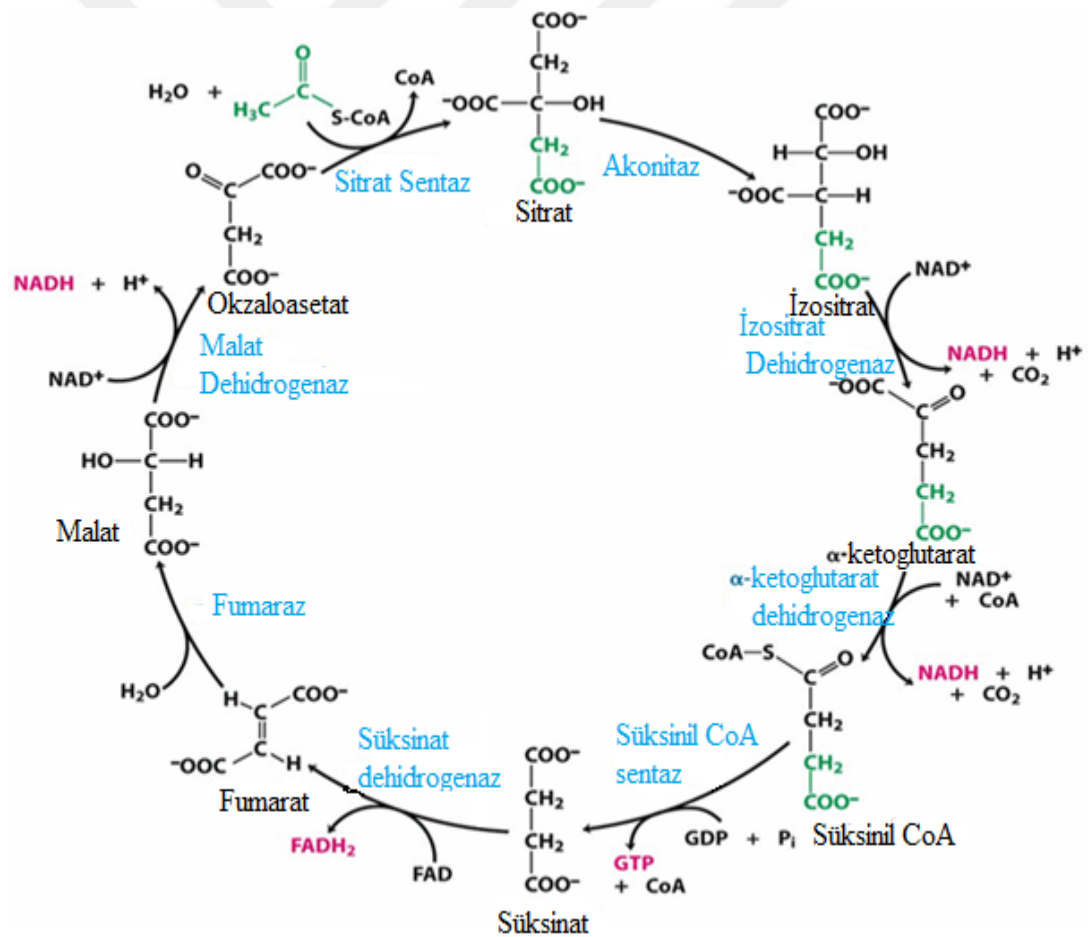
Pirüvat Dehidrogenaz

Glikoliz ile TCA döngüsü arasındaki bağlantı, matriksteki pirüvatin dekarboksilasyonla asetil CoA'ya çevrilmesi sonucu kurulmaktadır. Sitoplazmada meydana gelen pirüvat iç membranda bulunan spesifik 'pirüvat taşıyıcı proteini' tarafından bir H^+ beraberliğinde yada OH^- karşılığında mitokondri matriksine taşınır. Pirüvat matrikse gelince, burada bulunan **pirüvat dehidrogenaz kompleksi** tarafından asetil CoA'ya dönüşür. Bu reaksiyon tersinmezdir. Böylece asetil CoA'dan glukoz oluşumu engellenir. Pirüvat dehidrogenaz kompleksi tamamen TCA döngüsünün bir parçası değildir ama döngünün iki karbonlu substratı olan asetil CoA'nın ana kaynağıdır [Keha ve Küfrevioğlu, 2010].



Trikarboksilik Asit Siklüsü (TCA)

Oluşan asetil CoA, trikarboksilik asit döngüsüne (sitrik asit devri) girer. Dört karbonlu bileşik olan okzaloasetat, iki karbonlu asetil CoA ile birleşerek altı karbonlu bir sitrati meydana getirir. Sitrata dekarboksile olarak beş karbonlu bir bileşik olan alfa-ketoglutarat meydana gelir. Bununla oksidatif dekarboksilasyonu ile dört karbonlu süksinat meydana gelir. Daha sonra süksinat çeşitli oksidasyon basamaklarından geçerek tekrar okzaloasetata çevrilerek döngü tamamlanır. Sonuçta 4CO_2 , $6\text{NADH}+6\text{H}$ ve 2FADH_2 molekülü ile substrat seviyesinde fosforilasyon ile 2 ATP üretilir. Bu aşamaya kadar oluşan NADH ve FADH molekülleri ETS'ye aktararak ATP sentezinde kullanılır [Çelik, 2007].



Şekil 2.9. TCA döngüsü ve enzimleri

Sitrat Sentaz (EC 2.3.3.16)

TCA döngüsü okzaloasetatın sitrat sentaz enzimi aracılığıyla asetil CoA'nın asetil grubuyla birleşme reaksiyonu ile başlar. Bu bir hidroliz olayını içerdiğinden bir su molekülü de kullanılır. Önce okzaloasetat, asetil CoA ile kondanse olarak sitril CoA oluşturur sonra da sitrat ve CoA'ya hidroliz olur. Sitrat sentaz, allosterik olarak Ca^{+2} ve ADP ile aktive edilir. ATP, NADH, süksinil CoA ve yağ açıl CoA türevleri tarafından da inhibe edilir. Bununla beraber reaksiyonun hızını öncelikle belirleyen okzaloasetat ve asetil CoA varlığıdır. Sitrat TCA döngüsü ara ürünü olması yanı sıra yağ asitlerinin sitozolik sentezleri için asetil CoA kaynağında oluşturur. Sitrat ayrıca glikolizin hız belirleyici enzimi olan fosfofruktokinazı inhibe eder. Yağ asiti sentezinin hız kısıtlayıcı enzimi olan asetil CoA karboksilazı aktive eder [Keha ve Küfrevioğlu, 2010].

Akonitaz (EC 4.2.1.3)

İkinci reaksiyon sitratın önce bir dehidrasyon, daha sonradan da bir hidrasyon olayı ile izositrata dönüştürülmesidir. Bunun sonucu olarak molekül karbon atomları arasında H ve OH değişimi görülür. Her iki basamağında katalizleyen enzime ara bileşik cis-akonitatdan dolayı akonitaz adı verilir. Bu enzimin aktif bölgesinde Fe bulunur [Harvery et al., 2007].

İzositrat Dehidrogenaz (ISD, EC 1.1.1.42)

İzositratın alfa-ketoglutarata oksidatif dekarboksilasyonu, ISD enzimi tarafından katalizlenir. Bu ilk redoks reaksiyonudur. Reaksiyonun ara bileşiği okzalsüksinat olup, enzime bağlı iken hemen CO_2 ve alfa-ketoglutarata parçalanır. ISD, izositratın tersinmez oksidatif dekarboksilasyonunu katalizleyerek döngüde oluşan üç NADH molekülünün birincisini ve ilk CO_2 'yi açığa çıkarır. Bu TCA döngüsünün hız kısıtlayıcı basamaklarından birisidir. Enzim Ca^{+2} ve ADP tarafından allosterik olarak aktive edilir. Hücrede enerji depoları dolu olduğu zaman miktarları artan ATP ve NADH'la da inhibe edilir. Hücrelerde iki çeşit ISD enzimi vardır. Bunlardan birisi NAD^{+} yi, diğeri de $NADP^{+}$ yi koenzim olarak kullanır. Sitrik asit devrinde önemli olan NAD^{+} li enzim mitokondride yer alırken, $NADP^{+}$ spesifik enzim hem

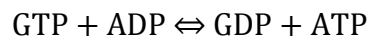
mitokondri, hem de sitozolde bulunur ve farklı bir metabolik yola sahiptir [Keha ve Küfrevioğlu, 2010].

Alfa Ketoglutarat Dehidrogenaz (α -KD, EC 2.3.1.61)

TCA döngüsün dördüncü reaksiyonu, alfa ketoglutaratın oksidatif dekarboksilasyonu ile süksinal CoA'ya dönüşümüdür. Bu olay üç enzimatik aktive içeren α -KD kompleksi tarafından gerçekleştirilir. Gerekli olan koenzimler tiyamin pirofosfat, lipoik asit, FAD, NAD⁺ ve koenzim A'dır. α -KD kompleksini ATP, GTP, NADH ve süksinil CoA inhibe ederken, Ca⁺² aktive eder [Keha ve Küfrevioğlu, 2010].

Süksinil CoA Sentetaz (Süksinat tiokinaz, E.C.6.2.1.5)

Beşinci basamakta süksinil CoA sentetaz, süksinil CoA'nın yüksek enerjili thioester bağını kırar. Süksinal CoA bu enzim ile süksinata dönüşür. Süksinil CoA'daki tiyoester bağı enerjice zengin bir bağıdır. Bu tiyoester bağının parçalanması guanizin difosfatın fosforillenmesiyle beraber yürür. GTP'deki fosforil grubu kolayca ADP'ye aktarılarak ATP sentezlenir. Bu transfer reaksiyonu nükleosit difosfokinaz enzimi tarafından katalizlenir [Keha ve Küfrevioğlu, 2010].



Süksinat dehidrogenaz (EC, 1.3.5.1)

Süksinatın fumarata oksidasyonu süksinat dehidrogenaz enzimi tarafından gerçekleşir. Bu reaksiyonun serbest enerjisi NAD⁺'yi indirgemeye yeterli olmadığı için hidrojen alıcısı FAD'dır. Süksinat dehidrogenaz FAD'nin yanısıra dört adet Fe ve dört adet de inorganik kükürt(S) içerir. Demir atomları, inorganik ve protein yapısındaki sistein rezidüleri kükürt atomlarına bağlıdır. Bu tipteki bir protein, demir-kükürt (FeS) proteini veya hem (demir ihtiva eden porfirin halkası, hemoglobindeki gibi) yapısında olmayan demirli protein adını alır. Süksinat dehidrogenaz, birisi FAD ve ikisi FeS kümesi ihtiva eden 70 kda molekül ağırlığında, diğeri de 27 kda ağırlığında ve tek bir FeS kümesi taşıyan iki alt birimden ibarettir. Bu enzim iç mitokondri zarının bir integral proteini olarak da TCA döngüsün diğeri enzimlerinden ayrılır. Gerçekten süksinat dehidrogenaz elektron

transport sistemine direk bağlıdır. FADH₂ oluştuğu zaman NADH gibi enzimden ayrılmaz. Yapısındaki iki elektronu doğrudan enzimdeki Fe⁺³ atomlarına ve oradan da ETS'deki CoQ'ya aktarır. Süksinat dehidrogenaz okzaloasetatla inhibe olur [Keha ve Küfrevioğlu, 2010; URL-2].

Fumaraz (Fumarat hidrataz, EC 4.2.1.2)

Fumaratın L-malata hidrasyonu, fumaraz enzimi tarafından katalizlenirken, H ve OH stereospesifik olarak trans halde katılarak yalnız L-malat izoemerinin oluşumu gerçekleştirilir [Keha ve Küfrevioğlu, 2010].

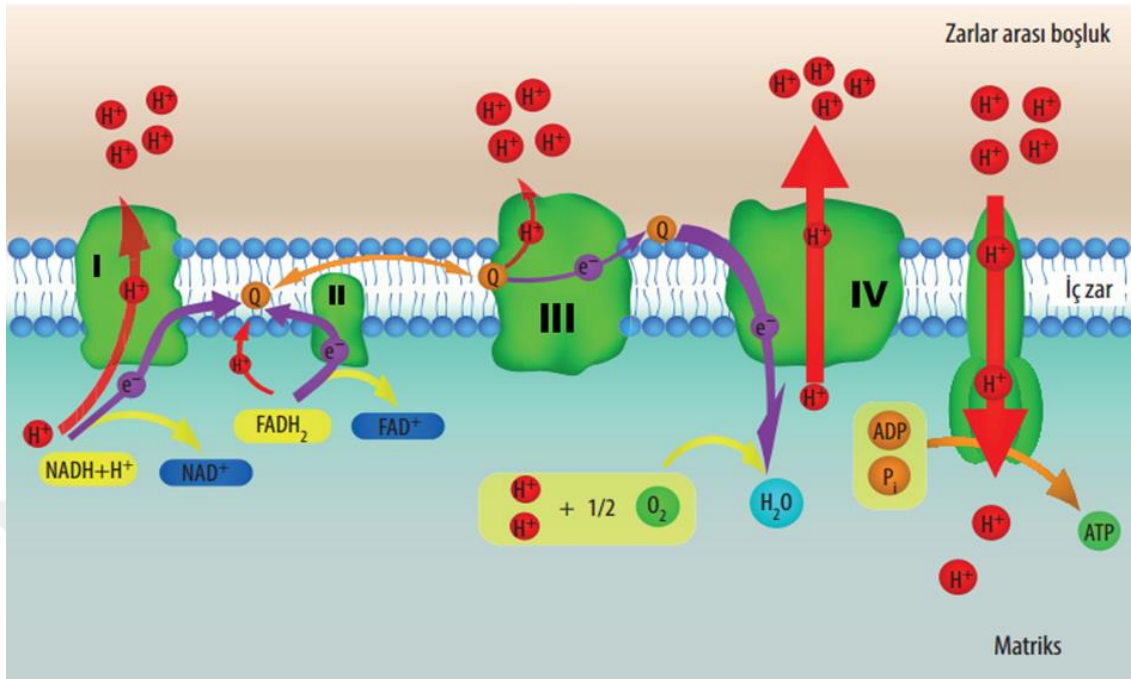
Malat dehidrogenaz (MD, E.C.1.1.1.37)

Son olarak malatın okzaloasetata yükseltgenmesi reaksiyonu, malat dehidrogenaz enzimi katalizörlüğüyle ve NAD⁺ elektron alıcısı beraberliğinde meydana gelir [Keha ve Küfrevioğlu, 2010].



Elektron taşıma sistemi (ETS) ve oksidatif fosforilasyon (OF)

ETS, NADH ve FADH₂ gibi elektron taşıyıcılarının verdikleri elektronları ETS elemanlarında redoks tepkimelerine sokarak ATP üretimini sağlayan sistemin adıdır. Mitokondri iç zarı beş ayrı enzim kompleksine ayrılabilir ve bunlara kompleks I, II, III, IV, V adı verilir. Kompleks I, II, III, IV'ün her birisi elektron transport zincirinin bir bölümünü içerir. Kompleks V ise ATP sentezini katalize eder. Her kompleks elektronlarını koenzim Q ve sitokrom C gibi göreceli olarak hareketli elektron taşıyıcılarına verir. Elektron transport zincirinin her taşıyıcısı bir elektron vericisinden elektronlarını alır, zincirdeki bir sonraki taşıyıcıya verir. Bu elektronlar sonunda oksijen ve protonlarla birleşerek su oluştururlar.



Resim 2.2. Elektron taşıma sistemi birimleri

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

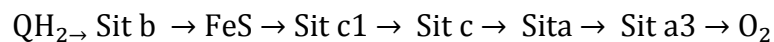
İlk reaksiyon NADH'ın, NADH dehidrogenaz multienzim kompleksi aracılığıyla yükseltgenmesidir. Bu multienzim kompleksi bakterilerde en az 16, ökaryotlarda 43 polipeptid zincirinden oluşmaktadır. NADH'dan iki elektron, enzimin prostetik grubu olan flavin mononükleotid (FMN)'e aktarılarak FMNH₂'ye indirgenir, sonra elektronlar FMNH₂'den NADH dehidrogenaz kompleksinin bir başka prostetik grubunu teşkil eden bir seri demir-kükürt(FeS) komplekslerine aktarılır. Burada demir atomları 'hem' grubuna ait değildir. NADH dehidrogenaz enzimidaki demir-kükürt merkezlerinden elektronlar, koenzimQ (CoQ)'ya transfer edilir [Harvery et al., 2007].

CoQ uzun bir izopren zinciri takılı bir kinon türevi olup Ubikinon olarak da isimlendirilir. İzopren birimlerinin sayısı türden türe değişir. Memelilerde en bol bulunan n=10 izopren birimine sahiptir ve CoQ 10 olarak gösterilir. İzopren zinciri CoQ'yu oldukça apolar yapar ve iç mitokondri membranında hidrokarbon fazına kolayca difüze olmasını sağlar. CoQ solunum zincirinde bir proteinin prostetik grubu olmayan tek elektron taşıyıcısıdır ve zincirin flavoproteinleri ile stromları arasında

oldukça hareketli bir taşıyıcılık görevi yapabilmesine yol açar. CoQ hidrojenlerini hem NADH dehidrogenaz tarafından oluşturulmuş FMNH₂'den hem de süksinat dehidrogenaz ve asil CoA dehidrogenaz tarafından oluşturulmuş FADH₂ den (Kompleks 29 alabilir [Keha ve Küfrevioğlu, 2010]).

Kompleks II (Süksinat CoQ Redüktaz, EC 1.3.5.1)

TCA döngüsünde, süksinatın süksinat dehidrogenaz enzimiyle fumarata yükseltgenmesiyle FADH₂ oluşur. Süksinat dehidrogenaz, süksinat-CoQ redüktaz enzim kompleksinin bir bileşeni olup, diğer bileşenide 3 adet FeS merkezine sahip olan bir proteindir. Bu enzim kompleksi iç mitokondri membranının integral proteindir. FADH₂'deki yüksek potansiyele sahip elektronlar enzim kompleksindeki FeS merkezlerine, oradanda solunum zincirindeki CoQ'ya aktararak CoQH₂'yi oluştururlar. Bu enzim kompleksinin yapısında membrana gömülü altbirimlerine bağlı olarak bir Hem prostetik grubu bulunmaktadır. Ancak bu grup elektron transferinde görev almaz, süperoksit oluşumunun engellenmesinde bulunur. CoQH₂ ile O₂ arasındaki elektron taşıyıcılarından FeS proteininde hepsi sitokromlardır. Sitokromlar prostetik grup olarak 'hem' grubu içeren elektron taşıyıcı proteinlerdir. Sitokromlardaki Fe atomları indirgenmiş Fe⁺² hali ile yükseltgenmiş Fe⁺³ hali arasında mekik dokur. Hem grubu bir FeS merkezi gibi tek elektron taşıyabilir. Fakat NADH, flavinler ve CoQ iki elektron transfer edebilir. Nitekim bir CoQH₂ molekülü yüksek potansiyelli iki elektronunu solunum zincirinin daha sonraki üyesi olan iki adet sitokrom b'ye aktarır. CoQH₂ ile O₂ arasında beş çeşit sitokrom vardır. Sitokrom b ve c1, bir tane FeS proteini ile beraber **CoQ-Sit c redüktaz** multienzim kompleksinin bileşenleridir. Sitokrom c, elektronları bu kompleksten, bileşen olarak sitokrom a ve a3 ihtiva eden, sitokrom c oksidaz kompleksine transfer ederler. Bu sitokromlar artan indirgenme potansiyellerine göre sıralanmışlardır [Keha ve Küfrevioğlu, 2010; URL-1].



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

Ubikinon-sitokrom c oksidoredüktaz kompleksi elektronları CoQH₂'den sitokrom c'ye transfer eder. Yani kompleks III yapısında bulunan sitokrom b, elektronları sitokrom c yapısına aktarır. Kompleks III, bir proton pompası olarak fonksiyon görür; kompleksin asimetrik oryantasyonunun bir sonucu olarak, UQH₂'nin UQ'a okside olmasıyla serbestleşen protonlar, membranlar arası boşluğa salınırlar. Böylece bir proton gradienti oluşur [Geçkil, 2012].

Kompleks IV (Sitokrom C Oksidaz, EC 1.9.3.1)

Sitokrom oksidaz, mitokondrilerde bulunan solunum zincirinin son enzimidir. İndirgenmiş sitokrom c, elektronunu sitokrom oksidaz kompleksine aktarır. Sitokrom c'nin görevi CoQ'ya benzer, solunum zincirindeki kompleksler arasında hareketli bir elektron taşıyıcısı görevi yapar. Bu kompleks tarafından en son elektron alıcısı oksijenin redüksiyonu gerçekleşir. Bu kompleks iki tip sitokrom a içerir (a ve a₃). Bu sitokromlar iki hem grubunun yanında kompleks iki bakır iyonunu da taşır. Elektronlar önce kompleksin sitokrom a bileşenine, oradanda bakır içeren sitokrom a₃'e aktarılır. Bu bakır atomu sit a₃'den O₂'ye elektronu transfer ederken +2 ve +1 yükseltgenme basamakları arasında mekik dokur. Bu kompleks aracılığıyla 4 elektron ile O₂ redüksiyonu sağlanır ve iki H₂O molekülü oluşur. Bu olayla hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi tam olarak indirgenmemiş, hücre yapılarını tahrip edecek molleküllerin yapımı önlenir. Kompleks 1 ve 3 gibi, kompleks 4 de bir proton pompası olarak görev yapar, proton gradienti oluşumuna katkı sağlar. Sitokrom oksidaz, sitokrom a₃ olarak da isimlendirilir [Geçkil,2012; Keha ve Küfrevioğlu, 2010].

Kompleks V (ATP sentaz,EC 3.6.3.14)

ATP sentaz, iç mitokondriyal membranın ATP sentezleyen enzim kompleksi olup mitokondri matriksine doğru çıkıntı yapan küreler şeklinde görülür. Solunum zincirinde elektronların kompleks I, III ve IV üzerinden aktarılması sırasında protonlar matriksten membranlar arası boşluğa pompalanırlar bu sırada iç

membranda bir proton gradienti oluşur. Protonlar yüklü partiküller olduklarından proton gradientinin elektriksel özellikleri bulunmaktadır ve matriks negatif, membranlar arası boşluk pozitif yüklü olduğu için voltaj farkı oluşmaktadır. Oluşan elektrokimyasal gradient, protonların matrikse geri dönmeleri için proton hareket ettirici güç ortaya çıkarır. Bu güç etkisiyle protonlar matrikse geri dönerler ve elektrokimyasal gradientteki enerji, protonların matrikse geri dönmeleri sırasında ATP oluşumunda kullanılır. Oksidatif fosforilasyon olarak bilinen bu olay, ATP sentaz tarafından katalizlenir. ATP sentaz, Fo (integral protein) ve F1 (periferal protein) olmak üzere başlıca iki komponente sahiptir. Protonların membranlar arası boşluktan matrikse dönüşünde ATP sentazın Fo alt birimi görev alır; ATP sentazın F1 alt birimi ise ADP ve Pi kullanılarak ATP sentezini gerçekleştirmektedir [Harvey et al., 2007; URL-1].

2.9. Miyeloperoksidaz (MPO, EC 1.11.1.7)

MPO, memeli nötrofillerinin granüllerinde yaklaşık % 5 oranında yer alan bir enzimdir. Ayrıca monositlerde (toplam proteinin ~ %1'i) ve doku makrofajlarında MPO varlığından söz edilmektedir. MPO fagosite edilmiş bakterilerin öldürülmesinde önemli rol oynamaktadır. MPO'nun salyada bulunduğu dair bulgular mevcuttur ve kökeni tükrük bezi hücreleri olduğundan peroksidaz olarak tanımlanmaktadır. MPO, H_2O_2 ile birlikte tiyosiyonat iyonların veya halojeniyonlardan (iyodit, bromit, klorit) birinin de beraber bulunduğu bir ortamda antibakteriyel etki (oksijene bağlı) göstermektedir. H_2O_2 'nin antibakteriyel mekanizmadaki görevi mikrobiyal metabolizma üzerine etkisinin olmasıdır ve H_2O_2 'nin ayrıca tek başına da antibakteriyel etkisi vardır. Ortamdaki H_2O_2 ise, fagositoz yapan hücrelerden üretilip ortama salınmaktadır [Lau and Baldus, 2006; Develioğlu ve Taner, 1998].

2.10. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz (G6PD, EC 1.1.1.49)

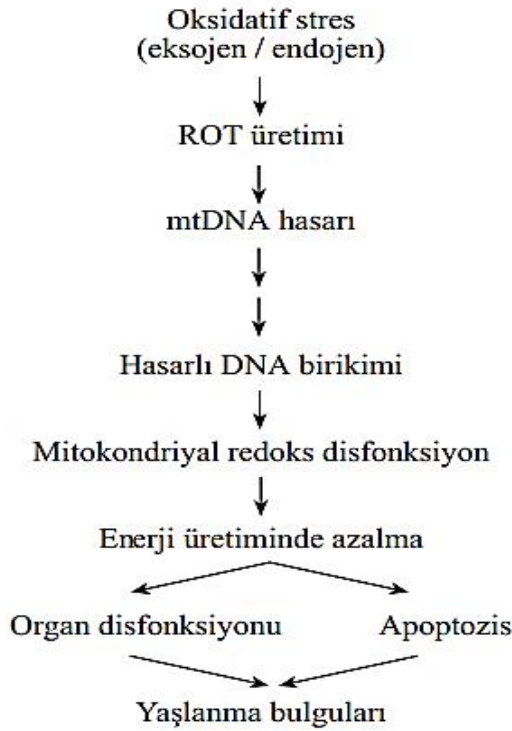
Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (D-glucose 6-phosphate: NADP⁺ oxidoreductase, G6PD) heksoz monofosfat yolunun ilk basamağını katalize eden kilit bir enzimdir. Eritrositlerde NADPH oluşumu için tek kaynak heksoz monofosfat metabolik yolu olup, G6PD eksikliğinde NADPH üretimi önemli miktarda azalmaktadır. Heksoz

monofosfat yolu defektlerinin en önemlisi, G6PD enziminin eksikliğine bağlı olanıdır. G6PD eksikliği X'e bağlı ve resesif olarak geçiş gösteren bir hastalıktır. Bu hastalığın dünyada oldukça geniş yayılımı olup, yaklaşık 400 milyon kişiyi etkilemektedir. G6PD enzimi eritrosit içindeki indirgenmiş glutatyon düzeyinin devamlılığını sağlamak için gereklidir. Böylece bu hücreler oksidatif strese karşı korunmuş olur. Bu hastalığa tutulmuş kişiler bazı ilaçlara (primakin, aspirin, sulfonamidler), kimyasal maddelere (metilen mavisi, naftalen) ve fava fasulyesine maruz kalırlarsa yaşlı eritrositlerde hemoliz gelişir. Anemi, hemoglobinemi, hemoglobinüri, sırt ağrısı, sarılık ve retikülositoz gelişir [Büyükokuroğlu ve Süleyman].

Enzim eksiklikleri içinde G6PD enzim eksikliği insidansı oldukça yüksektir. G6PD glutatyonun hücre içi düzeyinin normal tutulmasında gerekli olan NADPH'ın yapımında rol almaktadır. G6PD eksikliğinde eritrositler oksitleyici bir strese uğradıklarında hemoliz gelişir. Eritrositlerde oksidatif hasara karşı gelişen savunma, mevcut enzim aktivasyonu ile orantılıdır [Kantekin Ünal ve Tur, 2016].

2.11. Mitokondri ve Oksidatif Stres

Mitokondriyal DNA'da (mtDNA) oksidatif hasar ve bu hasara bağlı mutasyonlar yaşlanma sürecinde önemlidir. Günümüze dek yapılmış olan araştırmalar fizyolojik yaşlanma, prematür yaşlanma semptomları; Alzheimer hastalığı, diyabet, kalp yetersizliği, sağırılık, optik sinir dejenerasyonu, birçok ilerleyici kas hastalığı ve kanser gibi yaşlanma ile sıklıkları artan hastalıkların mutasyona uğramış DNA içeren disfonksiyonel mitokondrilerin varlığı ile ilgili olduğunu ortaya koymuştur. Oksidatif hasara bağlı mutasyonel yük artarken koruyucu ve onarıcı proteinlerin azalması/hasarlanması mitokondrilerin hasar ve mutasyona yatkınlığını artırır ve dolayısı ile hücrel yaşlanmayı hızlandırır [Öğüt ve Atay, 2012].



Şekil 2.10. Oksidatif mtdna hasarı ve yaşlanma [Öğüt ve Atay, 2012].

Aralarında, canlılarda yaşamsal önemi olan, oksijenin bazı ara bileşiklerinin de bulunduğu serbest radikaller hücresel düzeyde toksik etki gösterirler. Mitokondri iç zarı oksidatif fosforilasyondan ötürü, ROT'ların büyük ölçüde üretildiği yerdir. Normal metabolizma ürünleri olan ROT'lar, DNA'da çeşitli bozulmalara, özellikle kopmalara yol açar. Mitokondri DNA'sında, normal durumdakinden farklı olarak ortaya çıkan oksitlenmiş bazların, çekirdek DNA'sındakinlerden 16 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu durum, ROT'ların, mtDNA'da çok sayıda hasar meydana getirebileceğini göstermektedir [Öğüt ve Atay, 2012].

2.12. Mitokondriyal Hastalıklar

Mitokondriyal hastalık, hücrenin mitokondrisi hücre veya organ fonksiyonu için yeterli enerjiyi üretmediğinde ortaya çıkan kronik veya genetik bir hastalıktır. Mitokondriyal hastalığın birçok formu vardır ve bir çoğu kalıtsaldır. Bebeklerde, çocuklarda ve yetişkinlerde mitokondriyal hastalıkları görülebilir. Mitokondriyal hastalıklar hafif ile şiddetli arasında değişen bir hastalık yelpazesine sahip olabilirler.

Mitokondriyal hastalık semptomlarının şiddeti kişiden kişiye farklılık gösterir. En yaygın belirtiler şunlardır: Zayıf büyüme, kas kordinasyon kaybı, kas güçsüzlüğü, nörolojik problemler, nöbetler, otizm, otistik spektrum, otistik benzeri özellikler, görme ve / veya işitme sorunları, gelişimsel gecikmeler, öğrenme güçlükleri, kalp, karaciğer veya böbrek hastalıkları, gastrointestinal bozukluklar, ağır kabızlık, diyabet, artmış enfeksiyon riski, tiroid ve / veya adrenal disfonksiyon, yönelim bozukluğu ve hafıza kaybıyla karakterize edilen nöropsikolojik değişiklikler olarak verilebilir.. Mitokondriyal hastalıkların birçoğu kalıtsal olmakla birlikte ilaçlar veya diğer toksik maddeler mitokondriyal hastalığı tetikleyebilir. Yetişkinlerde, yaşlanmaya bağlı olarak gelişen birçok hastalığın mitokondri işlevinin yitirmesine bağlı olarak ortaya çıktığı görülmüştür; Bunlar; Tip 2 diyabet, parkinson hastalığı, aterosklerotik kalp hastalığı, inme, alzheimer hastalığı ve kanseri içermekle birlikte bunlarla sınırlı değildir [Akalin, 2005].

Hücre metabolizması ile türetilen elektronlar iki koenzim olan NADH ve FADH₂ ile ETS'ye ulaşırlar. Daha sonra, iç mitokondriyal membranında bulunan beş protein kompleksinden oluşan ETS boyunca ilerlerler. Elektronlar, bu parçacıkların iç mitokondriyal zarın dış tarafına taşınmasıyla üretilen bir proton gradyanı sayesinde I, III ve IV komplekslerinden geçer. Kompleks V daha sonra elektron naklinden türetilen enerjiyi ATP sentezine çevirir. Bu süreçte, solunum zincirinden gelen elektron kaçağı, süperoksit radikallerinin oluşumuna neden olur ve yaklaşık olarak geçen elektronların % 0.4-4 oranında süperoksit radikali oluşturulur. Sonuç olarak mitokondri, ROT'un birincil kaynağıdır [Boveris, 1984]. Biyolojik durumlarda mitokondrinin iyi bilinen bir antioksidan sistemi vardır. H₂O₂, GPx ve GSH tarafından etkili bir şekilde temizlenir [Drose and Brandt, 2012].

Mitokondriyal solunum zincirine bağlı olarak görülen bazı hastalıklar aşağıda verilmiştir;

Kompleks I eksikliği; Kompleks I (NADH:ubiquinon oksidoredüktaz) eksikliği, Mitokondriyal solunum zinciri bozukluklarından en sık görülenidir ve oksidatif fosforilasyon sistemi bozukluklarının üçte birini oluşturur. Mitokondriyal oksidatif fosforilasyon sistemi bozuklukları, en sık görülen metabolik hastalıklar grubundan

olup sıklığı 1:5000-10000 canlı doğumdur. Klinik olarak ağır neonatal laktik asidoz, Leigh sendromu, farklı kombinasyonlarda santral sinir sistemi, kas, kardiyak, hepatik ve renal tutulum ile belirti verebilir [Kılıç ve ark., 2015].

Kompleks II eksikliği; Kompleks II eksikliği, süksinat sitokrom c redüktaz ve süksinat dehidrogenaz eksiliğine bağlı ortaya çıkar. Klinik bulgular, ensefalomiyopati, gelişme geriliği, hipotoni, letarji, ataksi ve miyoklonus ile karakterizedir [Koç ve ark., 2003].

Kompleks III eksikliği; Oksidatif fosforilasyon bozuklukları çok değişken klinik özellikler gösteren heterojen bir grup hastalıktır. İzole kompleks III eksikliği çocuklukta nadir göülen bir bozukluktur. Yakın zamanda kompleks III'ün yapısal bir proteinini kodlayan BCS1L genindeki mutasyonlar sonucu erken karaciğer yetmezliği, tübülopati ve ensefalopati ile seyreden hastalar bildirilmiştir. Burada BCS1L geninde daha önce bildirilen bir mutasyon için homoplazmik olan ve erken renal tübüler yetmezlik ve karaciğer fonksiyon bozukluğu olan bir olgu ve yüksek doz bikarbonat tedavisi deneyimi sunulacaktır [Ezgü ve ark., 2005].

Kompleks IV eksikliği; Kompleks IV'de sitokrom c oksidaz eksikliği vardır. Bebek doğumda hipotoniktir ve buna güçsüzlük, solunum yetmezliği, laktik asidoz eşlik eder. Kalp, karaciğer ve beyin klinik olarak etkilenmez fakat böbrek tutulumuna bağlı Toni-Fanconi-Debre sendromu görülebilir. Hastalar solunum yetmezliği ile erken dönemde kaybedilir [Dubowitz, 2000].

Pearson sendromu

Nadir görülen bu hastalık tedaviye yanıt vermeyen sideroblastik anemi, pansitopeni (yeteri kan hücreleri üretilmediği durum), oksidatif fosforilasyon eksikliği, pankreas ekzokrin salgı yetmezliği ve değişik derecelerde karaciğer, böbrek ve endokrin yetmezlik ile karakterize ölümcül bir hastalıktır. Patogenezi karmaşık olup halen tam olarak anlaşılammıştır ve genetik çalışmalarla mtDNA'nın büyük bir parçasının delesyonu veya kaybının rol oynadığı gösterilmiştir [Pearson et al., 1979].

Oksidatif fosforilasyon eksikliğine bağlı dirençli laktik asidemi görülebilir ve diğer organlar etkilenebilir. Karaciğerin etkilenmesine bağlı transaminazlar yükselir,

hiperbilirubinemi, hiperlipidemi ve karaciğerde yağlanma meydana gelir. Bazı hastalarda karaciğer yetmezliği ortaya çıkar. Böbrek tutulumu sık olup Fanconi sendromu gibi tubulopatiler gelişebilir [Gibson et al., 1992; URL-3]. Pankreas endokrin bezleri fonksiyonel kalmakla birlikte diyabetes mellitus gelişen birkaç hasta rapor edilmiştir. İleri yaşlarda bu hastalarda KSS'a ait klinik bulgular görülebilir. Pearson sendromlu bazı olgularda 3-metilglutanoik asitüri saptanmış ve bu hastalığın tanısında önemli bir ip ucu olabileceği öne sürülmüştür [Rotig et al., 1990].

Alper hastalığı

Oksidatif fosforilasyon bozukluklarına bağlı olarak ortaya çıkan, nöbet, demans, spastisite, körlük, karaciğer fonksiyon bozuklukları ve serebral dejenerasyonla giden ender bir hastalıktır. Otozomal resesif kalıtımla geçer fakat bazen kardeşlerde de görülebilir. Karaciğer fonksiyonu bozulur ve buna ait klinik bulgular görülür. Çocukluk döneminde hızlı ilerleyen karaciğer yetmezliğine bağlı hastalar kaybedilir. Bazen de kardiyorespiratuar yetmezlik bu hastalarda ölüm nedenidir [Koç ve ark., 2003].

Luft hastalığı

Genetik geçiş şekli tam olarak bilinmeyen bu hastalıkta klinik bulgular, metabolizma artışı, ateş, sıcak intoleransı, polifaji, polidipsi ve istirahat taşikardisi ile karakterizedir. Eksersiz intoleransı ve hafif derecede güçsüzlük bu bulgulara eşlik edebilir. Bu hastalardan yapılan kas biyopsisinde RRF'lar görülür [Koç ve ark., 2003].

Costeff sendromu

Costeff sendromu, metil glutakonik asitüri tip 3 olarak da adlandırılır. 3-metil glutakonik asidüri, sıklıkla düşük miktarlarda 3-metilglutarik asid atılımı ile birlikte olup, en az dört adet farklı ve görünüşte birbirinden bağımsız olan kalıtsal metabolik hastalıkta ortaya çıkar [Kocabaş, 2008].

Karnitin eksikliği

Karnitin uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriye transportuna aracılık eden bir kofaktör olup eksikliğinde lipid depo hastalıkları ortaya çıkar. Karnitin eksikliğinin biyolojik etkileri, normal değerinin %10-20'sinin altına ininceye kadar ortaya çıkmaz. Solunum zincir defekti karnitin eksikliğine neden olabilir; çünkü karnitin alınımı ATP'ye bağımlı bir olaydır. L-karnitin eksikliği diyabet, siroz ve kronik böbrek yetmezliği gibi kronik hastalıklarda sık görülmesine rağmen genellikle nadir ortaya çıkmaktadır. L-karnitin eksikliğinde yangı, kilo kaybı, stres ve mikroorganizmalara karşı direncin düşmesi, miyopati, ilerleyici kas zayıflığı, kardiyomiyopati, karaciğer yetersizliği, periferik ve merkezi nöropati, büyüme geriliği ve tekrarlayan infeksiyonlar, ensefalopati, hepatomegali, egzersizlerden sonra kas yorgunluğu, kramp, hipoglisemi, kanser, diyabet, alzheimer hastalığı ve kalp yetmezliği gibi rahatsızlıklar görülebilir [Umutlu, 2012].

Familial rekürren rabdomioliz

Rames ve Gardner-Medwin [1992], egzersizle ortaya çıkmayan familial parosismal rabdomiyolisli iki aile tanımlamış ve bu hastalığın miyoglobininüri, kaslarda güçsüzlük ve böbrek yetmezliğine neden olarak yaşamı tehdit eden bir hastalık olduğunu rapor etmiştir [Koç ve ark., 2003].

2.13. Karaciğer

2.13.1. Karaciğerin yapısı ve görevleri

Karaciğer vücudumuzdaki en ağır ve en büyük organlardan biridir. Karın bölgesinin sağ üst kısmında, kaburgaların tam altında bulunmaktadır. Karaciğer sağ ve sol olmak üzere iki loptan oluşur. Sağ lob, sol lobdan büyüktür. Karaciğer hem arteriyel (A. Hepatica), hem de venal (V. Portae) sistemden kan alan bir organdır. Karaciğerde hepatosit, endotel hücreleri, kupffer hücreleri, stellat hücreleri ve safra kanalı epitel hücreleri olmak üzere beş tür hücre bulunmaktadır. Tüm hücre tiplerinin % 80'ini hepatositler oluşturur [Tür, 2008].

Karaciğerin hem endokrin hem ekzokrin görevi bulunmaktadır. Protein sentezi, safra salgılanması, detoksifikasyon, A, D, E, K, B₁₂ vitaminlerinin depolanması, A vitamininin üretimi, glikozun glikojen şeklinde depolanması, kan pıhtılaşmasında görev alan proteinlerin üretilmesi, lenf yapımında görev almak gibi çok önemli görevleri bulunmaktadır. Ayrıca portal sistemde bağırsaklardan gelen mikroorganizmalar hepatik sinüslerde bulunan makrofajlar(kupffer hücreleri) aracılığı ile filtrelemektedir. Hidrofilik olmamaları nedeniyle böbrekten atılamayan zararlı ürünler hepatositlerde oksidasyon ve konjugasyon yolu ile zararsızlaştırılır. Bunun için gerekli enzimler agranüler endoplazmik retikulum membranlarında bulunur. Kolesterol, safra tuzlarının oluşmasında ve VLDL (Çok Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler) sentezinde kullanılır. Amonyaktan ornitin döngüsü ile üre sentezinde görevlidir. Tiroksin, büyüme hormonu, insülin, glukagon gibi hormonların modifikasyonunun yapıldığı yerdir [Bozkurt, 2014].

2.13.2. Karaciğer hastalıkları ve mitokondri

Karaciğer, mitokondrinin sayı ve yoğunluğu açısından en zengin organlardan biridir. Mitokondri, karaciğer hücresinin bütünlüğünü ve işlevlerini sürdürmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Mitokondriyal bir bozukluk olduğunda karaciğer hücresinde fizyolojik stres artar. Son 20-30 yılda kalıtsal veya edinilmiş mitokondriyal bozukluklara bağlı akut ve kronik karaciğer hastalıkları teşhis edilmiştir. Çoğu kronik karaciğer hastalığı, hasar görmüş mitokondrilerin sayısının artması ile ilişkilidir. Hepatik mitokondri, karbonhidratların, lipidlerin ve proteinlerin karaciğer metabolizmasını bütünleştiren merkez olduğu için diğer organların mitokondrisine kıyasla çok daha büyük bir öneme sahiptir [Degli Esposti et al., 2012].

Solunum organelleri olarak mitokondriler, yüksek enerjili substratlardan enerjinin elde edilmesinde, hücrelerin metabolik fonksiyon ve bütünlüğünde önemlidir. Bu metabolik makinelerde oluşan kusurlar sonucunda hücresel enerji depoları tükenebilir, oksidatif stres meydana gelebilir veya apoptosis gerçekleşebilir. Mitokondriler karaciğer hücre hacminin % 20'sini işgal eder. Karaciğer biyokimyasal

testlerinde hafif anormalliklerden, akut veya kronik karaciğer yetmezliğine kadar gidebilen düzeyde farklı belirtiler görülür [Hassanein and Frederick, 2004].

Kronik karaciğer hastalıklarının birçoğu anormal ROT oluşumu, GSH tükenmesi, PK gruplarındaki artış ve solunum kompleksi değişiklikleri olan hasarlanmış mitokondrielerin birikimi ile ilişkilidir. Mitokondriyal değişiklikler doğalarına ve ciddiyetlerine bağlı olarak lipid birikimi, apoptoz ve/veya nekroza sebep olabilir, böylelikle inflamasyona neden olabilirler. Bu patolojik olaylar, laktakidoz, hipoglisemi, yüksek serum transaminazları, yüksek konjuge bilirubinemi ve hiperammonemi gibi farklı klinik özelliklere karşılık gelebilir. Mitokondri ROT'un önemli bir kaynağıdır ve ROT zararlı özelliklerinin yanında aynı zamanda hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasında önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte, farklı stres tipleri, uyuşturucu, virüs, hipoksi, inflamasyona neden olan sitokinler, β -oksidasyon fazlalığı, sitokrom P450'nin aşırı ekspresyonu gibi nedenlerle karaciğer mitokondrisi zarar görebilir. Bu durumda, ROT'un aşırı üretilmesi hem mitokondriyal hem de oksidatif fosforilasyon enzimlerinin protein alt birimleri, lipid zarları, mitokondriyal veya nükleer DNA gibi diğer hücresel bileşenlere zarar verebilir. Bu hücresel lezyonlar, yağlı karaciğer veya hepatoselüler karsinom gibi doku lezyonlarının gelişimine katkıda bulunabilir [Degli Esposti et al., 2012].

Karaciğer hastalıklarında, hem ROT artışı hem de hücrelerde lipid peroksidasyonu, DNA ve proteinlerin yıkımına yol açtığından karaciğer hasarını artırmaktadır. Yılmaz ve Bahçecioğlu, yapmış oldukları bir çalışmada karboneteraklorür (CCl₄) ile karaciğer sirozu oluşturulan ratlarda, karaciğer dokusunda MDA, GPx, G6PD ve pirüvat kinaz aktivitelerini ölçmüşlerdir. Sirozlu grubun karaciğer MDA düzeylerinin kontrollere göre yüksek, GPx ve G6PD aktivitelerinin ise düşük olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışma sonucunda sirozun antioksidan savunma sisteminde değişikliklere ve dolayısıyla oksidatif stres ve peroksidasyona yol açabileceği belirlenmiştir [Yılmaz ve Bahçecioğlu, 2000].

DeneySEL olarak alkolik yağlı karaciğer oluşturulan ratlarda ise karaciğer GPx aktivitesi ve lipid peroksidasyonu ölçülmüştür. Karaciğer lipid peroksidasyon içeriğinin 4-6. haftalarda, GPx aktivitesinin ise 4. haftada arttığı ve karaciğer GPx

aktivitesindeki artışın lipid peroksid üretimiyle ilgili olabileceği belirlenmiştir. Alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması sonucunda oluşan hepatitiste, oksidatif stresin etiyolojik mekanizması ile ilişkili olabilecek lipid peroksidasyon, karaciğer demir seviyesi ve hiperinsülinemi olmak üzere 3 faktör öne sürülmektedir [Tabakoğlu ve Durgut, 2013].

Lipid peroksidasyonu, serbest reaktif oksijen türlerinin artışı, glutatyon, E vitamini, beta-karoten ve C vitamini gibi antioksidanların azalması ile karaciğer oksidatif hasara açık hale gelmektedir. Aşırı miktardaki intraselüler yağ asitleri, oksidatif stres, ATP azalması ve mitokondriyal disfonksiyon karaciğer hasarında önemlidir. Mitokondriyal disfonksiyon sebebiyle artan sitokin salınımı ve ROT'lar antioksidanların azalması ve lipid peroksidasyonu nekroinflamasyonu artırır [Güngör ve Türker].

2.14. Böbrek

2.14.1. Böbreğin yapısı ve görevleri

Böbrekler karın arka duvarında retroperiton olarak yerleşmişlerdir, böbrek medulla renalis ve korteks renalis olmak üzere iki kısımda incelenir. İdrar yapan oluşumlar cortex renalis'te, toplayıcı kanallar medulla renalis'te bulunur. Böbreğin işlevsel birimi nefrondur, nefronlar idrar oluşturma yeteneğine sahiptir. Her bir böbrek yaklaşık olarak bir milyon nefrona sahiptir. Nefronlar, glomerül ve uzun tübüllerden meydana gelir. Glomerül kandan büyük miktarda sıvının filtre edilmesini sağlayan bir glomerül kapiller yumağından meydana gelir. Tübüller ise filtre edilen sıvının idrara dönüştürüldüğü kanallardır. Glomerül diğer kapiller ağlara göre daha yüksek basınca sahiptir ve glomerül kapilleri, epitelyum hücreleri ile örtülmüş olup tüm glomerül bowman kapsülü ile sarılıdır. Glomerül kapillerinde filtre olan sıvı, bowman kapsülüne oradan da proksimal tübüle geçer. Proksimal tübül böbrek korteksinde yer alır. Proksimal tübüldeki sıvı henle kıvrımına akar. Henle kulpundan sonra makula densaya oradan da distal tübüle ve birleştirici tübül ile kortikal toplayıcı tübüle ulaşır. Kortikal toplayıcı kanallar genişleyerek daha büyük kanallar oluşturup, foramina papillaris aracılığıyla böbrek pelvisine boşalırlar [Kasırga, 2015].

Böbrekler kanın osmotik basıncını sabit tutmak için değişik miktarda elektrolit atılmasını sağlayarak, vücudu zararlı maddelerden temizleyen ve metabolizma sonucu meydana gelen atık maddelerden üre, kreatinin, ürik asit gibi toksik maddelerin atılmasını sağlayan organdır. Aynı zamanda vücut için gerekli olan maddelerin geri emilimini sağlayarak da (glikoz, aminoasit gibi) madde kaybını önler ve asit baz dengesinin düzenlenmesine de yardımcı olurlar [Yürekli, 2014]. Böbrekler eritropoietin salgılayarak eritrosit yapımının düzenlenmesi, arteryel kan basıncının düzenlenmesi, bazı hormonların salgılanması, metabolize edilmesi ve atılması, uzun süreli açlık esnasında aminoasitlerden glikoz sentezleme (glikoneogenez) gibi görevleri vardır [Kasırğa, 2015]. Ayrıca böbreklerden hemoglobinin yıkımı sonucu oluşan son ürün bilirubin, hormon metabolitleri, ilaçlar ve besin maddeleri gibi dışarıdan alınan yabancı maddelerde atılır.

2.14.2. Böbrek hastalıkları ve mitokondri

Böbrek vücudun metabolizmasını, plazma hemodinamiğini, elektrolitleri ve su homeostazını, besin maddelerinin tekrar emilimini ve hormon salgılanmasını aktif olarak korumak için olağanüstü miktarda enerji isteyen hayati bir organdır. Böbrek oldukça enerjik bir organdır ve mitokondri sayısı ve oksijen tüketiminde kalpten sonra ikinci sırada yer almaktadır. Bu nedenle, enerji santrali mitokondrideki bozukluklar böbrek hastalıklarının patogeneğinde kritik bir rol oynamaktadır [Duann and Lin, 2017].

Mitokondrinin çoğalması anlamına gelen mitokondriyal biyojenez diğer dokularda olduğu gibi böbrek içinde çok önemlidir. Dokudaki mitokondri sayısının artması yaşlanma, doku hipoksisi, aşırı glikoz veya yağ asidi yüklenmesi sonucu ortaya çıkan hücre hasarını ortadan kaldıracak olan antioksidan savunma mekanizmalarını artırır. Eğer dokuda yeterli mitokondri yoksa bu metabolik süreçlerdeki olumsuzluklar akut ve kronik böbrek hastalıklarına neden olur [Weinberg, 2011].

Böbrek hücrelerinde ve dokularında mitokondriyal parçalanma sonucunda diyabetik nefropatinin yanı sıra akut böbrek hasarının da ortaya çıktığı deneysel modellerle gösterilmiştir. Hem akut hem de kronik böbrek hastalıkları mitokondriyal patolojinin rol oynadığı karmaşık patojenik mekanizmaları içermektedir. Son zamanlarda

yapılan çalışmalar, böbrek iskemi-reperfüzyonu, nefrotoksisite, nörodejeneratif hastalıklar ve böbrek yetmezliği gibi akut ve ilerleyici böbrek hastalığında mitokondriyal dinamiklerdeki değişikliklerin önemli rol oynadığı ortaya konmuştur [Zhan et al., 2013].

Kronik böbrek yetmezliği (KBY) oksidatif stres ile seyreden sebep-sonuç ilişkisi bilinmeyen klinik tablolardan bir tanesidir. Son zamanlarda KBY hastalarının tedavilerinden birisi olan hemodiyaliz de oksidatif stresi arttırıcı etki göstermektedir. Hemodiyaliz esnasında ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin en önemli kaynağı membranın aktive ettiği polimorfonükleer lenfositlerdir. Aktive olan PMNL'den salınan süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri ve hipoklorik asit gibi reaktif oksijen ürünleri protein ve lipid yapılarında hasara neden olmaktadır [Köken ve ark., 2004].

Son zamanlarda yapılan hayvan çalışmalarında ROT'ların böbrek hastalıklarında patofizyolojik önemleri tespit edilmiştir. Böbrek dokusu veya idrarda oksidan hasar ürünlerinin tespit edilmesi yanında, ROT inhibitörleriyle koruyucu etkinin gösterilmesi bunu kanıtlamıştır. Glomerüler hastalıklar, akut böbrek yetmezliği ve pyelonefrit ROT'ların patogenezinde rol oynadığı düşünülen böbrek hastalıklarındandır. ROT kaynakları böbrek hücreleri, nötrofiller veya dolaşımdaki diğer hücreler olabilir. Glomerüler mesangial hücreler kompleman 5b-9-membran kompleksleriyle reaksiyona girdiklerinde ROT sentezleyebilirler. Böbreklerde oluşan ve doku hasarına yol açan oksidan radikaller böbreğin antioksidan savunma sistemleriyle temizlenirler. KBY'nde ise ROT'lar artmış, antioksidan savunma ise azalmıştır. Bozulan bu denge üremiye bağlı aneminin patogenezinde de rol oynayabilir. Anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörü olan kaptopril sülfidril grubu da içerdiğinden in vivo antioksidan özelliğe de sahip olup KBY ve diyabetik nefropatili hastalarda hastalığın progresyonunu azaltabilmektedir [Çavdar ve ark., 1997].

Böbrek kan akımındaki azalma veya kesilme ve sonradan oluşan reperfüzyon ile birlikte çeşitli derecelerde doku hasarı oluşturmaktadır. Böbrek iskemi/reperfüzyon hasarında, iskemi sonrası böbrek fonksiyon bozukluklarında ROT en önemli rolü

oynamaktadır. Ayrıca reperfüzyonu takiben ROT'da hızla yükselme olduğu ve bunun sonucu olarak lipid peroksidasyon düzeyinde artış olduğu bildirilmektedir. İ/R hasarının geriye dönebilmesi, böbrek tübüler hücrelerinin nefron boyunca hasarlı epitel hücrelerinin yerini alma ve yenilenme yeteneğine bağlıdır [Aydoğdu ve ark., 2005].

Diabetes Mellitus, mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarla seyreden kronik bir hastalıktır. Diyabetik nefropati dünyada ve ülkemizde son dönem böbrek yetersizliği (SDBY) nedenleri arasında birinci sırada yer almaktadır. Diyabetik nefropatide en önemli glomerüler lezyonlar, kapiller bazal membran kalınlaşmaları, diffüz glomerüloskleroz ve nodüler glomerülosklerozdur. Diffüz glomerüloskleroz, mezengial hücre proliferasyonu ve beraberinde mezengial matrikste diffüz artış olarak tanımlanabilir ve her zaman bazal membran kalınlaşması ile ilişkilidir. SDBY pro-oksidanlar ile antioksidanlar arasında bulunan denge oksidatif stresin artması yönüne kaymıştır. Bu yüzden son zamanlarda SDBY hastalarında oksidatif stres ve antioksidanlarla ilgili çalışmalar önem arz etmektedir. Deneysel olarak diyabet yapılan sıçanlarda ve diyabet hastalarında oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun arttığı tespit edilmiştir [Dönder ve ark., 2012].

Zhang ve ark.'nın yaptıkları çalışmada hiperglisemide serbest radikal üretimindeki artışın diyabet komplikasyonlarının gelişiminde rol aldığını, oksidatif stres artışının apoptozise yol açtığını ve apoptozisin diyabetik nefropati gelişiminde etkili olabileceğini göstermişlerdir [Öniz, 2004].

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

3.1.2. Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler ve hazırlanışları

Akrilamit (CAS Number 79-06-1) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmasından satın alındı. Çalışmada kullanılan akrilamit %0, 9'luk NaCl kullanılarak 3,1 gr/ml olacak şekilde stok çözelti olarak hazırlandı. Bu stok çözülden hayvanların ağırlıkları göz önünde bulundurularak 50 mg/kg olarak intraperitoneal verildi. Moroccan organik argan yağı Alassala Ltd. (Nottingham, UK)' den satın alındı. Çalışmada kullanılan argan yağının içeriği Tablo 2.2'de verilmiştir. Argan yağı herhangi bir çözücü kullanılmadan, deney hayvanlarına direkt olarak gavaj aleti ile 6 ml/kg olacak şekilde verildi.

Bunun dışındaki kimyasal maddeler ATP tayini için Kolorimetrik/florometrik ATP kiti(K354-100) Bio Vision firmasından satın alındı. Rotenon, antimisin A, 2,6-dichlorindofenol (DCIP), deksilubikinol (CoQ), nikotinamid adenindinukleotit

(NAD⁺), redüktenikotinamid adenindinukleotit (NADH), beta nikotinamid adenindinukleotit fosfat (NADPH), oksaloasetat, asetilkoenzim A, trisodyumisositrat, tiyobarbitürük asit (TBA), 1.1.3.3.tetraethoksiopropan (MDA), 5-5'-Ditiobis 2- nitrobenzoik asit (DTNB), sükröz, tris (Hidroksimetilaminometan hidrojen), triklor asetik asit (TCA), etilen diamin tetraasetik asit (EDTA), bovin serum albümin, etilen glikoltetraasetik asit (EGTA), triton X-100, guanidinhidroklörür, o-dianisidineklörür, hekzdesil amonyum bromid (HTAB), 1-kloro, 2,4-dinitrobenzen (CDNB), 2,4-dinitrofenil hidrazin (DNPH), redükte glutasyon (GSH), potasyum siyanür (KCN), nitrat redüktaz, flavin-adenin-dinukleotid (FAD), laktat dehidrogenaz (LDH), riboflavin, nitroblue tetrazolyum (NBT), metil thiazol tetrazolyum (MTT) Sigma-Aldrich firmasından alınmıştır. Çalışmalarda kullanılan diğer kimyasal maddeler analitik saflıktadır.

3.1.3. Deney hayvanları ve deney grupları

Deneysel çalışmamızda 225-275 gram ağırlıkta sağlıklı, *Sprague Dawley* cinsi, 20 adet dişi 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=5 sıçan olmak üzere toplam 4 grup oluşturuldu. Bu gruplar;

Grup (K): Bu gruptaki ratlara 30 gün boyunca hergün intraperitoneal (i.p) 1 ml %0,9 lukNaCl verildi.

Grup (AK): Deney hayvanlarına haftada 3 gün olacak şekilde i.p olarak 50 mg/kg olacak şekilde akrilamit verildi.

Grup (AR): Deney hayvanlarına her gün 6 ml/kg olacak şekilde oral yolla (gavaj aleti kullanılarak) argan yağı verildi.

Grup (AK+AR): Deney hayvanlarına 30 gün boyunca yukarıdaki doz ve sürelerde akrilamitle birlikte argan yağı verildi.

Deney aşaması boyunca ratların 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 karaciğer ve böbrekleri 0,15 M NaCl solisyonu kullanılarak perfüze edildi, kırmızı kan hücreleri dokulardan uzaklaştırıldı. Dokular hızlı bir şekilde kurutma kağıdı ile kurutuldu, tartıldı ve kullanılıncaya kadar -80°C 'lik derin dondurucuda saklandı. Dokuların bir kısmı % 1,17 KCl içeren fosfat tamponunda (0,1M, pH 7,4) homojenize edildi. Homojenatlar tülbentten süzüldü ve 600 g de 4°C 'de 1 saat santrifüj edildi. Süpernatantın bir kısmı NOx tayini için kullanıldı. Süpernatantın bir kısmı ise 10,000 g, 4°C 'de 15 dk tekrar santrifüj edildi ve süpernatant sitozolik GST ve G6PD aktivite tayininde kullanıldı. Dokuların kalan kısmı % 0,5 HTAB içeren fosfat tamponu (0,05 M, pH 6) içinde homojenize edildi. Böylelikle dokularda membrana bağlı bulunan MPO açığa çıkarıldı. Homojenat daha sonra 10,000 g de, 4°C 'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant MPO aktivite tayini için kullanıldı.

3.2.2. Karaciğer ve böbrekten mitokondri izolasyonu

Karaciğer ve böbrekten mitokondri izolasyonu diferansiyel santrifüj yöntemi kullanılarak yapıldı [Johnson and Lardy, 1967]. Dokular A tamponunda (250 mM sükröz, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, pH 7,6) homojenize edildi. Homojenizasyondan sonra pH test kağıtları ile 2 M Tris kullanılarak 7,6'ya ayarlandı. Homojenatlar 1,000 g de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar alınarak 7,000 g de 10 dk daha santrifüj edildi. Buradan elde edilen süpernatantlar ayrıldı ve post mitokondriyal fraksiyon olarak saklandı. Bu aşamadan sonra pellet kısmında kalan mitokondriyal fraksiyon ile çalışıldı. Mitokondriyal fraksiyonlar B tamponu [250 mM sükröz, 10 Mm Tris-HCl, 0,1mM EGTA, pH 7,6] kullanılarak 1,000 ve 7,000 g de 15 dksantrifüj edilerek yıkandı. B tamponu ile yıkanma sırasında cam çubuklar kullanılarak mitokondriyal pelletin iyice dağılması ve yıkanması sağlandı.

Elde edilen yıkanmış pellet daha sonra az miktarda tampon B ile süspansiyon edildi. Bu süspansiyonda protein tayini yapıldı [Lowry et al. 1951]. Mitokondriyal fraksiyon ve post mitokondriyal fraksiyon kullanılıncaya kadar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de derin dondurucuda saklandı.

3.2.3. Miyeloperoksidaz aktivitesinin belirlenmesi

MPO aktivitesi Bradley et al. [1982]'e göre yapıldı. Kısaca 0,1 ml süpernatant üzerine 2,9 ml 0,19 mg/ml o-dianizidin klorür substrat olarak 0,0005% H_2O_2 içeren fosfat tamponu (0,05 M, pH 6) eklendi. Beş dakika süresince o-dianozidinin okside formları ile oluşan renkli solisyonun absorbansı 460 nm' de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bir U MPO aktivitesi $x/y \cdot 1.13 \times 10^{-2}$ formülü kullanılarak hesaplandı. Burada x, ΔOD ve y, reaksiyon süresini göstermektedir. Sonuçlar U/g protein olarak ifade edildi.

3.2.4. Dokularda total nitritin (NO_x) belirlenmesi

Total nitrit ($\text{NO}_2 + \text{NO}_3$) seviyesinin belirlenmesinde Doğanay ve ark., [2002]'in enzimatik metodu kullanıldı. Bu metod dokudaki total nitritin belirlenmesinde son derece hassas bir yöntemdir. İlk önce doku nitratı (NO_3) NADH-bağımlı nitrat redüktaz enzimi kullanılarak nitrite (NO_2) dönüştürülür. Daha sonra dokudaki total nitrit seviyesi Griess reaksiyonu ile ölçülür. Standart olarak sodyum nitrat (NaNO_2) (10–100 μM) kullanıldı ve doku total nitrit seviyesi $\mu\text{mol/g}$ doku olarak belirlendi.

3.2.5. Glutasyon-S-transferaz ve glukoz-6P-dehidrogenaz aktivitelerinin belirlenmesi

GST aktivitesi Habig et al. [1974]'e göre yapıldı. Reaksiyon GSH'ın CDNB ile reaksiyona girerek konjugasyon oluşturması ve bu konjugasyonun 340 nm de absorbansının ölçümüne dayanır. Reaksiyon karışımı 0,1M, pH 6,5 fosfat tamponu içinde 30 mM CDNB ve 30 mM GSH içermektedir. Sonuçlar $\mu\text{mol/dk mg}$ protein olarak ifade edilmiştir. Reaksiyonda post mitokondriyal fraksiyon kullanılmıştır.

G6PD aktivitesi Zaheer et al. [1965]' e göre yapılmıştır. Üç ml'lik reaksiyon karışımı 0,3 ml Tris-HCl tamponu (0,05 M, pH 7,6), 0,1 ml NADP (0,1 M), 0,1 ml glukoz-6-

fosfat, 0,1 ml MgCl₂ ve 2,1 ml distile su içermektedir. Absorbans değişimi 340 nm de kaydedildi ve enzim aktivitesi NADP için molar absorpsiyon katsayısı, $\epsilon=6,22 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar nmol redukte NADP/dk/mg protein olarak ifade edildi.

3.2.6. Mitokondriyal oksidatif stresin belirlenmesi

Mitokondriyal Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Mn-SOD aktivitesi (EC 1.15.1.1) Madamanchi et al. [1984]'e göre yapıldı. Reaksiyon karışımı fosfat tamponu (0,05 M, pH 7) 0,1 mM EDTA, 13 mM methionin, 2 μM riboflavin, nitrobluetetrazolium (NBT) ve enzim ekstraktı içermektedir. Ürün 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.

Glutasyon peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

GPx aktivitesi Flohé ve Gunzler [1984]'e göre yapıldı. 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 Glutasyon Düzeyinin Belirlenmesi

Dokulardaki GSH düzeyi Moron et al. [1979]'a göre yapıldı. Reaksiyon karışımı fosfat tamponu (0,15 M, pH 7), 5mM 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 [1990]'a göre yapıldı. Uygun miktarda mitokondriyal fraksiyon 1 hacim %20 TCA ve 2 hacim TBA (%0,67) ile karıştırılarak 45 dk 80 °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 oluşturmaktadır ve MDA için molarabsorblama katsayısı $\epsilon=1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak hesaplama yapıldı ve sonuçlar nmol malondialdehit/mg protein olarak ifade edildi.

Protein Karbonil Miktarının Belirlenmesi

PK miktarının belirlenmesinde PK gruplarının DNPH ile reaksiyonları esas alınarak çalışılmıştır [Levine et al. 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 beklendi. Proteinlerin çökmesi için 0,5 ml %20'lik TCA ilave edildi. Karıştırıldıktan sonra 11,000g' 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 lipit kontaminantları uzaklaştırıldı. En son pellet 6 M guanidine hidroklorit içinde 37°C'de 1 saat bekletilerek çözünmesi sağlandı. Protein karbonil miktarı dinitrofenil hidrazinin 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 ubikinonoksidoredüktaz veya NADH dehidrogenaz) aktivitesinin belirlenmesi

Komplex 1 aktivitesi Janssen ve ark. [2007]'na göre yapıldı. 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), 0,2mM 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 (Süksinatdehidrogenaz) aktivitesinin belirlenmesi

Komplex II aktivitesi de Janssen ve ark.[2007]'na göre yapıldı. 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 (sitokromoksidaz 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 et al.,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 ark. [1996]' na göre yapıldı. 1 ml ferrositokrom C uygun miktardaki mitokondriyal protein ile karıştırıldı. Mitokondriyal protein kullanılmadan önce %0,5 Tween 80 içeren fosfat tamponunda bir kaç kez

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

İzositratdehidrogenaz Aktivitesinin Belirlenmesi

NADP⁺ bağımlı mitokondriyal izositrat dehidrogenaz (mID) aktivitesi Fatania ve ark.[1993]'na göre yapıldı. 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

Alfa ketoglutarat dehidrogenaz aktivitesi Lucas ve ark.[2003]'nin metoduna göre yapıldı. 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⁺'nin redüksiyonu spektrofotometrik olarak izlendi. Sonuçlar μmol redükte NAD⁺ /dk/mg protein olarak ifade edildi.

Malatdehidrogenaz aktivitesinin belirlenmesi

MD aktivitesi Gelpi ve ark. [1992]'na göre belirlendi. Reaksiyon karışımı fosfat tamponu (0.1M, pH 7,4), 0,14 mM NADH, oksaloasetat ve mitokondriyal proteinden oluşmaktadır. Reaksiyon 30 °C'de 340 nm'de NAD⁺'nin 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 mikropilaka 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.

Mitokondral Metabolik Fonksiyonun Belirlenmesi

Mitokondriyal metabolik fonksiyonun belirlenmesinde Berridge ve Tan [1993]'in yöntemi kullanıldı. 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 C'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 değişimleri okundu. Sonuçlar $\Delta OD/$ mg protein olarak ifade edildi.

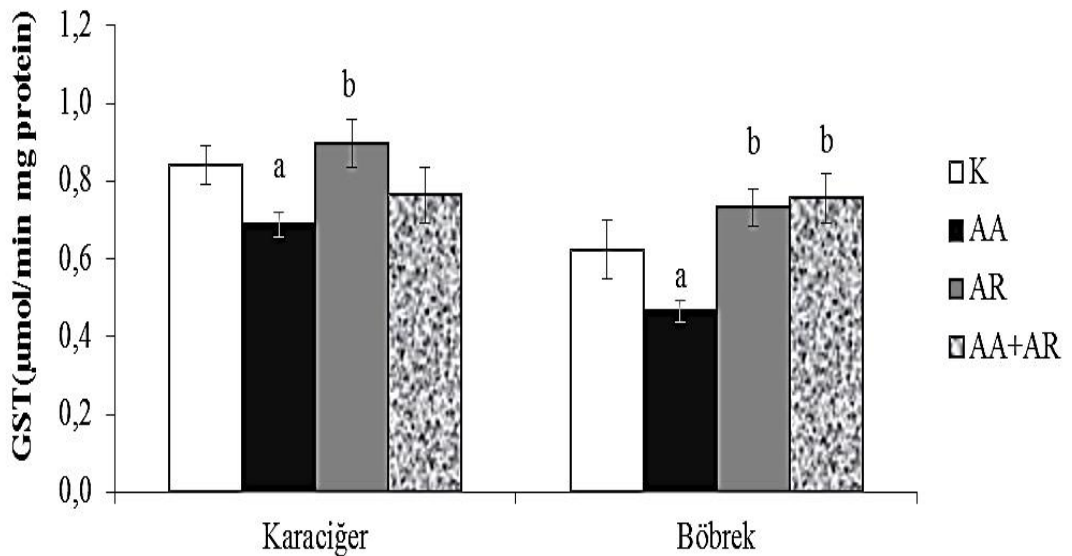
İstatiksel Analiz

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

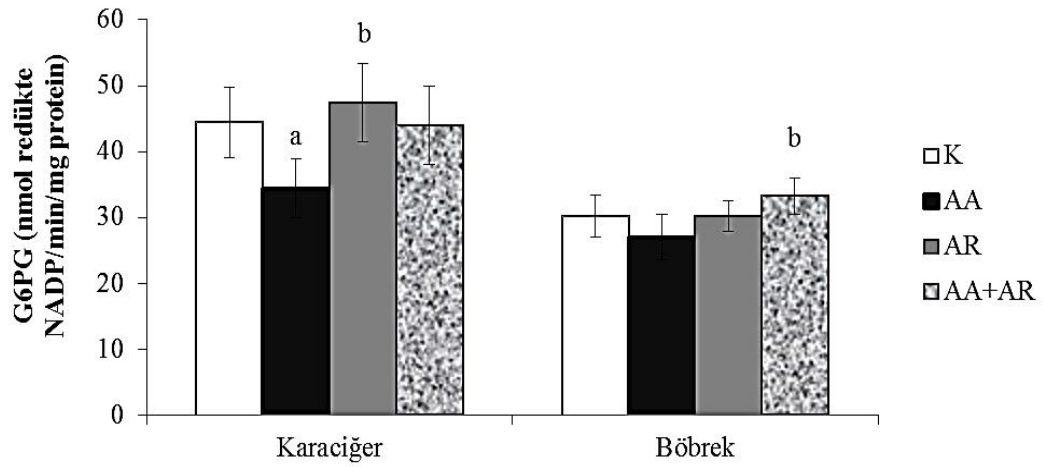
4. BULGULAR

4.1. Karaciğer ve Böbrekte Sitozolik G6PD ve GST, MPO Aktiviteleri ve Toplam NOx Seviyeleri

AA verilen ratlarda, kontrol grubuna kıyasla GST aktivitesinin karaciğer ve böbrekte sırası ile % 21 ve % 32 oranında azaldığı görülmüştür ($p<0,05$). Benzer şekilde G6PD aktivitesinde de karaciğer ve böbrekte sırası ile % 29 ve % 12 oranında azaldığı görülmüştür ($p<0,05$). AR'ın tek başına verildiği grup kontrol grubu ile kıyaslandığında, karaciğer ve böbrekte ne GST ne de G6PD aktivitesinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). AA'nın AR ile birlikte verildiği grupta karaciğerde ve böbrekte GST ve G6PD aktivitelerinde kontrol grubuna göre önemli bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). AA etkisi ile bu enzimlerde görülen baskılanmanın AR ile birlikte verildiğinde ortadan kalktığı ve enzim seviyelerinin tamamen normale döndüğü görülmüştür. AR'ın GST ve G6PD aktiviteleri üzerine böbrekte karaciğere göre daha etkili olduğu görülmüştür.

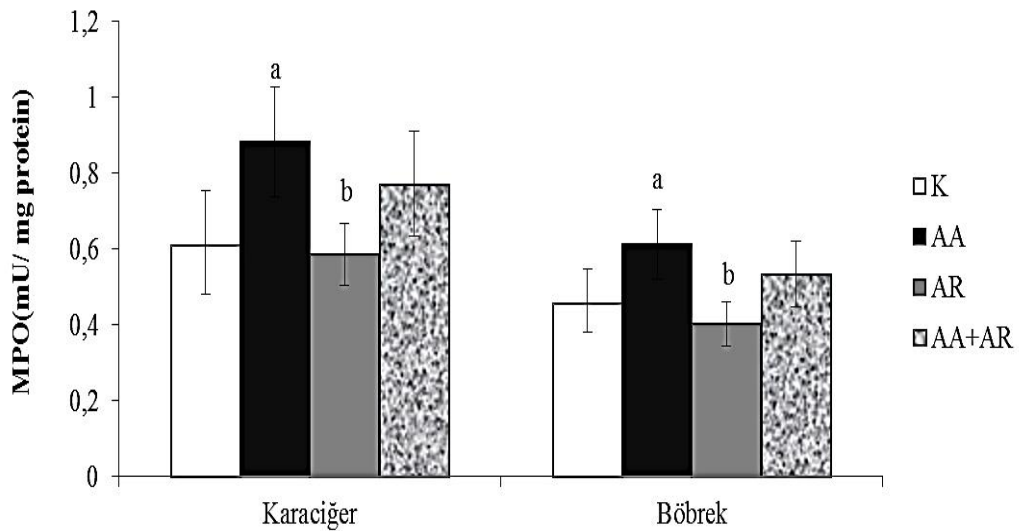


Şekil 4.1. Grupların karaciğer ve böbrekte GST aktivitesi

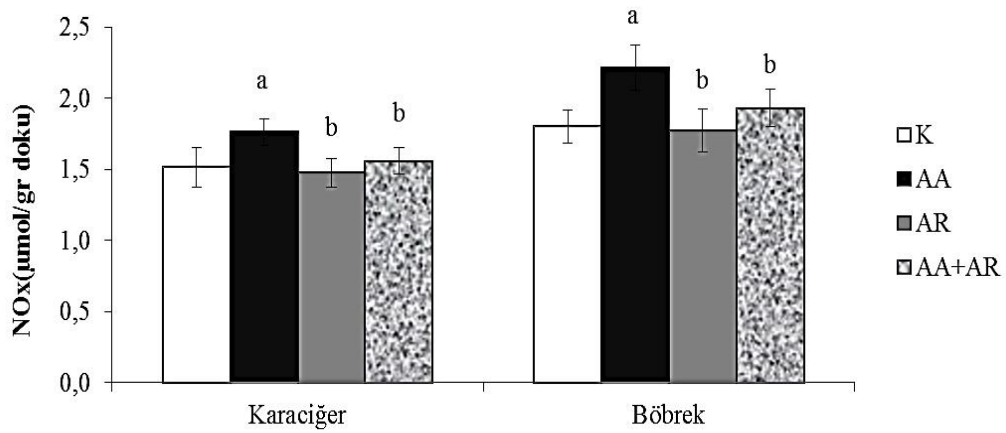


Şekil 4.2. Grupların karaciğer ve böbrekte G6PD aktivitesi

AA verilen ratlarda, kontrol grubuna kıyasla MPO aktivitesinin karaciğer ve böbrekte sırası ile % 44 ve % 32 oranında arttığı görülmüştür ($p < 0,05$). Benzer şekilde, NOx seviyesinde karaciğer ve böbrekte sırası ile % 17 ve % 23 oranında artış görülmüştür ($p < 0,05$). AR yağının tek başına verildiği grup kontrol ile kıyaslandığında karaciğer ve böbrekte MPO aktivitesinde ve NOx seviyesinde önemli bir farklılık görülmemiştir ($p > 0,05$). AA ve AR yağı birlikte verildiği grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her iki inflamasyonel belirteçde de azalma görülmüş ve değerler normale dönmüştür.



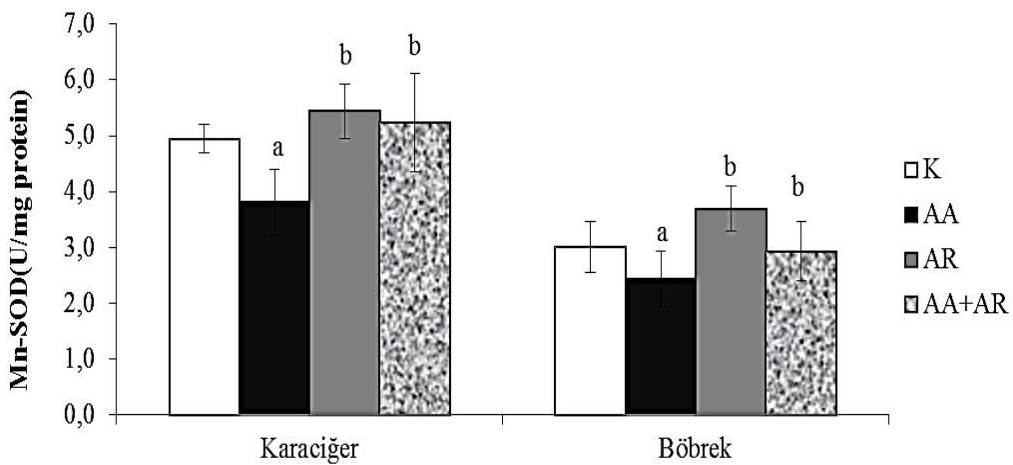
Şekil 4.3. Grupların karaciğer ve böbrekte MPO aktivitesi



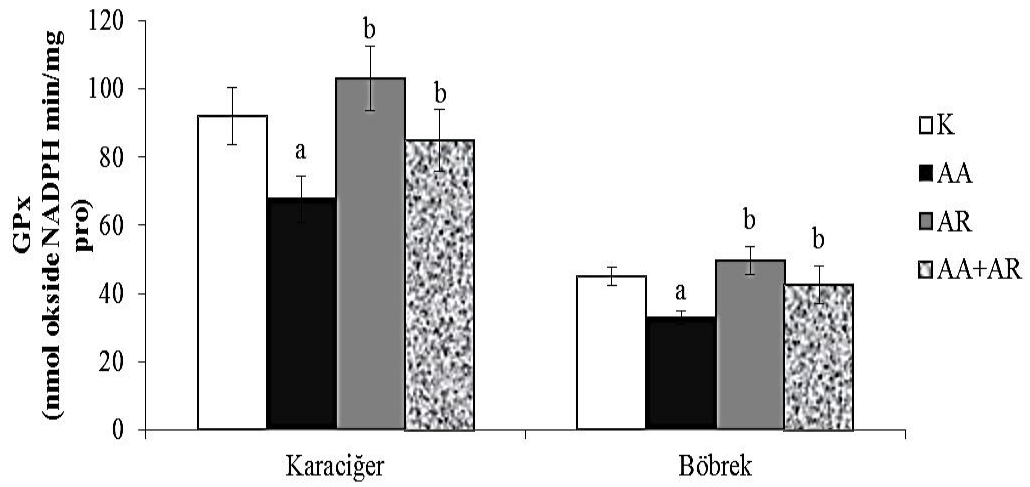
Şekil 4.4. Grupların karaciğer ve böbrekte NOx düzeyleri

4.2. Karaciğer ve Böbrek Mitokondrisindeki Enzimatik ve Enzimatik Olmayan Oksidatif Stres Parametreleri

Şekil 4.5.'de ve 4.6.'da gösterildiği gibi, AA verilen grupta Mn-SOD kontrol grubu ile kıyaslandığında karaciğerde %30, böbrekte %23 ve GPx karaciğerde % 36 ve böbrekte % 37 oranında belirgin oranda azalmıştır ($p < 0,05$). Buna karşın böbrek Mn-SOD aktivitesinde AA etkisi ile belirgin bir değişiklik görülmemiştir. Tek başına AR verilen grup kontrol grubu ile kıyaslandığında her iki enzimde de önemli bir fark görülmemiştir ($p > 0,05$). AA ile birlikte AR verildiğinde her iki dokuda da Mn-SOD ve GPx aktivitelerinin tamamen normale döndüğü görülmüştür.

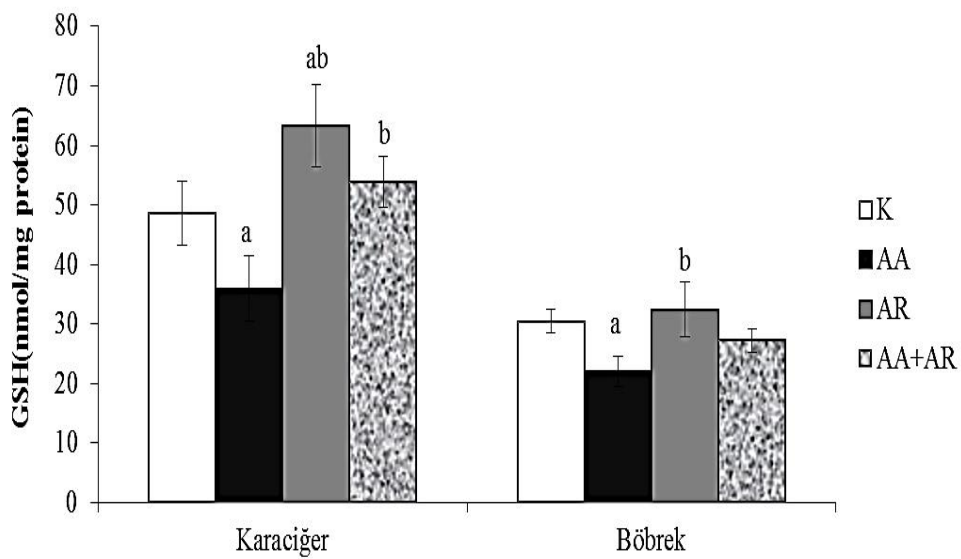


Şekil 4.5. Grupların karaciğer ve böbrekte Mn-SOD aktiviteleri



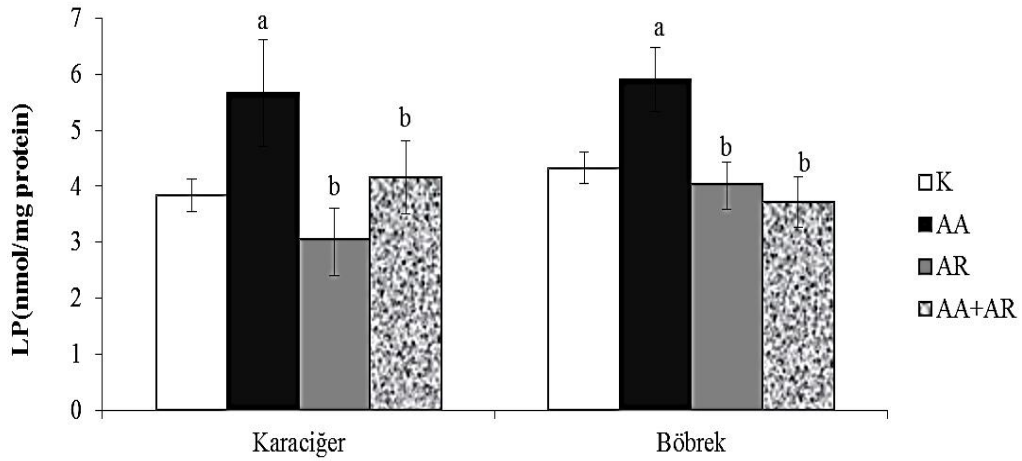
Şekil 4.6. Grupların karaciğer ve böbrekte GPx aktiviteleri

AA etkisi ile GSH miktarı karaciğerde % 35, böbrekte % 34 oranında azalmıştır ($p < 0,05$). Diğer oksidatif stres parametrelerinden farklı olarak karaciğerde tek başına AR yağı verilen grupta kontrol grubuna göre GSH miktarında artış olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). AA+AR grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında özellikle karaciğerde olmak üzere her iki dokuda da GSH miktarının arttığı görülmüştür (Şekil 4.7.).

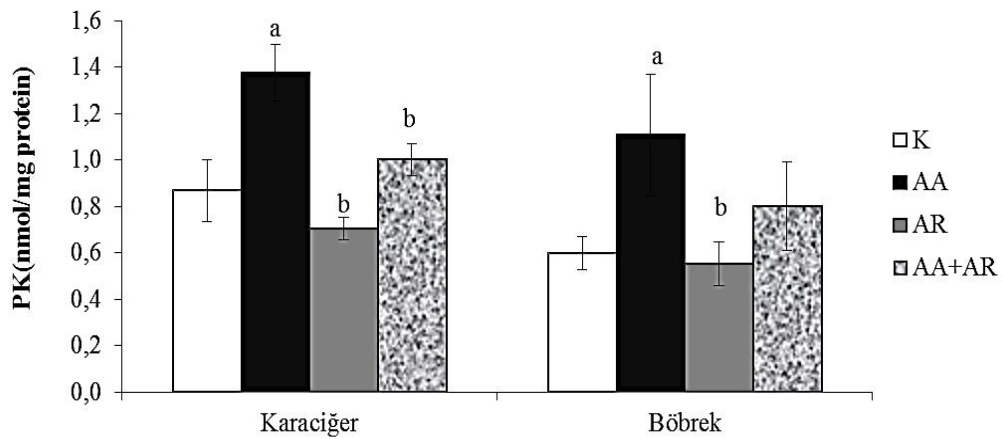


Şekil 4.7. Grupların karaciğer ve böbrekte GSH seviyeleri

Buna karşın önemli oksidatif stres parametresi olan LP'nin karaciğerde %47 ve böbrekte %36 oranında arttığı görülmüştür. Benzer şekilde AA etkisi ile PK düzeyinin de karaciğerde %57 ve böbrekte %68 oranında önemli derecede arttığı görülmüştür ($p < 0,05$). AA ile birlikte AR yağının verilmesi mitokondriyal GSH miktarını artırarak, LP ve PK miktarını azaltarak AA ile indüklenen mitokondriyal oksidatif stres hasarını önemli derecede azalttığı görülmüştür ($p < 0,05$). Her iki etken maddenin birlikte verildiği grup, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her iki dokuda da LP ve PK değerlerinde anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$) (Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.).



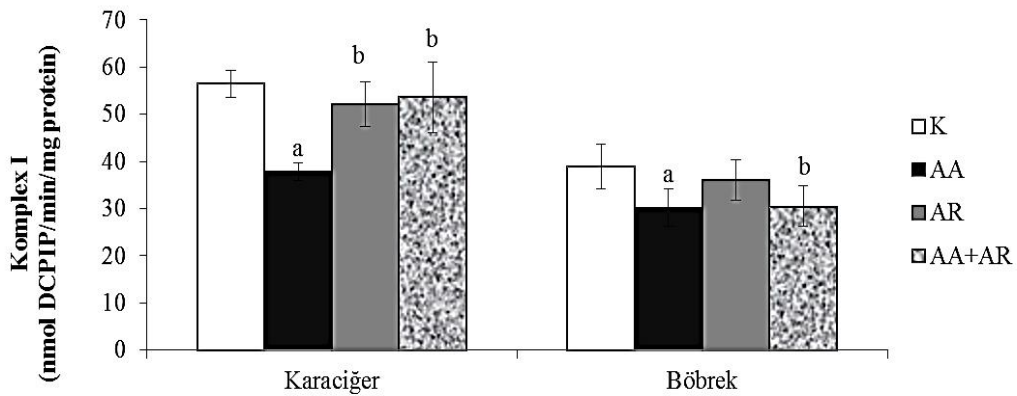
Şekil 4.8. Grupların karaciğer ve böbrekte LP seviyeleri



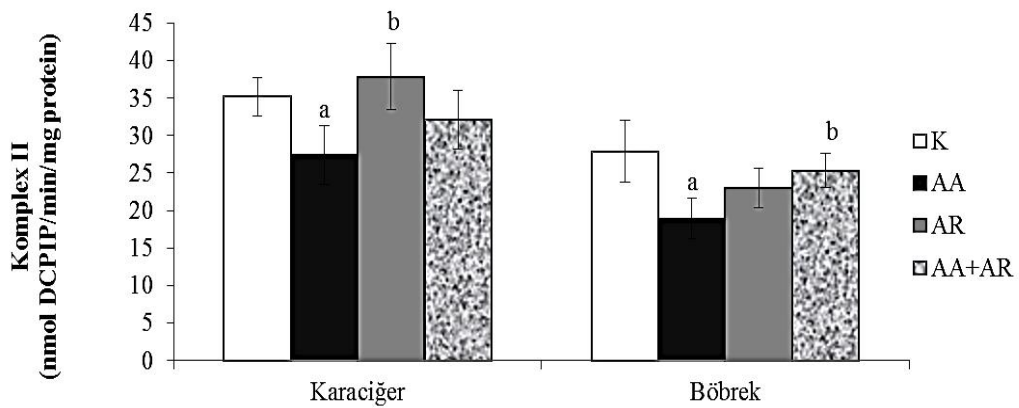
Şekil 4.9. Grupların karaciğer ve böbrekte PK seviyeleri

4.3. Karaciğer ve Böbrek Mitokondrisindeki Oksidatif Fosforilasyon, TCA Enzimleri, ATP Seviyesi ve Mitokondriyal Metabolik Fonksiyonun Değerlendirilmesi

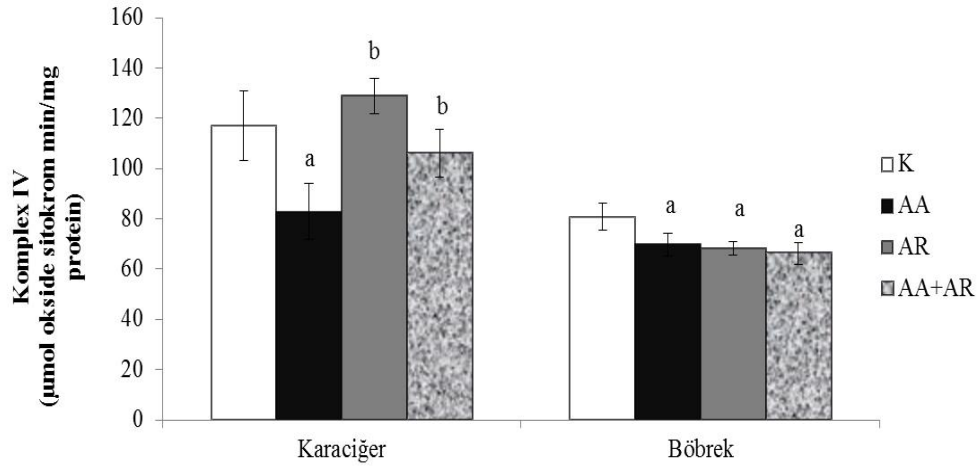
AA etkisi ile karaciğer ve böbrekte oksidatif fosforilasyon enzimlerinde önemli oranda baskılanma görülmüştür ($p < 0,05$); Kompleks I, II ve IV için sırası ile karaciğerde %50, %28, %41 ve böbrekte %29, %47, %16 oranında azalmalar meydana gelmiştir. AA+AR grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, böbrekteki kompleks IV aktivitesi hariç, diğer tüm oksidatif fosforilasyon enzimlerinin aralarında önemli bir fark olmadığı ($p > 0,05$) yani AR yağının AA etkisi ile azalan oksidatif fosforilasyon enzimleri normalize ettiği görülmüştür.



Şekil 4.10. Grupların karaciğer ve böbrekte kompleks I aktiviteleri

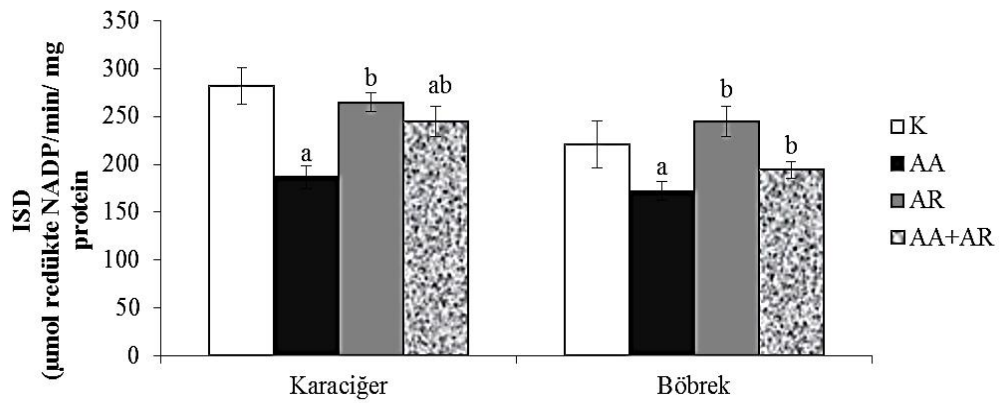


Şekil 4.11. Grupların karaciğer ve böbrekte kompleks II aktiviteleri

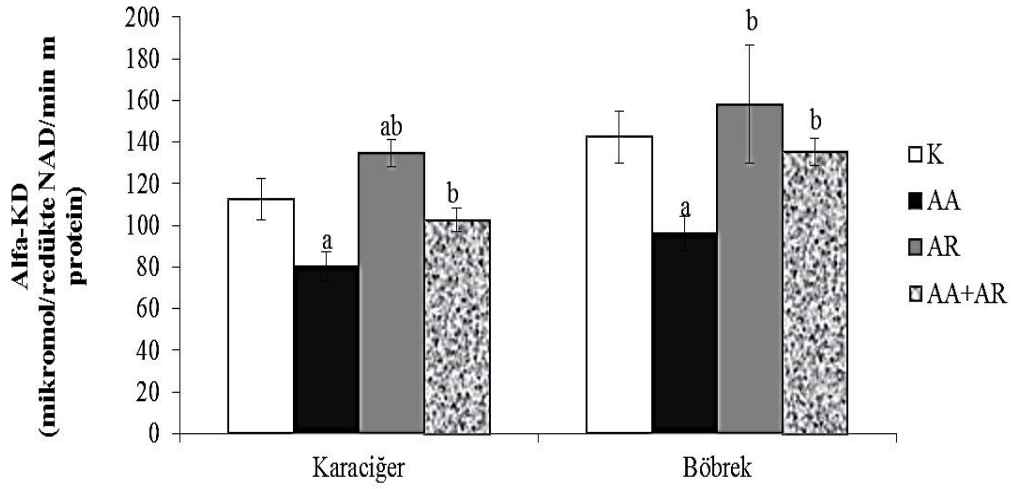


Şekil 4.12. Grupların karaciğer ve böbrekte kompleks IV aktiviteleri

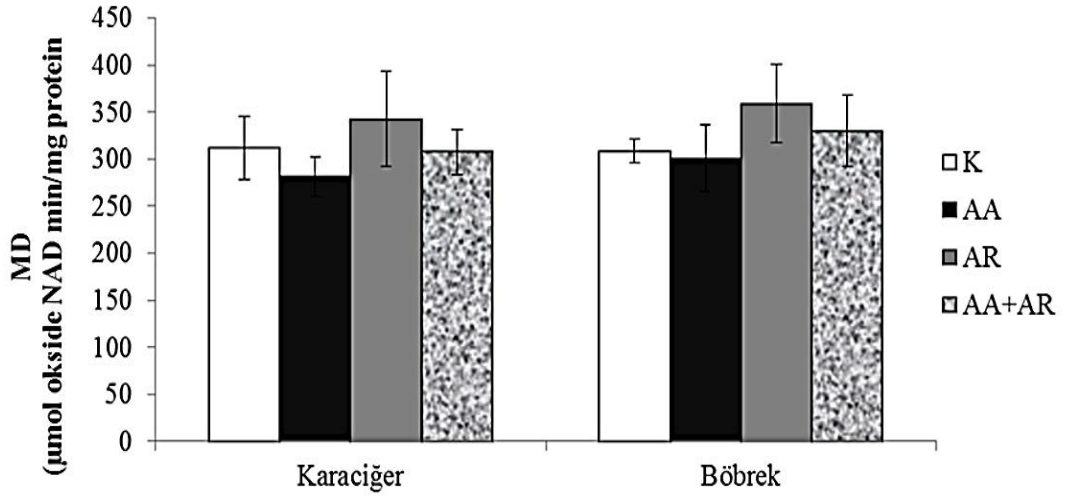
Benzer şekilde, TCA enzimleri ISD, α -KD enzimlerinde de AA etkisi ile sırası ile karaciğerde %51, %40 ve böbrekte %28, %48 azalma görülmüştür. AA ya da AR yağı tek tek veya birlikte verildiğinde böbrekte veya karaciğerdeki MD aktivitesi üzerine herhangi bir etki yapmamıştır ($p>0,05$). AA ve AR yağının birlikte verildiği grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında AR yağı etkisi ile genel olarak enzim aktivitelerinin arttığı ve gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı görülmüştür. İstisnai olarak, AA+AR grubunda α -KD enzim aktivitesinin AA verilen gruba göre arttığı ($p<0,05$) fakat kontrol grubu ile kıyaslandığında, bu artışın yeterli olmadığı AA+AR grup değerlerinin kontrol grubu ile istatistiksel olarak farklı olduğu görülmektedir.



Şekil 4.13. Grupların karaciğer ve böbrekte ISD aktiviteleri



Şekil 4.14. Grupların karaciğer ve böbrekte α -KD aktiviteleri

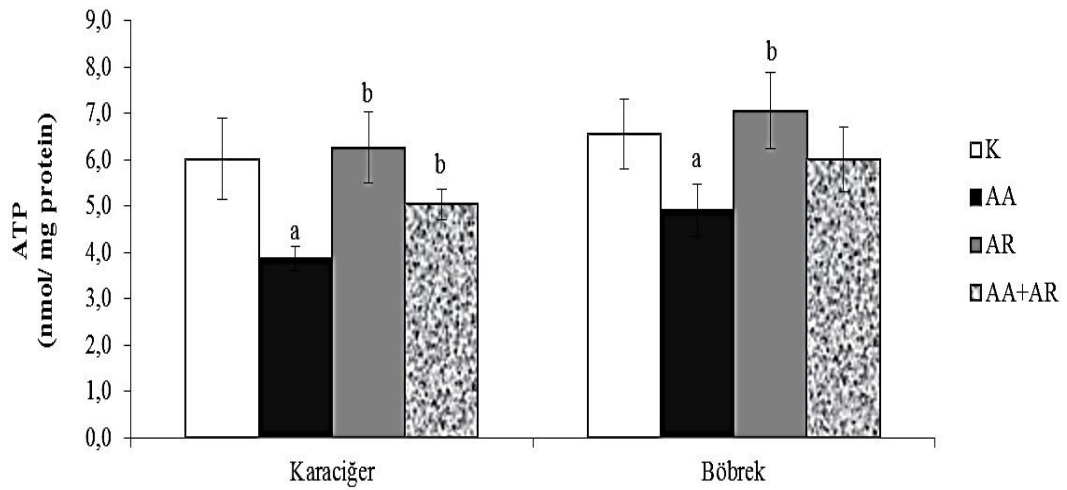


Şekil 4.15. Grupların karaciğer ve böbrekte MD aktiviteleri

Genel olarak değerlendirildiğinde, AR yağının karaciğerde α -KD ve böbrekte kompleks IV hariç hemen hemen bütün oksidatif fosforilasyon ve TCA enzimlerini iyileştirdiği, normale döndürdüğü görülmektedir. AR yağının tek başına verildiği grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sadece karaciğerde α -KD enzim aktivitesinin böbrekte ise kompleks IV enzim aktivitesinin arttığı ($p < 0,05$), diğer enzim aktiviteleri ile bir fark olmadığı ($p > 0,05$) görülmüştür.

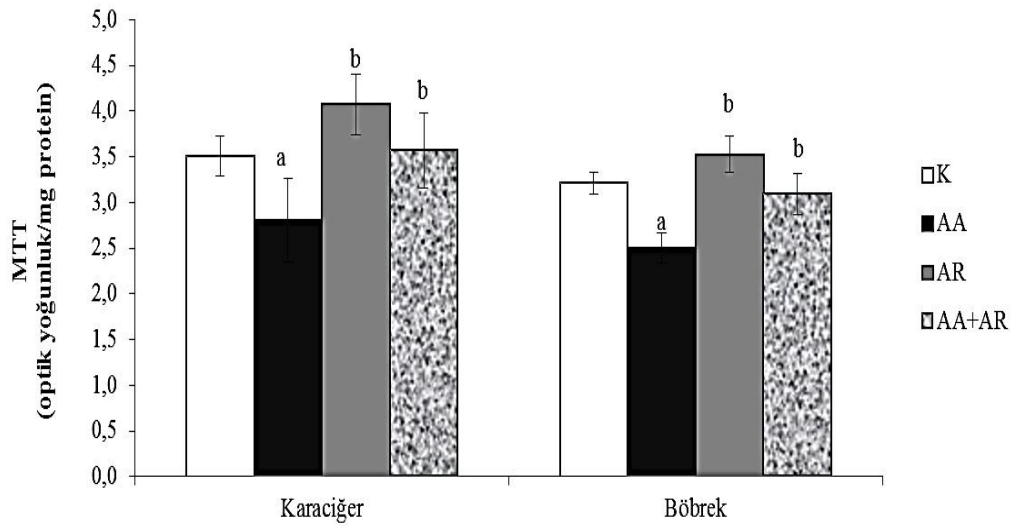
4.4. Karaciğer ve Böbrekte ATP Miktarı ve Mitokondriyal Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi

AA etkisi ile ATP miktarı karaciğerde %55, böbrekte % 33 oranında azalmıştır ($p < 0,05$). AR yağının tek başına verildiği grup ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0,05$). AA+AR grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli bir farklılık görülmemiştir yani AR yağı karaciğer ve böbrekte AA'le indüklenen ATP seviyesindeki azalmayı ortadan kaldırmıştır ($p > 0,05$).



Şekil 4.16. Grupların karaciğer ve böbrekte ATP seviyeleri

Benzer şekilde, AA etkisi ile MTT değeri karaciğerde %25, böbrekte %28 oranında azalmıştır ($p < 0,05$). AR yağının tek başına verildiği grup ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0,05$). AA+AR grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli bir farklılık görülmemiştir yani AR yağı karaciğer ve özellikle de böbrekte AA ile indüklenen MTT değerindeki azalmayı ortadan kaldırmıştır ($p > 0,05$).



Şekil 4.17. Grupların karaciğer ve böbrekte MTT seviyeleri

5. TARTIŞMA

Diyet, kimyasallar, endüstriyel ve laboratuvar ortamları gibi çevresel faktörler göz önüne alındığında AA modern insanın kaçınılmaz olarak maruz kaldığı önemli bir kimyasaldır. AA büyük oranda hemoglobine bağlanır. Bu bağlanma kimyasal sentez fabrikalarında, laboratuvarında poliakrilamid jel analizlerinde (54 pmol / g globin) ve sigara içenlerde (116 pmol / g globin sigara içmeyenlerde 31 pmol/ g globin) olarak tespit edilmiştir. AA yüksek ısıda pişmiş karbohidrattan zengin gıdalarda bol miktarda bulunmaktadır, örneğin ticari patates ürünleri ve gevrek ekmekler yüksek sıcaklıklarda ısıtıldığında (150–4000 µg/kg) arasında AA tespit edilebilmektedir. AA' in küçük ama sürekli maruz kalınan dozları insan için önemli tehlike arz etmektedir.

Litaratürde AA'in dokularda nötrofil infiltrasyonunu ve MPO aktivitesini artırdığına dair çalışmalar bulunmaktadır. Çalışmamızda argan yağının anti-inflamasyonel etkisini göstermek için oksidatif stresle de yakından ilgili MPO aktivitesine ve doku NOx seviyesine bakıldı. MPO, hidrojen peroksti uzaklaştıran ve toksik hipoklor (HOCl) oluşumuna neden olarak inflamasyonu artıran bir lizozomal enzimdir [Lefkowitz and Lefkowitz, 2008]. MPO aynı zamanda ROT'un, nitrik oksit radikallerinin, komplement faktörlerin ve pro-inflamasyonel sitokinlerin oluşmasında rol oynar. MPO sadece granüositler tarafından oluşturulan antimikrobiyal amaçlı bir enzim değildir aynı zamanda dejeneratif ve immünolojik böbrek hastalıklarının gelişiminde de rol oynar [Malle et al.,2003]. Çalışmamızda AA etkisi MPO aktivitesinin arttığı görülmüştür. Ondört gün boyunca 5, 10 ve 20 mg/kg AA verilen ratların böbrek, karaciğer ve beyin dokularında MPO aktivitesinin arttığı görülmüştür [Zhang et al., 2013]. Benzer şekilde ratlara 10 gün boyunca verilen 40 mg/kg (i.p) AA'in karaciğer, böbrek, beyin ve testislerde nötrofil infiltrasyonunun artışına paralel olarak MPO aktivitesinin de anlamlı derecede artırdığı gözlemlenmiştir [Alturfan et al., 2012]. Ratlara 30 gün boyunca 20 mg/kg gavajla AA verilen ratların karaciğer, beyin ve testislerinde MPO aktivitesinin arttığı görülmüştür [El-Beltagi and Ahmed, 2016].

Her ne kadar düşük miktardaki NO diğer serbest radikaller gibi başta karaciğer olmak üzere dokularda dolaşımın optimal olarak gerçekleşmesinde önemli rol

oynasada aşırı üretimi nitrosative stresin sebebi olmaktadır. Karaciğerde hem endotel hücreleri eNOS (endotelyal nitrik oksit sentetaz) ve kupffer hücreleri iNOS (indüklenabilir nitrik oksit sentetaz) üreterek vazodilasyonu artırmakta ve doku dolaşımının sağlıklı olmasını sağlamaktadır. Ancak diğer serbest radikallerle birlikte NO ve sitokinlerin üretimi kanın şekilli elemanlarının endotel hücrelere yapışmasına ve doku iskemisine neden olarak dokuda hasarına neden olmaktadır. NO dokuda serbest radikallere bağlanarak onların etkisini azaltıyor gibi gözükse de oluşan peroksinitrit hemen uzaklaştırılmaz ise nitrosative strese neden olur bu durum ise lipid peroksidasyonuna ve doku hasarına neden olmaktadır. Nitekim deneysel olarak karaciğer toksititesi oluşmadan önce NO oluşumunu bloke eden L-NAME gibi maddelerin verilmesi hasarı önleyebilmektedir [Tür, 2008]. Prasad ve Muralidhara [2014] yaptıkları çalışmalarda haftada 3 gün 5 hafta boyunca (50 mg/kg) AA verilen ratların beyinlerinde oksidatif stresle birlikte NOx seviyesinin arttığını gözlemlemişlerdir. Onbeş gün boyunca 20 mg/kg ağırlığında AA verilen rat karaciğer ve böbrek dokusunda NO miktarının arttığı görülmüştür [Abdel-Daim ve ark., 2015]. Benzer şekilde 1 mg/kg/gün AA ile beslenen rat karaciğer ve beyin dokularında NO miktarının arttığı gösterilmiştir [Ghareeb et. al., 2010].

Çalışmamızda gerek karaciğer gerekse böbrek mitokondrilerinde AA etkisi ile PK ve LP'nin belirgin bir şekilde arttığı görülmüştür. Dokularda artan bu oksidatif stres parametreleri artan MPO ve NOx seviyesi ile ilgilidir çünkü MPO tarafından oluşturulan klorlu bileşikler nitril klorür (NO_2Cl) ve azot dioksit (NO_2) mitokondriyal lipid ve proteinleri etkileyerek PK ve LP'nin artmasına neden olmuştur. AA uygulanmış BV-2 mikrogliyal hücrelerde NO miktarının arttığı ve kompleks I, II ve IV oksidatif fosforilasyon enzimlerinin baskılanarak mitokondriyal fonksiyonların bozulduğu görülmüştür [Liu ve ark., 2015].

Çalışmamızda haftada 3 gün 50 mg/kg AA verilen ratlarda sitozolik GST ve G6PD aktivitelerinin hem karaciğerde hem de böbrekte belirgin bir şekilde azaldığı fakat bu baskılanmanın AR yağı etkisi ile ortadan kalktığı görülmektedir. Bunun aksine Zhang ve ark., (2013) 14 gün boyunca 5, 10 ve 20 mg/kg AA verilen ratların böbrek, karaciğer ve beyin dokularında GST aktivitesinin arttığını rapor etmişlerdir. GST enziminin regule edilmesinde G6PD enziminin önemi büyüktür. G6PD enzimi

pentoz fosfat yolunun yani sitozolik NADPH oluşturan metabolik yolun önemli bir enzimidir. NADPH hiç kuşkusuz en önemli redükthanlardan biridir, GSSG glutatyon redüktaz tarafından tekrar GSH haline dönüşümünü sağlar ve oksidatif stresin önlenmesinde son derece önemlidir. G6PD enzimi bakımından mutant farelerin böbreklerinde GSH seviyesinin azaldığı ve oksidatif hasarın arttığı görülmüştür [Xu et.al., 2010]. AR yağının G6PD enzimi üzerindeki etkisi ilk kez bu çalışma ile ortaya konmuştur. Fakat AR yağının glutatyon bağımlı enzim olan GST aktivitesi üzerine regüle edici etkisi rat karaciğerinde gösterilmiştir. Argan yağının 3 hafta boyunca 5 ml/kg gavaj yolu ile verilmesi rat karaciğerinde civa klörür ile baskılanan GST enziminin normale dönmesine neden olmuştur [Necib et al., 2013].

Daha önce yapılan çalışmalar AA toksitesinin esas mekanizmasının GSH miktarındaki baskılanma ile ilgili olduğunu ortaya koymuşlardır [Yousef and El-Demerdash,2006; Krishna and Muralidhara, 2015]. Litaratürde AA'in çeşitli dokularda oksidatif stres oluşturduğuna ilişkin deneysel hayvan çalışmaları bulunmaktadır fakat subsellüler düzeyde yani sitozolik ve mitokondriyal fraksiyonlarda karaciğer ve böbrek dokusunda AA'in oluşturduğu hasar detaylı olarak ilk kez bu çalışma ile ortaya konmuştur. Sözelimi; AA'in karaciğer, akciğer, beyin ve testis gibi dokularda GSH seviyesini düşürdüğü ve LP seviyesini artırdığını Alturfanve ark [2012] tarafından rapor edilmiştir. Beş gün boyunca 50 mg/kg AA verilen farelerde karaciğer sitozolik CuZn-SOD ve GPx aktivitelerinde baskılanma olduğu görülmüştür [Zhao ve ark.,2015]. Çalışmamızda AA etkisi ile mitokondriyal GSH seviyesindeki azalma mitokondrideki ROT'nin ve LP'nun artmasına neden olarak mitokondriyal fonksiyonların bozulmasına neden olmuştur. GSH seviyesindeki azalma karaciğer ve böbrek mitokondrisinde yer alan-SH içeren enzim ve proteinlerin yapılarının bozulmasına da sebep olabilmektedir. AA verilen deney hayvanlarında mitokondriyal GSH seviyesinin düşmesine bağlı olarak ortaya çıkan mitokondriyal oksidatif stres rat karaciğerinde [Lee ve ark., 2012] ve beyin dokusunda [Krishnave Muralidhara, 2015; Aydın, 2017] gösterilmiştir.

AA'in in vivo karaciğer ve böbrek mitokondriyal antioksidan enzimleri üzerine olan etkisi ilk kez bu çalışma ile gösterilmiştir. AA ile mitokondriyal LP ve PK miktarı artmış, mitokondriyal antioksidan enzimler (MnSOD ve GPx)'nin seviyelerinde

önemli düşüşler meydana gelmiştir. Bütün bu bulgular 50 mg/kg haftada 3 gün 30 gün boyunca verilen AA'in karaciğer ve böbrek mitokondrilerinde ciddi oranda oksidatif stress meydana getirdiğini ortaya koymaktadır. Benzer şekilde aynı dozdaki AA'in rat beyin mitokondrilerinde de oksidatif strese neden olduğu görülmüştür [Aydın, 2017].

AA ile birlikte AR yağı verilmesi her iki dokuda da MPO, NO_x, PK, LP ve enzimatik mitokondriyal enzim aktivitelerinin normale dönmesine neden olmuştur. Elde ettiğimiz bu bulgular AR yağının antioksidan özellik taşıdığını göstermektedir ve literatürdeki bazı in vivo ve in vitro çalışmalar AR yağının antioksidan özelliklerini destekler niteliktedir [Aydın, 2017; Khallouki ve ark., 2003; Necib ve ark., 2013; El Abbassi ve ark., 2014; Eljaoudi ve ark., 2015]. AR yağı aynı zamanda karaciğer koruyucu özelliği taşımaktadır [El Abbassi ve ark., 2014] ve hemodiyaliz hastalarında oksidatif stresi ve kan lipit düzeylerini iyileştirdiği rapor edilmiştir [Eljaoudi ve ark., 2015].

Çalışmamızda AA'in mitokondriyal proton motive edici gücünü azalttığı buna bağlı olarak ratların karaciğer ve böbrek dokularında ETS'nin inhibe edilerek ATP sentezinin önlendiği görülmüştür. Kompleks I ve kompleks IV ATP'nin üretilmesinde kritik rol oynayan mitokondriyal solunum enzimleridir. Zhao ve ark., [2015] yaptıkları çalışmada AA verilen fare karaciğerinde ROT miktarının arttığını, solunum enzimleri (kompleks I-IV) 'nin baskılandığını, mitokondriyal membranındaki kardioplipin düzeyindeki azalmaya bağlı olarak mitokondriyal fonksiyonların bozulduğunu rapor etmişlerdir. Kardioplipin mitokondriyal membranların yağ asiti komponentidir ve ETS için son derece önemlidir. Hepatik steatosisli hastalarda karaciğerde bu fosfolipitin peroksidasyona uğraması sonucu kompleks I aktivitesinin bozulduğu görülmüştür [Gusdon ve ark., 2014]. Çalışmamızda haftada 3 gün 50 mg/kg AA verilen ratlarda oksidatif fosforilasyon enzimlerinin baskılandığını gözlemledik. Öte yandan, Lee ve ark. [2012], içme suyuna 500 mg / L AA'in 3 hafta süreyle verilmesinin, Big Blue fare karaciğerlerinde oksidatif fosforilasyon ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerinin önemli ölçüde indüklediğini gözlemlemişlerdir. AR yağının karaciğer ve böbrekte ETS enzimlerini normalize ettiği AA ile oluşan bu enzim aktivitesindeki baskılanmanın ortadan

kalktığını görmekteyiz. Oleik asit (C18:1) argan yağında bulunan esas tekli doymamış yağ asitidir. Mitokondriyal membranlarda tekli doymamış yağ miktarının artması mitokondriyal membranların peroksidatif hasara karşı dayanıklılığını artırmakta ve ETS'yi oksidatif hasara karşı korumaktadır [Quiles ve ark., 2016].

Çalışmamızda ilk kez AA etkisi ile karaciğer ve böbrek hasarının TCA enzimleri, ATP seviyesi ve mitokondriyal metabolik fonksiyonla ilişkilerini ortaya koyulmuştur. Calabrese ve ark. [2001], oksidatif stresin ETS ve TCA enzimlerini inhibe ederek ATP miktarını azalttığı ve hücrel disfonksiyona neden olduğunu göstermişlerdir.

Memelilerde ISD'in değişik formları bulunmaktadır. Biz çalışmamızda mitokondriyal NADP⁺ bağımlı ISD aktivitesini inceledik. ISD mitokondriyal GSH'ın rejenerasyonunu sağlayan NADPH 'ı üreten ve bu nedenle mitokondriyal oksidatif hasarın önlenmesinde çok önemli rol oynayan bir enzimdir. Çalışmamızda, AA etkisi ile ISD aktivitesinin baskılandığını gözlemledik. Bu durum göz önüne alındığında AA etkisi ile karaciğer ve böbrek mitokondrisindeki GSH miktarının düşmesi beklenen bir sonuçtu. ISD 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 ve ark.,2003]. AA ile birlikte AR verildiğinde, AA tarafından baskılanan ISD enzimin normale döndüğü görülmektedir. Bu durum AR yağının enzimin muhtemel inhibitörleri olan membran lipit peroksidasyon ürünü 4- hidroksinonenal ve H₂O₂'in oluşumunun engellenmesi ile açıklanabilir. Çünkü AR yağı lipit peroksidasyonunu ve H₂O₂ oluşumunu büyük ölçüde engellemektedir [Eljaoudi ve ark., 2015; Aydın, 2017]. Çalışmamızda AA'in α -KGD aktivitesini de inhibe ettiği görülmektedir. α -KGD, NADH oluşumunda görev alan çok önemli bir TCA döngüsü enzimidir. Bu enzimde ISD enziminde olduğu gibi oksidanlara karşı duyarlıdır ve MPO ürünü hipoklorik asit ve mono-N-kloramin gibi oksidanlar tarafından inhibe edilebilmektedir [Jeitner ve ark., 2005].

Süksinat dehidrogenaz ETS' nin konstitüv bir enzimi olup MTT'den formazon oluşturur. MTT değeri mitokondrinin canlılığını ve bioenerjetik davranışını

gösterir. Çalışmamızda AA verilen farelerde MTT değerinin yani mitokondrinin bioenergetik faaliyetlerinin azaldığı görülmektedir bu bulguların daha önceki çalışmalarla uyumlu olduğu görülmektedir [Krishna ve Muralidhara, 2015; Aydın,2017]. AR yağı tarafından mitokondriyal dehidrogenazların, özellikle de süksinat dehidrogenazın aktivitesindeki artış MTT redüksiyonunu artırmıştır.

AR yağı tarafından mitokondriyal oksidatif stresin, bioergetiğin, ETS ve TCA enzimlerinin normalleştirilmesi AR'ın eşsiz içeriği ile ilgilidir. AR tokoferoller, polifenoller ve CoQ10 gibi önemli mitokondriyal antioksidanlar içermektedir [López ve ark., 2013]. Vitamin E'nin mitokondrideki süperoksit oluşumunu regüle ettiği ve diyetel vitamin E'nin doza bağlı olarak iskelet kası ve karaciğerde mitokondriyal H₂O₂ oluşumunu azalttığı rapor edilmiştir [Chow ve ark., 1999]. AR aynı zamanda vanilik asit, siyringik asit, tirozol ve yüksek miktarda ferulik asit içermektedir [Khallouki ve ark., 2003]. Ferulik asitin doğal bir antioksidan olduğu, ratların karaciğer ve böbreğinde sepsisle indüklenen oksidatif hasarı önlediği gösterilmiştir [Bacanlı ve ark., 2014]. Benzer şekilde CoQ10' da iyi bir antioksidan olmanın yanısıra elektron ve protonların transportunda ve ATP üretiminde rol oynayan dehidrogenaz enzimlerinin koenzimi olarak görev yapmaktadır [Crane et.al., 1997].

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

AA, karaciğer ve böbrek dokusunda direkt veya indirekt olarak reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin artmasına, oksidatif ve nitrositatif stresi artırarak doku hasarına neden olmuştur. AR yağı, inflamasyonu ve oksidatif stresi iyileştirmiş, mitokondriyal metabolik fonksiyon, ATP seviyesi, ETS ve TCA enzimlerinin aktivitesini normalleştirmiştir. Sonuç olarak AR yağının AA ile indüklenen oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyonu iyileştirdiği söylenebilir. Bu sonuçların ışığında, gıda kaynaklı AA toksikasyonlarından korunabilmek için: Gıdaların 120 °C'den yüksek sıcaklıklarda pişirilmemesi, özellikle asparajin amino asidi bakımından zengin olan gıdaların (patates gibi) kızartılması yerine haşlanarak tüketilmesi tercih edilmelidir. Gıda kaynaklı AA'ye maruz kalan insanlar, sindirim kanalı dokularında ve karaciğerde GST aktivitesini artıran flavonoidlerden zengin sebze ve meyveleri yeterli miktarlarda ve günlük olarak tüketmelidir. Gıdalar ile vücuda alınan AA, GSH ile konjuge edilerek vücut dışına atılırken, genel olarak hücrelerde bir GSH azalması meydana gelmektedir. Bunun için insanların, önemli bir GSH öncülü olan sistein amino asidinden zengin gıdaları yeterli miktarlarda ve günlük olarak tüketmesi gerekir. Sürekli gıda kaynaklı AA'ye maruz kalan insanların, genel olarak vücudun antioksidan kapasitesini artıran maddeleri içeren gıdaları soğan, sarımsak, lahana, pırasa vb. bitkisel türleri, likopen içeren renkli sebze ve meyveleri, E vitamini içeren kuruyemişleri günlük diyetlerinde yeterli miktarlarda tüketmelerini özellikle tavsiye ediyoruz.

KAYNAKLAR

- Abdel-Daim, M.M., Abd Eldaim, M.A. and Hassan, A.G., “Trigonella foenum-graecum ameliorates acrylamide induced toxicity in rats: Roles of oxidative stress, proinflammatory cytokines, and DNA damage”, *Biochemistry and Cell Biology*, Jun;93(3):192-8(2015).
- Akalın, M.A., “Mitochondrial Diseases”, *International Journal of Medical Sciences*,1(22):64-9 (2005).
- Akarsu, S., “Şizofreni ve Mitokondri Disfonksiyonu”, *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar-Current Approaches in Psychiatry* 6(4):340-354,2014(2014).
- Akkuş, İ., “Serbest Radikaller ve Fizyoterapik Etkileri”, *Mimoza Basım*, Konya, s.4-113 (1995).
- Akpolat, T., Utaş, C., Süleymanlar, G., “Nefroloji El Kitabı”, *Hekimler Yayın Birliği*,(4.baskı) (2007).
- Altınöz, E., “Ratlarda, Akrilamit Kaynaklı Oksidatif Stres ve Genotoksisite Üzerine N-Asetilsisteinin Etkilerinin Araştırılması”, Doktora Tezi, *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Malatya(2009).
- Alturfan, A.A., Tozan-Beceran, A., Şehirli, A.O., Demiralp, E., Şener, G., Omurtag, G.Z., “Resveratrol ameliorates oxidative DNA damage and protects against acrylamide-induced oxidative stress in rats”, *Molecular Biology Reports*, Apr;39(4):4589-96(2011).
- Ansar, S., Siddiqi, N.J., Zargar, S., Ganaie, M.A., Abudawood, M., “Hepatoprotective effect of Quercetin supplementation against Acrylamide-induced DNA damage in wistar rats”, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, Aug 30;16(1):327(2016).
- Antmen, Ş.E., “Beta Talasemide Oksidatif Stres”, Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Biyokimya Anabilim Dalı, Adana (2005).
- Arusoğlu, G., “Akrilamit Oluşumu ve İnsan Sağlığına Etkileri ”, Derleme Makale, *Akademik Gıda* 13(1) 61-71(2015).
- Aydin, B., “Effects Of Argan Oil On The Mitochondrial Function, Antioxidant System And The Activity Of Nadph- Generating Enzymes İn Acrylamide Treated Rat Brain”, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume:87,Pages: 476-481,Mar,(2017).
- Aydoğdu, N., Kaymak, K., Yalçın, Ö., “Sıçanlarda Böbrek İskemi/Reperfüzyon Hasarında N-Asetilsisteinin Etkileri”, *Fırat Tıp Dergisi* 10(4): 151-155(2005).
- Bacanlı, M., Aydın, S., Taner, G., Göktaş, H.G., Şahin, T., Başaran, A.A., vd., “The protective role of ferulic acid on sepsis-induced oxidative damage in Wistar albino rats”, *Environmental Toxicology and Pharmacology*,38(3):774-82(2014).

Barber D., Haris S., “Oxygen free radicals and antioxidants: a review”, *American Pharmaceutical Review*,34: 26-35(1994).

Becalski, A., Lau, B.P., Lewis, D. and Seaman, S.W., “Acrylamide in French fries: influence of free amino acids and sugars”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3): 802-8(2003).

Bellahcen, S., Hakkou, Z., Ziyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Aziz, M., et al., “Antidiabetic and antihypertensive effect of Virgin Argan Oil in model of neonatal streptozotocin- induced diabetic and l-nitroarginine methylester (l-NAME) hypertensive rats”, *Journal of Chemical Information and Modeling*; 10: 29-36.(2013).

Bennani, H., Drissi, A., Giton, F., Kheuang, L., Fiet, J. and Adlouni ,A., “Antiproliferative effect of polyphenols and sterols of virgin argan oil on human prostate cancer cell lines”, *Cancer Detection and Prevention Journal*, 31: 64-69.(2007).

Berridge, M.V., Tan, A.S., “Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*,303:474–82 (1993).

Besaratinia, A., and Pfeifer, G.P., “Weak yet distinct mutagenicity of acrylamide in mammalian cells”, *Journal National Cancer Institute*, 95: 889–896(2003).

Boveris, A., “Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria”, *Methods Enzymol.*,105:429–35(1984).

Bozkurt, N., “Dmba İle Oluşturulan Rat Karaciğer Hasarında Resveratrol ve Pekmezin Karaciğer Enzimleri ve Oksidatif Stres Parametreleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması”, *İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, Malatya(2014).

Bradley, P.P., Priebat, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G., “Measurement of cutaneous inflammation, estimation of neutrophil content with an enzyme marker”, *Journal of Investigative Dermatology*, 78:206–209(1982).

Brent, P., Stanley, G., “Toxicology of acrylamide”, *Food Standards Australia New Zealand*(2003).

Bull, C., Niederhoffer, E.C., Yoshida, T., Fee, J.A., “Kinetic studies of superoxide dismutases properties of the manganese-containing protein from thermus-thermophilus”, *Journal of the American Chemical Society* ,113: 4069-4076(1991).

Büyükokuroğlu, M.E., Süleyman, H., “Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Eksikliği”, *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences Journal Identity* , 21(5):415-9(2001).

Calabrese, V., Scapagnini, G., Giuffrida, Stella, A.M, Bates, T.E., Clark, J.B., “Mitochondrial involvement in brain function and dysfunction: relevance to aging, neurodegenerative disorders and longevity”, *Neuro chemical Research*,26(6):739-64(2001).

Champe, R.A., Harvey R. A. and Ferrier D.R., , *Biyokimya, Nobel Tıp Kitapevleri LTD.ŞTİ.*, 248-249(2007).

Charrouf, Z. and Guillaume, D., “Ethnoeconomical, ethnomedical and phytochemical study of *Argania spinosa* (L.) Skeels”, *Journal of Ethnopharmacology*, 67:7–14(1999).

Chauhan, A., Chauhan, V., Brown, W.T., Cohen, I., “Oxidative stress in autism: Increased lipid peroxidation and reduced serum levels of ceruloplasmin and transferrin - the antioxidant proteins”, *Life Sciences*; 75: 2539–2549(2004).

Chow, C.K., İbrahim, W., Wei, Z., Chan, A.C., “Vitamin E regulates mitochondrial hydrogen peroxide generation”, *Free Radical Biology and Medicine*,27:580–587(1999).

Clair, D.K., Wan, X.S., Kuroda, M., et al. “Suppression of tumor metastasis by Manganese superoxide dismutase is associated with reduced tumorigenicity and elevated fibronectin”, *Oncology Report* 4: 753-757(1997).

Clay, H.B., Sullivan, S., Konradi, C., “Mitochondrial dysfunction and pathology in bipolar disorder and schizophrenia”,*International Journal of Developmental Neuroscience*; 29:311–324(2011).

Coşkun, A., “Hücrenin Enerji Santrali Mitokondri”, *Bilim ve Teknik Dergisi*, Nisan, (2011).

Crane, F.L., Navas, P., “The diversity of coenzyme Q function”,*Molecular Aspects of Medicine*,18:S1-6(1997).

Crofton, K.M., Padilla, S., Tilton, H.A., Anthony, D.C., Rayman, J.H. and Macphail, R.C., “The impact of dose rate on the neurotoxicity of acrylamide: The interaction of administrations dose, target – tissue concentrations tissues damage and functional effects”, *Toxicology and Applied Pharmacology*;139,165–178(1996).

Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T., ‘Hastalıkların Patogenez Ve Tedavisinde Reaktif Oksijen Partikülleri Ve Antioksidanlar’, Türk Nefroloji Diyaliz Ve Transplantasyon Dergisi/Office,*Journal Of The Turkish Nephrology, Association* 3-4: 96-101(1997).

Çavuşoğlu, C., “Gestasyonel Diabetes Mellitus Olgularında Oksidatif Stres Durumu, Tnf-A Ve Il-6 Düzeyleri”, *Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Ve Klinik Biyokimya Bölümü*, Uzmanlık Tezi, İstanbul(2009).

Çaylak, E., “Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar”, *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 9(1) : 73-83(2011).

Çelik, İ., “Bir Biyoreaktörde Ph’ In İç Model Kontrolü (IMC)”, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara(2007).

Çetik, S., “Sıçanlarda Siklofosamid Nedenli Kardiyotoksisitede Oksidatif Stres ve Kalp Hasarına Karşı Karvakrol’ün Koruyucu Etkisi”, Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı, Mart(2014).

Çetin, M., Deliorman Orhan, D., “Argan yağının biyolojik aktiviteleri ve tedavide kullanılışı”, *Spatula* DD. 5(1):7-14

Degli Esposti, D., Hamelin, J., Bosselut, N., Saffroy, R., Sebagh, M., Pommier, A., et al., “Mitochondrial roles and cytoprotection in chronic liver injury”, *Biochemistry Research International*, 2012:387626(2012).

Develioğlu, A.H., Taner, İ. L., “Miyeloperoksidaz”ın Özellikleri Ve Periodontal Hastalıktaki Önemi”, Cumhuriyet Üniversitesi, *Dişhekimliği Fakültesi Dergisi*, Cilt 1, Sayı 1,(1998).

Doğanay, S., Evereklioğlu, C., Er, H., et al., “Comparison of serum NO, TNF-alpha, IL-1beta, sIL-2R, IL-6 and IL-8 levels with grades of retinopathy in patients with diabetes mellitus”, *Eye Journal*, 16:163–170(2002).

Dönder, E., Ünal, M., Dabak, D.R., Kuloğlu, T., Özkan, Y., “Benfotiamin ve C Vitamininin Deneysel Diyabetik Sıçan Böbrek Dokusundaki Değişiklikler Üzerine Etkilerinin Araştırılması”, *Fırat Tıp Dergisi* 17(4): 189-195(2012).

Drose, S., Brandt, U., “Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain”, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 748: 145–169, (2012).

Duann, P., Lin, P.H., “Mitochondria Damage and Kidney Disease”, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 982:529-551(2017).

Dubowitz, V., “Muscle Disorders in Childhood. Second edition”, W.B. *Saunders company*, Chp 5:247(2000).

El-Abbassi, A., Khalid, N., Zbakh, H., Ahmad, A., “Physicochemical characteristics, nutritional properties, and health benefits of argan oil: a review”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54:1401-14(2014).

El-Beltagi, H.S. and Mohamed, H.I., “Reactive oxygen species, lipid peroxidation and antioxidative defense mechanism”. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 41(1), 44–57.(2013).

El-Beltagi, Hossam S.; Ahmed, Mahgoub M., “Assessment the protective role of quercetin on acrylamide-induced oxidative stress in rats”, *Journal of food biochemistry* 40 (6):715-723(2016).

Eljaoudi, R., Elkabbaj, D., Bahadi, A., Ibrahimi, A., Benyahia, M., Errasfa, M., “Consumption of Argan Oil Improves Anti-Oxidant and Lipid Status in Hemodialysis Patients”, *Phytotherapy Research*, 29:1595-9 (2015).

Erbil, B.G., “ Hemodiyaliz hastalarında tiroid fonksiyon testleri ve bazı biyokimyasal parametrelerin değerlendirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, **Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Kütahya(2009).

Ergezer, H., Gökçe, R. Hozer, Ş., Akcan, T.(2016), “Et ve Ürünlerinde Protein Oksidasyonu: Etki Mekanizması”, Tespit Yöntemleri ve Etkileri, Derleme Makale, **Akademik Gıda** 14(1) 54-60.

Esterbauer, H., Chessman, K.H.,(1990), “Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal”, **Methods Enzymol** 186:407-21.

Ezgü, F.S., Gündüz, M., Tümer, L., Hasanoğlu, A., Tıraş, Ü., Ünsal, R., Seneca, S., “Kompleks Iı”te Bcs1l Gen Mutasyonuna Bağlı Asidoz İle Seyreden Ağır Renal Tübülopati Ve Kolestazlı Bir Olgu: Yüksek Doz Bikarbonat Tedavisi Deneyimi”, **Türkiye Klinikleri Pediatrik Bilimler Dergisi** 1(10):3-5(2005).

Fatania, H., Nassar, K.E., Sidhan, V., “Purification and partial characterisation of NADP(+)-linked isocitrate dehydrogenase from rat liver cytosol”, **FEBS Letters**,320(1):57-60(1993).

Flohe, L., Gunzler, W.A. (1984), “Assays of glutathione peroxidase”, **Methods Enzymol** 105:114–121.

Forbes, J.M., “Mitochondria-Power Players in Kidney Function?”, **Trends in Endocrinology and Metabolism**, Jul;27(7):441-2(2016).

Friedman, M., “Chemistry, biochemistry and safety of acrylamide: A review”, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 51(16), 4504-4526(2003).

Geçkil, H., Biyokimya 2, İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Ve Moleküler Biyoloji Ve Genetik Bölümü, Şubat.(2012).

Gelpi, J.L., Dordal, A., Montserrat, J., et al., “Kinetic studies of the regulation of mitochondrial malate dehydrogenase by citrate”, **Biochemical Journal**, 283 (Pt1):289-97(1992).

Ghareeb, D.A., Khalil, S., Elbassoumy, A.M. ,et al., “Ameliorated effects of garlic (*Allium sativum*) on biomarkers of subchronic acrylamide hepatotoxicity and brain toxicity in rats”, **Toxicological& Environmental Chemistry**, 92(7):1357-1372(2010).

Ghorbel, I., Maktouf, S., Fendri, N., Jamoussi, K., Ellouze Chaabouni, S., Boudawara T., Zeghal, N., “Co-exposure to aluminum and acrylamide disturbs expression of metallothionein, proinflammatory cytokines and induces genotoxicity: Biochemical and histopathological changes in the kidney of adult rats”, **Environmental Toxicology**, Sep;31(9):1044-58(2016).

Gibson, K.M., Bennett, M.J., Mize, C.E., et al, “3-Methylglutaconic aciduria associated with Pearson syndrome and respiratory chain defects”, **Journal of Pediatrics**,121:940(1992).

Granata, S., Gassa, A.D., Tomei, P., Lupo, A., Zaza, G., “Mitochondria: a new therapeutic target in chronic kidney disease”, *Nutrition Metabolism*, 25:12-49(2015).

Guenther, H., Anklam, E., Wenzl, T., Stadler, R. H. , “Acrylamide in coffee: Review of progress in analysis, formation and level reduction”, *Food Additives and Contaminants*, 24:60-70(2007).

Guillaume, D., Charrouf, Z., “Argan oil”. Monograph. *Alternative Medicine Review*. Sep;16(3):275-9(2011).

Gusdon, A.M., Song, K.X., Qu, S., “Nonalcoholic Fatty liver disease: pathogenesis and therapeutics from a mitochondria-centric perspective”, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014:637027.(2014).

Güngör, H., Türker P.,F., “Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı ve Tıbbi Beslenme, Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi”, Beslenme Ve Diyetetik Bölümü, Ankara, *Güncel Gastroenteroloji* 20/3.

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., “Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation”, *The Journal of Biological Chemistry* 249:7130-9.(1974).

Halliwell, B., Gutteridge, J.M., “Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease : An overview”. *Methods in Enzymology*., 186: 1-85(1990).

Halliwell, B., “Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human”, *American Journal of Medicine*, 91; 314-22.(1991).

Harvey, R.A., Champe, P.C., Ferrier, D.R.(Ed.), “ Lippincott’s Illustrated reviews serisinden: biyokimya”, *Nobel tıp kitabevleri* (3.baskı) (2007).

Hassanein, T., Frederick, T., “Mitochondrial dysfunction in liver disease and organ transplantation”, *Mitochondrion*, Sep;4(5-6):609-20(2004).

He, Y., Tan, D., Bai, B. et al., “Epigallocatechin-3-gallate attenuates acrylamide-induced apoptosis and astrogliosis in rat cerebral cortex”, *Toxicology Mechanisms And Methods* Volume: 27, Issue: 4, Pages: 298-306(2017).

Henry, J.B., “Clinical Diagnosis and Management By Laboratory Methods”, W.B. *Saunders Company*, 20th. (2001).

İliçin G., Biberöğlü K., Süleymanlar G., Ünal S., “İç Hastalıkları” (2.Baskı), *Güneş Kitabevi*(2003).

Janssen, A.J., Trijbels, F.J., Sengers, R.C., et al., “Spectrophotometric assay for complex I of the respiratory chain in tissue samples and cultured fibroblasts”, *Clinical Chemistry*, 53(4):729-34(2007).

Jeitner, T.M., Xu, H., Gibson, G.E., “Inhibition of the a-ketoglutarate dehydrogenase complex by the myeloperoxidase products, hypochlorous acid and mono-N-chloramine”. *Journal of Neurochemistry*, 92:302–310(2005).

Jiang, Q., Wong, J., Fyrst, H., Saba, J. D. and Ames, B. N., “ γ -Tocopherol or combinations of vitamin E forms induce cell death in human prostate cancer cells by interrupting sphingolipid synthesis”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:17825–17830(2004).

Johnson, D., Lardy, H., “Isolation of liver or kidney mitochondria”, *Methods Enzymol*, 10:94–96(1967).

Karabulut, H., Gülay, M.Ş., “Antioksidanlar”, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi *Veteriner Fakültesi Dergisi* (2016).

Kasırga, Z., “Sağlıklı Böbreklerde Korteks, Medulla, Sinus Hacimleri Ve Böbrek Boyutları İle Vücut Kompozisyonu Arasındaki İlişkinin Tespiti”, *Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Anatomi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ, (2016).

Kayış, T., “Diazinon’un Subletal Konsantrasyonlarının *Pimpla Turionellae* L.’nin Eşey Oranı ve Bazı Biyokimyasal Parametreleri Üzerine Etkileri” , Doktora Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana, (2010).

Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, İ., Biyokimya Kitabı, *Aktif Kitabevi*, 7.Baskı (2010).

Khan, M.R., Afzaal, M., Saeed, N., Shabbir, M., “Protective potential of methanol extract of *Digera muricata* on acrylamide induced hepatotoxicity in rats”, *African Journal Of Biotechnology*, Vol: 10, Issue: 42, Pages: 8456-8464 (2011).

Khallouki, F., Younos, C., Soulimani, R., Oster, T., Charrouf, Z., Spiegelhalder, B., et al., “Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects”, *Europaen Journal Cancer Preventive*, 12:67–75 (2003).

Kılıç, M., Kalkanoğlu Sivri, H.S., Dursun, A., Tokatlı, A., Coşkun, T., “Mitokondriyal kompleks I eksikliği: Bir vaka takdimi”, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 58: 68-71 (2015).

Kıran, T.R., “Hipertiroidili ve Hipotiroidili Hastalarda Oksidatif Stres Parametreleri Ve Adenozin Deaminaz Aktivitesi”, *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Doktora Tezi, Malatya (2007).

Kirman, C.R., Gargas, M.L., Deskin, R., Tonner-Navarro, L. and Andersen, M.E., “A physiologically based pharmacokinetic model for acrylamide and its metabolite, glycidamide, in the rat”, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, Part A; 66: 253-74, (2003).

Kocabaş, R.N., “İdrar Organik Asidlerinin Farklı Yaş Gruplarında Dağılımı”, *Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı*, Uzmanlık Tezi, İzmir, (2008).

Koç, F., Sarıca, Y., Yerdelen, D., ‘Mitokondriyal Hastalıklar’ Arşiv; 12 (Ek Sayı): 32 (2003).

- Konukoğlu, D., “Serbest Radikaller Ve Önemleri”, *Türkiye Aile Hekimliği Dergisi*;1(4):197-200 (1997).
- Köken, T., Kahraman, A., Serteser, M., Gökçe, Ç., “Hemodiyaliz ve Oksidatif Stres”, *Kocatepe Tıp Dergisi*, Ek:5, Sayı:9-13, (2004).
- Krishna, G., Muralidhara, “Inulin supplementation during gestation mitigates acrylamide-induced maternal and fetal brain oxidative dysfunctions and neurotoxicity in rats”, *Neurotoxicology and Teratology*,49:49-58 (2015).
- Kunwar, A. and Priyadarsini, K.I., “Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health”, *Journal of Medical & Allied Sciences*;1(2):53-60 (2011).
- Kurt, N., “Yaşa Bağlı Olarak Antioksidan Enzimlerinin Süperoksit Dismutaz (Sod), Katalaz (Cat) Aktivitelerinin ve Malondialdehit (MDA) Seviyesinin İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana (2008).
- Lloyd, R.V., Hanna,P.M., Mason,R.P., “The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction”,*Free Radical Biology & Medicine*; 22: 885-888 (1997).
- Liew, F.Y., Li, Y., Millot, S., “Tfn-Alpha Induced Macrophage Leismaneicidal Activity İs Mediated By Nitric Oxide From L-Arginine”, *Immunology*,71: 556-59 (1990).
- Lund, M.N., Heinonen, M., Baron, C.P., Estévez, M., “Protein oxidation in muscle foods: A review”, *Molecular Nutrition & Food Research* 55(1): 83-95(2011).
- Lau, D., Baldus, S., “Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease”, *Pharmacology & Therapeutics*, 111, 16-26 (2006).
- Lee, J.H., Yang, E.S., Park, J.W., “Inactivation of NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase by peroxynitrite.Implications for cytotoxicity and alcohol-induced liver injury”, *Journal of Biological Chemistry*, 278:51360-51371 (2003).
- Lee, T., Manjanatha, M.G., Aidoo, A., Moland, C.L., Branham, W.S., Fuscoe, J.C., et al., “Expression analysis of hepatic mitochondria-related genes in mice exposed to acrylamide and glycidamide”, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 75(6):324-39 (2012).
- Lefkowitz, D.L., Lefkowitz, S.S., “Microglia and myeloperoxidase: a deadly partnership in neurodegenerative disease”, *Free Radical Biology & Medicine*, 45,pp. 726–731 (2008).
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., et al., “Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins”, *Methods Enzymol* 186:464-78 (1990).
- Liu, Z., Song, G., Zou, C., Liu, G., Wu, W., Yuan, T., et al., “Acrylamide induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in BV-2 microglial cells”, *Free Radical Biology & Medicine*, Jul;84:42-53 (2015).

López, L.C., Cabrera-Vique, C., Venegas, C., García-Corzo, L., Luna-Sánchez, M., Acuña-Castroviejo, D., et al., “Argan oil-contained antioxidants for human mitochondria”, *Natural product communications*, 8:47-50 (2013).

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., “Protein measurement with the folin phenol reagent”, *Journal of Biological Chemistry*, 193:165-175 (1951).

López, L.C., Cabrera-Vique, C., Venegas, C., García-Corzo, L., Luna-Sánchez, M., Acuña-Castroviejo, D., et al., “Argan oil-contained antioxidants for human mitochondria”, *Natural product communications*, 8:47-50 (2013).

Lucas, D.T., Aryal, P., Szweda, L.I., et al., “Alterations in mitochondrial function in a mouse model of hypertrophic cardiomyopathy”, *American Journal Physiol Heart Circ Physiol* 284(2):H575-83 (2003).

Luo, J., “Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD)”, B-180 *Medical Laboratories Free Radical and Radiation Biology Program*, The University of Iowa, IA 52242-1181, For 77:222, Spring 2001, 8. March, (2001).

Madamanchi, N.R., Donahue, J.I., Cramer, C.I., Alscher, R.G. and Pedersen, K. “Differential response of Cu, Zn-superoxide dismutases in two peach cultivars during a short term exposure to sulphur dioxide”, *Plant Biology*; 26:95-103 (1984).

Maher, P., Lewerenz, J., Lozano, C., Torres, J.L., “A novel approach to enhancing cellular glutathione levels”, *Journal of Neurochemistry*; 107: 690-700 (2008).

Malle, E., Buch, T., Grone, H.J. “Myeloperoxidase in kidney disease”, *Kidney International*, Review, Dec; 64(6):1956-67 (2003).

Marfil, R., Gimenez, R., Martinez, O., Bauzas, P.R., Rufian-Henares, J.A., Mesias, M., et al., “Determination of polyphenols, tocopherols and antioxidant capacity in virgin argan oil (*Argania spinosa* seeds)”, *European Journal of Lipid Science and Technology*; 113: 886-893 (2011).

Mekhfi, H., Belmekki, F., Ziyat, A., Legssyer, A., Bnouham, M., Aziz, M., “Antithrombotic activity of argan oil: An in vivo experimental study”, *Nutrition*; 28: 937-941 (2012).

Memişoğulları, R., “Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi”, *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*; 3: 30-39. AİBÜ Düzce Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Düzce (2005).

“Monographs on the Evaluation of Carcinogen Risk to Humans: Some Industrial Chemicals”, *International Agency for Research on Cancer, Lyon*, No. 60. IARC. (1994).

Moron, M.S., Depierre, J.W., Mannervik, B., “Levels of glutathione reductase and glutathione-S-transferase activities in rat lung and liver”, *Biochimica Biophysica Acta Journal* 582:67-70 (1979).

Mottram, D.S., Wedzicha, B.L., Dodson, A.T., “Acrylamide is formed in the Maillard reaction”, *Nature* 419:448–449 (2002).

Mottram, D.S., Low, M.Y., Elmore, J.S., “The Maillard reaction and its role in the formation of acrylamide and other potentially hazardous compounds in foods, Acrylamide and Other Hazardous Compounds in Heat-treated Foods”,(eds: Stog K., Alexander J.), 132, *Woodhead Publishing*, Cambridge, 3-22 (2006).

Muralidhara, S.N.P., “Neuroprotective efficacy of eugenol and isoeugenol in acrylamide-induced neuropathy in rats: Behavioral and biochemical evidence”, *Neurochemical Research*,38, 330–345 (2013).

Necib, Y., Bahia, A., Zerizer, S., “ Immunomodulatory Effect of Argan oil (Argania spinosa.L) After Exposure to Mercuric Chloride in Mice”,*International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*; 37:191-193 (2013).

Necib, Y., Bahi, A., Zerizer, S., “Amelioration of mercuric chloride toxicity on rat liver with argan oil and sodium selenite supplements”, *International Journal Pharmacy and Biological Science*, 4:839–849 (2013).

Neciba, Y., Bahia, A., Zerizerb, S., Abdenourc, C., Boulakoudc, M.S., Aziezd, C., et al., “Effect of Argan oil (Argania spinosa. L) on Kidney Function Impairment and Oxidative Stress, Induced by Mercuric Chloride in Rats”, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 22(2), Sep – Oct; n° 26, 144-148 (2013).

Noyan, A., “Yaşamda ve hekimlikte fizyoloji”, *Meteksan Anonim şirketi*, 1157 s., (1999).

NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of acrylamide. National Toxicology Program. *Ntp Cerhr Mon.* Feb;(14):v-I-2, II-xi-166, III-1-74 (2005).

Oberley, L.W., Buettner, G.R. “Role of superoxide dismutase in cancer”. A review. *Cancer Research*,39:1141-1149 (1979).

Öğüt, S., Atay, E., Yaşlılık Ve Oksidatif Stres, Derleme, *Süleyman Demirel niversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 19(2)/68-74 (2012).

Ölmez H., Tuncay F., Özcan N., Demirel S.(2008), “Survey of acrylamide levels in foods from the Turkish market”, *Journal of Food Composition and Analysis*,21(2008)564– 568 (Uyarlanmıştır)(2008).

Öniz, H., “Apoptoz: ölmeye yatmak”, *Sağlık Bakanlığı Tepecik Eğitim Hastanesi Dergisi* 14: 1-20 (2004).

Özçandır Kıvanç, S., “Süne-Kıvım (Eurygaster Spp. Ve/Veya Aelia Spp.) Zararı Görmüş Unların Kek, Bisküvi Ve Ekmeklerde Akrlamit ve Hidroksimetilfurfural (Hmf) Oluşumuna Etkisi”, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara (2013).

Pearson, H.A., Lobel, J.S., Kocoshis, S.A., “A new syndrome of refractory sideroblastic anemia with vacuolization of marrow precursors and exocrine pancreatic dysfunction”, *Journal of Pediatrics*,95:976 (1979).

Pham-Huy, L.A., He, H.E., Pham-Huy, C., “Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health”, *International Journal of Biomedical Science: IJBS*; 4(2): 89-96 (2008).

Poljsak, B.(2011), “Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stres”, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 194586 (2011).

Prasad, Sathya N.; Muralidhara, “Mitigation of acrylamide-induced behavioral deficits, oxidative impairments and neurotoxicity by oral supplements of geraniol (a monoterpane) in a rat model”, *Chemico-Biological Interactions* 223 : 27-37 (2014).

Quiles, J.L., Barja, G., Battino, M., Mataix, J.,Solfrizzi, V., “Role of olive oil and monounsaturated fatty acids in mitochondrial oxidative stress and aging”, *Nutrition Reviews*,64(4):S31–S39 (2006).

Richmond, P., Borrow, R., “Acrylamide in food”,*The Lancet* 361(2): 361-362 (2003).

Rotig, A., Cormier, V., Blanche, S., et al., “Pearson”s marrow-pancreas syndrome. A multisystem mitochondrial disorder in infancy”, *Journal of Clinical Investigation*;86:1601 (1990).

Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., De Pasquale, A., Uccella, N., Barbuzzi, T., et al., “ In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents”, *International Journal of Pharmaceutics*, 199:39–47 (2000).

Serviddio, G., Bellanti, F., Sastre, J., Vendemiale, G., Altomare, E., “Targeting mitochondria: a new promising approach for the treatment of liver diseases”. *Current Medicinal Chemistry*, 17:2325-37 (2010).

Sezer, K., Keskin, M, “Serbest Oksijen Radikallerinin Hastalıkların Patogenezisindeki Rolü”, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*; 28 (1): 49 – 56 (2014).

Shao, L., Martin, M.V., Watson, S.J., Schatzberg, A., Akil, H., Myers, R.M. et al.,”Mitochondrial involvement in psychiatric disorders”,*Annals of Medicine*; 40:281-295 (2008).

Shipp, A., Lawrence, G., Gentry, R., Mcdonald, T., Bartow, H., Bounds, J., et al., “A Role For Glutathione, independent of oxidative stress, in the developmental toxicity of methanol”, *Toxicology Applied Pharmacology* 273(3), 508–515 (2013).

Soladoye, O.P., Juárez, M.L., Aalhus, J.L., Shand, P., Estévez, M., “Protein oxidation in processed meat: Mechanisms and potential implications on human health”, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14(2): 106-122 (2013).

Spinazzi, M., Casarin, A., Pertegato, V., et al., “Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells”, *Nature Protocols – Journals*, 7:1235-46 (2013).

Stadler, R.H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P.A., et al., “Acrylamide from Maillard reaction products”, *Nature*, 419: 449-450 (2002).

Şahin, T., “Kronik Karaciğer Hastalarında Böbrek Fonksiyonlarının Değerlendirilmesinde Sistatin-C Ve Diğer Glomerüler Filtrasyon Hızı Belirteçlerinin Karşılaştırılması”, *Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı*, Uzmanlık Tezi, Ankara (2010).

Şener, G., Yeğen, B.Ç., “İskemi Reperfüzyon Hasarı”, Marmara Üniversitesi,, Farmakoloji Anabilim Dalı ve Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Klinik Gelişim,*Eczacılık Fakültesi*, İstanbul,22:5-13 (2009).

Tabakoğlu, E. Ve Durgut, R., “Veteriner Hekimlikte Oksidatif Stres ve Bazı Önemli Hastalıklarda Oksidatif Stresin Etkileri”, Derleme, *Avkae Dergisi*, 3(1),69-75 (2013).

Trounce, I.A., Kim, Y.L., Jun, A.S., Wallace, D.C., “Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patients muscle biopsies, lymphoblasts, and transmitochondrial cell lines”, *Methods Enzymol* 264:484–509 (1996).

Tuna, S., “Orta Anadolu Süne, Eurygaster Maura (Heteroptera:Scutellaridae) Populasyonlarındaki Esteraz Ve Süperoksit Dismutaz Enzimlerinin Elektroforetik Analizi”, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara (2007).

Turan, A., “Etil Alkol İle Deneysel Oksidatif Stres Oluşturulan Sıçanlarda Kuru İncirin (Ficus Carica L.Subsp. Carica.) Karaciğer Koruyucu Ve Antioksidan Rolünün Belirlenmesi”, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, Van (1996).

Tür, L., “Karbon Tetraklorür İle Karaciger Hasarı Olusturulan Ratlarda Matricaria Chamomilla L. Nin Karaciger Üzerine Koruyucu Etkilerinin Araştırılması”, *Veteriner Biyokimya Anabilim Dalı* ,Doktora Tez, Afyon (2008).

Tyl, R.W. and Friedman, M.A., “Effect of acrylamide on rodent reproductive performance”,*Reproductive Toxicology*,17(1), 1–13 (2003).

Umutlu, U., “L- Karnitin Uygulamasının Ratlarda Bazı Lipit Parametreleri Üzerine Etkisi”, , Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Konya (2012).

Uyumlu, A.B., “Tüm Vücut Radyoterapisinin Farklı Yaş Gruplarındaki Ratlarda Beyin Dokusu Lipid Peroksidasyonu Ve Antioksidan Sistem Parametreler Üzerine Etkileri”, *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, Malatya (2007).

Ünal Kantekin, Ç., Tur, S., “Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enzim Eksikliği Olan İki Çocuk Hastada Günöbirlik Anestezi Deneyimimiz”, *Bozok Tıp Dergisi* 6(3):65-7 (2016).

Yarsan, E., “Lipid Peroksidasyon Olayı ve Önlenmesine Yönelik Uygulamalar”, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*; 9(1-2): 89-95, Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara (1998).

Yasuhara, A., Tanaka, Y., Hengel, M., Shibamoto, T., “Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3999-4003 (2003).

Yerlikaya, F.H, Toker, A., Yener, Y., Toy, H., “Uzun Süre Akrilamit Verilen Sıçanlarda Karaciğer Fonksiyon Testlerinin ve Karaciğer Histopatolojisinin Değerlendirilmesi”, *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 10(3): 77-84 (2012).

Yeloğlu, İ., “Karayosunlarının Antioksidan Aktivitesinin Araştırılması”, *Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Bitirme Ödevi*, Kayseri (2012).

Yıldız, O., Şahin, H., Kara M., Aliyazıcıoğlu R., Tarhan Ö., Kolaylı S., “Maillard Reaksiyonları ve Reaksiyon Ürünlerinin Gıdalardaki Önemi”, *Akademik Gıda* 8(6)44-51 (2010).

Yıldız, A., “Katı Faz Ekstraksiyon Metodu ile Lc/ Msms Cihazı Kullanılarak İşlenmiş Gıdalarda Akrilamid Tayini ve Çeşitli Ön İşlemlerin Patates Kızartmasındaki Akrilamid Oluşumu Üzerindeki Etkisi”, *Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Diyarbakır (2014).

Yıldız, F., “Sıçan Böbreğinde İskemi Reperfüzyon İle Oluşturulan Oksidatif Stres Hasarına Karşı Zeytin (*Olea europaea* L.) Yaprağı Ekstresinin Olası Koruyucu Etkileri”, *Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi (2014).

Yılmaz, S., Bahçecioğlu, İ.H., “Karbontetraklorür İle Siroz Oluşturulmuş Ratlarda Lipid Peroksidasyonu, Antioksidan Enzim Ve Pirüvat Kinaz Aktiviteleri”, *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 24: 25–28 (2000).

Yousef, M.I. and El-Demerdash, F.M., “Acrylamide induced oxidative stress and biochemical perturbations in rats”, *Toxicology* 219, 133–141 (2006).

Yürekli, Ş., “Böbrek Yetmezliğinde Tedavi Yaklaşımları”, *Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Bitirme Ödevi*, Haziran, Kayseri (2014).

Zaheer, N., Tiwari, K., Krishnan, P.S., “Exposure and solubilization of hepatic mitochondrial shunt dehydrogenases”, *Arch Biochem Biophys* 109:646–648 (1965).

Zejniliović, J., “Akciğer Kanseri Hastalarda Mangan Süperoksit Dismutaz (Mnsod) Gen Polimorfizminin İncelenmesi”, *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul (2007).

Zhang, L., Wang, E., Chen, F., Yan, H., Yuan, Y., “Potential protective effects of oral administration of allicin on acrylamide-induced toxicity in male mice”, *Food Function*, 4(8):1229-36 (2013).

Zhang, G., Khanna, P., Chan, L.L., “Diabetes-induced apoptosis in rat kidney”, *Biochemical and Molecular Medicine*, 61: 58-62 (1997).

Zhan, M., Brooks, C., Liu, F., Sun, L., Dong, Z., “Mitochondrial dynamics: regulatory mechanisms and emerging role in renal pathophysiology”, *Kidney International*, Apr;83(4):568-81 (2013).

Zhao, M., Liu, X., Luo, Y., Guo, H., Hu, X., Chen, F., “Evaluation of protective effect of freeze-dried strawberry, grape, and blueberry powder on acrylamide toxicity in mice”, *Journal of Food Science*, Apr;80(4):H869-74 (2015).

Zhao, M., Wang, P., Zhu, Y., Liu, X., Hu, X., Chen, F., “The chemoprotection of a blueberry anthocyanin extract against the acrylamide-induced oxidative stress in mitochondria: unequivocal evidence in mice liver”, *Food Function*, 6(9):3006-12 (2015).

Wallace D.C., “A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine”, *Annual Review of Genetics*; 39:359–407 (2005).

Weisiger, R.A., Fridovich, I., “Superoxide dismutase: Organelle specificity”, *Journal of Biological Chemistry* 248: 4793-4796 (1973).

Weinberg, J.M., “Mitochondrial biogenesis in kidney disease”, *Journal of the American Society of Nephrology*, Mar;22(3):431-6 (2011).

Wickens, A.P., “Ageing and free radical theory”, *Respiration Physiology*, 128: 379-391 (2001).

Wright, A., Bubb, W.A., Hawkins, C.L., Davies, M.J., “Singlet oxygen-mediated protein oxidation: evidence for the formation of reactive side chain peroxides on tyrosine residues”, *Photochem Photobiol*; 76: 35-46 (2002).

WHO (World Health Organization), “Health implications of acrylamide in food”, Report of a Joint FAO/WHO Consultation, WHO Headquarters, Geneva, Switzerland, 25–27 June (2002).

Xu, Y., Zhang, Z., Hu, J., Stillman, I.E., Leopold, J.A., Handy, D.E., et.al., “Glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient mice have increased renal oxidative stress and increased albuminuria”, *FASEB Journal*, 24(2):609-16 (2010).

URL-1--<http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-20.pdf>

URL-2--<http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01b.pdf>

URL-3--<https://doktorun.net/pearson-sendromu>



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : ER, Rahime
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 10.10.1989, Merzifon
Medeni hali : Bekar
Telefon : ----
e-mail : ----

Eğitim

Derece

Eğitim Birimi

Mezuniyet tarihi

Yüksek lisans	Amasya Üniversitesi	2017
Lisans	Hitit Üniversitesi	2014
Lise	Merzifon Lisesi	2006

İş Deneyimi

Yıl

Yer

Görev

2016-2017	Elit Eğitim Kurumları	Öğretmen
2017-2018	Final Özel Öğretim Kursu	Öğretmen

