



**T.C.  
AMASYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AKROLEİN VERİLEN RATLARDA WHEY PROTEİNİN RAT  
KARACİĞERİ MİTOKONDRIAL OKSİDATİF STRES VE  
SOLUNUM ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ali OĞUZ**

**Nisan 2019**

**AKROLEİN VERİLEN RATLARDA WHEY PROTEİNİN RAT  
KARACİĞERİ MİTOKONDRIAL OKSİDATİF STRES VE SOLUNUM  
ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**Ali OĞUZ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Birsen KILIÇ AYDIN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NİSAN 2019**

Ali OĞUZ tarafından hazırlanan “AKROLEİN VERİLEN RATLARDA WHEY PROTEİNİN RAT KARACİĞERİ MİTOKONDRIAL OKSİDATİF STRES VE SOLUNUM ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİSİ” adlı bu tezin yüksek lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Birsen KILIÇ AYDIN

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

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

Prof. Dr. Vahit KONAR

Biyoloji Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

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

Doç. Dr. Vedat ŞEKEROĞLU

Biyoloji Anabilim Dalı, Ordu Üniversitesi

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

Tarih: 25/04/2019

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

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

## **ETİK BEYAN**

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

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

**Ali OĞUZ**

# AKROLEİN VERİLEN RATLARDA WHEY PROTEİNİN RAT KARACİĞERİ MİTOKONDRIAL OKSİDATİF STRES VE SOLUNUM ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Ali OĞUZ

AMASYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
NİSAN 2019

## ÖZET

Akrolein (AK) beslenmeden sigara dumanına kadar çeşitli nedenlerle insanların en fazla maruz kalınan toksik kimyasallardan biridir. Peynir altı suyu proteini (Whey proteini), (WP), kilo vermek isteyenler tarafından özellikle de sporcuların kullandığı, çeşitli biyolojik aktivitelere sahip bir tamamlayıcıdır. Bu çalışmada, AK ve WP'in karaciğer mitokondriyal oksidatif stres, solunum enzimleri, Krebs döngüsü enzimleri ve ATP üzerine olan etkisini incelemeyi amaçladık. Sprague Dawley ratlara AK (5 mg / kg o.p, haftada 6 gün), WP (200 mg/kg, o.p, haftada 6 gün) ve AK ile birlikte WP olmak üzere 30 gün boyunca verildi. Genel olarak, AK verilen grupta mitokondriyal Gluttayon miktarı ve antioksidan enzimlerde azalma olurken, mitokondriyal lipit peroksidasyonu (LPO) ve protein karbonil (PK) seviyelerinde önemli artışlar gözlemlendi. Ayrıca, AK verilen grupta kompleks I, kompleks IV gibi elektron transport zincir (ETZ) enzimlerinde, mitokondriyal izositrat dehidrogenaz (mİSDH) gibi trikarboksilik asit (TCA) döngüsü enzimlerinde ve ATP miktarında anlamlı azalmalar görüldü. AK ile birlikte WP verilen grupta, AK ile oluşan oksidatif stres ve azalan enzim aktiviteleri ve ATP miktarının önemli ölçüde normale döndüğü görüldü. Elde ettiğimiz bulgular sonucunda, WP'nin AK etkisi ile karaciğerde artan oksidatif stres ve bozulan mitokondriyal fonksiyonların iyileştirilmesinde etkili olduğunu gördük.

Sayfa Adedi :90  
Anahtar kelimeler :Akrolein, Whey protein, oksidatif stres, Oksidatif fosforilasyon enzimleri, Krebs döngüsü enzimleri, ATP, Karaciğer.  
Tez Yöneticisi :Prof. Dr. Birsen Kılıç Aydın

# **EFFECTS OF WHEY PROTEIN ON MITOCHONDRIAL OXIDATIVE STRESS AND RESPIRATORY ENZYMES IN ACROLEIN TREATED RATS**

**(MSc.Thesis)**

**Ali OĞUZ**

**AMASYA UNIVERSITY  
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

**April 2019**

## **ABSTRACT**

Acrolein (AC) is one of the most exposed toxic chemicals in humans for various reasons, from feeding to cigarette smoke. Whey protein (WP) is a supplement with various biological activities used by those who want to lose weight, especially by athletes. In this study, we aimed to investigate the effects of AC and WP on liver mitochondrial oxidative stress, respiratory enzymes, Krebs cycle enzymes and ATP. Sprague Dawley rats were given AC (5 mg/kg,o.p, 6 days per) ve WP (200 mg / kg, o.p., 6 days per week) and WP with AC for 30 days. In general, mitochondrial GSH levels and antioxidant enzymes were decreased in AC group, while mitochondrial lipid peroxidation (LPO) and protein carbonyl (PK) levels were significantly increased. Furthermore, in the AC group, were observed significant decrease in electron transport chain (ETZ) enzymes such as complex I and complex IV, tricarboxylic acid (TCA) cycle enzymes such as mitochondrial isocitrate dehydrogenase (mISDH) and ATP level. It was observed that oxidative stress and decreased enzyme activities and ATP level induced by AC returned to normal in AC +WP group. As a result of our findings, we have seen that WP is effective in improving oxidative stress and impaired mitochondrial function in liver by the of effect AC.

Page Number :90  
Key words :Acrolein, Whey protein, oxidative stress, Oxidative phosphorylation enzymes, Krebs cycle enzymes, ATP, Liver.  
Adviser :Prof. Dr. 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 Prof. Dr. Birsen KILIÇ AYDIN' a en içten dileklerle teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim boyunca ders aldığım hocalarım Prof. Dr. Ahmet DURSUN' a, Yrd. Doç. Dr. Adnan SARIKAYA' ya ve diğer hocalarıma teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım sürecinde bana destek olan, sabır ve fedakarlık gösteren, biricik eşime, kızıma ve oğluma en içten dileklerle teşekkür ederim. Ayrıca Tez araştırmalarımın laboratuvar deneyleri aşamasında birlikte çalıştığım arkadaşlarım Cansu GÜLER, Rahime ER ve diğer tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİGİLER.....	5
2.1. Whey Proteini(Peynir Altı Suyu Proteini) .....	5
2.2. Akrolein .....	8
2.3. Mitokondri .....	12
2.3.1. Mitokondrinin yapısı.....	13
2.3.2. Mitokondrinin işlevleri .....	15
2.4. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller .....	28
2.4.1. Serbest radikaller .....	28
2.4.2. Oksidatif stres .....	38
2.4.3. Antioksidan savunma sistemleri ve antioksidanlar.....	41
2.5. Karaciğerin Yapısı ve Önemi.....	48
2.5.1. Karaciğerin fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonları .....	49
2.5.2. Karaciğer hastalıkları ve mitokondri .....	51
3. MATERYAL VE METOT .....	54
3.1. Materyal .....	54
3.1.1. Analizlerde kullanılan cihazlar ve malzemeler.....	54
3.1.2. Analizde kullanılan kimyasal maddeler ve hazırlanışı .....	54
3.1.3. Deney hayvanları ve deney grupları .....	55



3.2. Metod .....	56
3.2.1. Dokuların elde edilmesi ve analizlere hazırlanması .....	56
3.2.2. Karaciğerden mitokondri izalasyonu .....	56
3.2.3. Mitokondrial oksidatif stresin belirlenmesi .....	57
4. BULGULAR.....	62
4.1. AK ve Whey Proteinin Mitokondrial Fonksiyonunda Enzimatik ve Enzimatik Olmayan Oksidatif Stress Parametreleri Üzerinde Etkisi .....	62
4.1.1. Mn-Süperoksit dismutaz üzerine etkisi.....	62
4.1.2. GPx üzerine etkisi .....	62
4.1.3. Redükte glutatyon üzerine etkisi.....	63
4.1.4. Lipit peroksidasyonu üzerine etkisi .....	64
4.1.5. Protein Karbonil miktarı üzerine etkisi.....	64
4.2. AK ve Whey proteinin Karaciğer Mitokondrial oksidatif Fosforilasyon ve Trikarboksilik Asit Döngüsü Enzimleri ve ATP Üzerindeki Etkileri .....	65
4.2.1. Kompleks I üzerine etkisi .....	65
4.2.2. Kompleks II üzerine etkisi .....	66
4.2.3. Kompleks IV üzerine etkisi .....	67
4.2.4. İzositrat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkisi.....	67
4.2.5. Alfa ketoglutarat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkisi.....	68
4.2.6. Malat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkisi.....	69
4.2.7. Karaciğer ATP miktarı üzerine etkisi .....	70
5. TARTIŞMA .....	72
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	78
KAYNAKLAR .....	79
ÖZGEÇMİŞ .....	90

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1. Akroleinin kimyasal yapısı .....	8
Şekil 2.2. Mitokondri .....	13
Şekil 2.3. Mitokondrinin yapısı .....	14
Şekil 2.4. Mitokondri fonksiyonları .....	15
Şekil 2.5. Glikoliz .....	16
Şekil 2.6. Glikoliz ile enerji girişi ve enerji çıkışı .....	17
Şekil 2.7. Kemiozmotik kuram, mitokondride elektronların matriksten zarlar arası boşluğa geçişi ve zarlar arası bölgede proton birikimi .....	25
Şekil 2.8. ETS, KREBS ve glikoliz ile ATP kazancı.....	27
Şekil 2.9. Fenton ve haber weis reaksiyonu.....	34
Şekil 2.10. Lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonları .....	37
Şekil 2.11. Oksidatif stres .....	39
Şekil 2.12. Mitokondriyal ROM, oksidatif mt DNA hasarı ve yaşlanma.....	41
Şekil 2.13. Karaciğerin yapısı.....	49
Şekil 4.1. Grupların karaciğerde Mn-SOD aktivitesi.....	62
Şekil 4.2. Grupların karaciğerde GPx aktiviteleri.....	63
Şekil 4.3. Grupların karaciğerde GSH miktarları .....	63
Şekil 4.4. Grupların karaciğerde LPO miktarları.....	64
Şekil 4.5. Grupların karaciğerde PK miktarları .....	65
Şekil 4.6. Grupların karaciğerde kompleks I aktivitesi üzerindeki etkileri .....	66
Şekil 4.7. Grupların karaciğerde kompleks II aktivitesi üzerindeki etkileri .....	66
Şekil 4.8. Grupların karaciğerde kompleks IV aktivitesi üzerindeki etkileri .....	67
Şekil 4.9. Grupların karaciğerde izositrat dehidrogenaz üzerindeki etkileri .....	68
Şekil 4.10. Grupların karaciğerde alfa ketoglutarat dehidrogenaz üzerindeki etkileri .. .....	69

**(devam) Şekiller dizini**

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 4.11. Grupların karaciğerde malat dehidrogenaz üzerindeki etkileri .....	70
Şekil 4.12. Grupların karaciğerde ATP miktarı üzerindeki etkileri.....	71

## SİMGELER VE KISALTMALAR

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

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
<b>C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O</b>	Akrolein
<b>C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub></b>	Glikoz
<b>HO<sub>2</sub>•</b>	Perhidroksi radikali
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen peroksit
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Su
<b>O<sub>2</sub></b>	Moleküler oksijen
<b>CO<sub>2</sub></b>	Karbondioksit
<b>OH•</b>	Hidroksil radikali
<b>O<sub>2</sub>•</b>	Süperoksit radikali
<b>ONOO-</b>	Peroksinitrit
<b>NO<sub>2</sub>•</b>	Azotdioksit

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
<b>ADP</b>	Adenosindifosfat
<b>AK</b>	Akrolein
<b>ANT</b>	Adenin Nükleotit Translokas
<b>ATP</b>	Adenosin Trifosfat
<b>BCAAs</b>	Zengin Dallı Zincir Aminoasit
<b>BSA</b>	Serum Albümin
<b>KAT</b>	Katalaz

<b>CoQ</b>	Koenzim Q
<b>CoA</b>	Koenzim A
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>ETZ</b>	Elektron Taşıma Zinciri
<b>FAD</b>	Flavin Adenin Dinükleotid
<b>GST</b>	Glutatyon-S-Transferaz
<b>GSH</b>	Redükte Glutatyon
<b>GSSG</b>	Glutatyonun Okside Formu
<b>GPx</b>	Glutatyon Peroksidaz
<b>GTP</b>	Guanozin Tri Fosfat
<b>G6PD</b>	Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz
<b>HNE</b>	Hidroksinonena
<b><math>\alpha</math>-KGDH</b>	Alfa Ketoglutarat Dehidrogenaz
<b>L•</b>	Lipit Radikali
<b>LOO•</b>	Lipit Peroksit Radikalleri
<b>LOOH</b>	Lipit Peroksitleri
<b>LPO</b>	Lipit Peroksidasyonu
<b>MD</b>	Malat Dehidrogenaz
<b>MDA</b>	Malondialdehit
<b>Mn-SOD</b>	Mitokondrial Süperoksit Dismutaz
<b>MPO</b>	Miyeloperoksidaz
<b>MtDNA</b>	Mitokondriyal DNA
<b>NADPH</b>	Nikotinamid Adenin DinükleotidFosfat
<b>NADH</b>	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
<b>PDH</b>	Piruvat Dehidrogenaz

<b>Pi</b>	İnorganik Fosfat
<b>PUFA</b>	Doymamış Çoklu Yağ Asitleri
<b>ROT</b>	Reaktif Oksijen Türleri
<b>RNA</b>	Ribonükleik Asit
<b>SOD</b>	Süperoksit Dismutaz
<b>TCA</b>	Trikarboksilik Asit
<b>WP</b>	Whey Proteini

## 1. GİRİŞ

Karaciğer, neredeyse vücudun her fizyolojik sürecini etkileyen, şaşırtıcı derecede kompleks, insan vücudunun ana “metabolik organı”dır. Başlıca işlevleri, endojen maddelerin ve ksenobiyotiklerin (toksinler, alkol ve ilaçlar gibi) ayrışmasını, proteinlerin, karbonhidratların ve lipitlerin metabolizmasını içerir (Jean ve diğerleri, 2001).

Alkole bağımlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı batı toplumundaki genel nüfusun yaklaşık % 30' unu etkilemektedir ve dünya çapında en sık karaciğer fonksiyon bozukluğu nedeni olarak kabul edilmektedir (Chalasanı ve diğerleri, 2012).

İnsülin direnci, hiperlipidemi, hiperglisemi ve hipertansiyon varlığı ile tanımlanan metabolik sendromun nedeni alkole bağımlı olmayan yağlı karaciğer hastalığıdır. Karaciğer yağlanması multifaktöriyel bir hastalık olmasına rağmen en önemli nedeni karaciğer mitokondrilerinin fonksiyonundaki bozulmadır (Nassir ve Ibdah,2014).

Karaciğer mitokondri bakımından çok zengindir. Her bir karaciğer hücresi yaklaşık 800 mitokondri içerir. Mitokondri, besin oksidasyonu yaparak enerji üreten hücrenin güç üreticisidir. Glikoliz ile piruvata kadar okside edilen besinler mitokondri matriksinde TCA döngüsü enzimleri ile protonlarını  $NAD^+$  ve  $FAD^+$  ya yükleyerek redükte  $NADH$  ve  $FADH_2$  oluştururlar.  $NADH$  ve  $FADH_2$ 'den mitokondri iç membranındaki elektron taşıma zincirine (ETZ) bağlanan elektronların akışı, protonların mitokondriyal matriksten membranlar arası boşluğa pompalanmasıyla birleştirilir, böylece zar boyunca ATP sentezi ile sonuçlanan bir elektrokimyasal gradyan oluşturur (Pessayre, Mansouri, ve Fromenty, 2002).

Mitokondrinin enerji üretmek için temel besin maddelerini okside etmek yanında hücrede reaktif oksijen türlerinin (ROT) en fazla olduğu organel özelliğininide taşır (ROT türlerinin % 90 gibi önemli bir oranı burada oluşur). Elektronların ETZ' ne aşırı akışı ROT üretimi ile sonuçlanır. Mitokondri, normal koşullar altında, mitokondriyal oksijen tüketiminin yaklaşık % 1 ila % 2' si ROT üretimi ile sonuçlanır. Mitokondrielerde oksidatif stresin artması mitokondri zar yapısındaki lipitlerin ve mitokondriyal proteinlerin bozulmasına neden olur. Bu durum hem TCA hem de ETZ enzimlerinin (kompleks I-IV) bozulmasına

ve mitokondrilerin görevlerini yapamaz hale gelmesine neden olur. Dahası mitokondriyal ROT, mitokondrinin antioksidan sistemi tarafından ortadan kaldırılamaz ise mitokondri iç membranındaki por proteinlerin zarar görmesi sonucunda seçici geçirgenlik ortadan kalkar ve hücreyi apoptozise sürükleyen süreçler başlar. Bu durum mitokondri kaynaklı dejeneratif doku hastalıklarının önemli nedenlerinden biridir. ROT üretimi, mitokondriyal membranların lipid peroksidasyonuna neden olur. Oksidatif stres ayrıca, iltihaplanma ve fibrojenik tepkiye neden olan iltihaplanma sitokinlerinin üretimini tetikler ve başta karaciğer yağlanması ve fibrozise neden olarak önemli karaciğer hasarlarına davetiye çıkarır (Moreno-Sánchez ve diğerleri, 2018).

Mitokondri en fazla ROT oluşturan organellerden biri olduğu için aynı zamanda güçlü bir antioksidan savunmaya da sahiptir; mitokondriyal süperoksit dismutaz (Mn-SOD) ETZ (kompleks I-IV) de ortaya çıkan süperoksit radikallerini ( $O_2^-$ ) hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) dönüştürür.  $H_2O_2$  ise mitokondriyal GPx ile su ve  $O_2$ 'e dönüştürülerek zararsız hale getirilir. Sonuç olarak mitokondride oluşan ROT eğer mitokondrilerin antioksidan savunma sistemleri ile korunamaz ise mitokondriyal oksidatif hasar meydana gelir. Bu hasar mitokondrinin lipitlerine, proteinlerine ve DNA'ya zarar verebilir. Bu durum ise mitokondriyal proteinler (kompleks I-IV) enzimleri veya TCA siklisu enzimlerinde (örneğin isositrat dehidrogenaz, alfa ketoglutarat dehidrogenaz ve malat dehidrogenaz gibi) hasara neden olabilir.

AK (sistemik isim: propenal) en basit doymamış aldehittir. Delici, keskin kokulu renksiz bir sıvıdır. Endüstriyel olarak propilenden üretilir. Bu yolla Kuzey Amerika, Avrupa ve Japonya'da yılda yaklaşık 500.000 ton AK üretilir. AK, sulama kanallarında su altındaki ve yüzen yabancı otların yanı sıra algleri kontrol etmek için herbisit olarak kullanılır (Dietrich ve diğerleri, 2012). Oldukça reaktif bir doymamış aldehit olan AK, her yerde bulunan bir çevresel kirleticidir ve potansiyel olarak çevre sağlığı için ciddi tehdit oluşturmaktadır. Elektrofilik bir bileşik olan AK yaygın bir çevresel kirleticidir; tütün ürünleri, yağda kızartılmış besinler ya da odun ve plastiğin eksik yanması başlıca eksojen AK kaynaklarını oluştururlar. İnsanlar, oral olarak (yiyecek ve su), solunum yolu ile (sigara dumanı, otomobil egzozu ve biyosit kullanımı) ve dermal yolla (metabolizma ve lipid peroksidasyonu) değişik şekillerle AK'e maruz kalabilirler. Özellikle son 10 yılda literatürde AK ve insan hastalıkları ile ilgili çalışmaların hızla artış gösterdiği görülmektedir. AK nükleer faktörlere, proteazlara ve diğer proteinlere saldırarak



biyomoleküllerin işlevlerini bozar. Ayrıca mutasyon, transkripsiyon ve apoptosiz üzerine etki edebilirler (Stevens ve Maier, 2008). AK, Alzheimer hastalığı, multipl skleroz, kardiyovasküler hastalıklar, diabetes mellitus gibi bir çok hastalığın ortaya çıkmasına neden olurlar. Ayrıca nörotoksitite, hepatotoksitite ve nefrotoksititenin patogenezinde de önemli rol oynar. Hücresel düzeyde, AK'e maruz kalma, başta DNA ve protein hasarı olmak üzere oksidatif stres, mitokondriyal bozulma, membran hasarı, endoplazmik retikulum stresi ve immün disfonksiyon gibi çeşitli toksik etkilere sahiptir.

Proteinler, gram başına 4 kalori içerirler ancak açlık anında en son tüketilirler. Vücutta birçok yapıya katıldıkları için enerji olarak protein yakmak, oldukça büyük bir fatura getireceğinden vücut öncelikli olarak enerji kaynağı olarak karbonhidratları kullanır. Araştırmalara göre yağsız kütle başına 1,2 gram ile 2,2 gram arasında alınan protein kalori açığında dahi, kas kütlelerini korumak ve arttırmak için yeterlidir. Proteinler doku oluşumu için çok önemli oldukları için, kas geliştirmek için de en önemli bileşendir. İnsan bedeni, sonradan kullanılmak üzere protein depolayan bir yapıya sahip değildir. Bu yüzden, yeterli miktarda ve yüksek kalitede protein tüketmek öncelikli ihtiyaçlarımız arasındadır. Aksi halde, bedenimize ihtiyaç duyduğumuz desteği sunamamış oluruz. Vücut, yeterli proteine sahip olmadığında bu kez kendi kütlelerinden kullanıma gider. Yağsız vücut ağırlığındaki bu kırılma, özellikle de düşük kalorili bir diyet programına giren obezite hastalarında kaçınılmazdır. İşte bu kaybı önlemek için hastalar mutlaka, yeterli miktarda protein almalıdırlar. Dünyanın her yerinden 54.000'den fazla üyesi olan ve hiçbir kâr amacı olmayan, uluslararası "Obezite Aksiyon Koalisyonu" oluşumu obezite ameliyatları sonrası gerekli amino asitleri içeren Whey Proteini (WP) desteğini önermektedirler. Obezite görülme sıklığı endişe verici bir şekilde artmaktadır. Obezite başta kanser, şeker ve kalp hastalıkları olmak üzere birçok hastalığın ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır. Buna bağlı olarak reçetesiz olarak satılan zayıflama ürünlerine başta Amerika ve Avrupa ülkeleri olmak üzere giderek artan bir talep vardır ve milyarlarca dolar harcanmaktadır. WP zayıflama aracı olarak kullanılan, özellikle spor yapan insanların sıklıkla kullandıkları bir maddedir. BCC Research tarafından yayımlanan yeni bir rapora göre, peynir altı suyu proteinine yönelik esas talep ABD ve Avrupa Birliği'nden gelmekle birlikte, gelişmekte olan ekonomilerde, özellikle Asya-Pasifik ve Latin Amerika'dan da artan taleplerin olduğu görülmektedir. 2017'de, küresel peynir altı suyu proteini pazarının yaklaşık 9,4 milyar ABD doları olduğu ve 2023 yılına kadar 14,5 milyar ABD dolarına ulaşacağı tahmin edilmektedir.

Süt iki temel protein kaynağı içerir: kazeinler ve peynir altı suyu. WP peynir altı suyundan elde edilen kazeini alınmış süt proteindir. WP antioksidan, antihipertansif, antitümör, hipolipidemik, antiviral, antibakteriyel ve şelatlayıcı bir madde olarak bir çok biyolojik fonksiyona sahip olduğu bilinmektedir (Yamaguchi, Yoshida, ve Uchida, 2009). WP, sistin amino asiti bakımından zengin bir besindir. Sistin amino asiti hücrenin yegane antioksidan molekülü olan GSH' un yapısında yer alır ve GSH seviyesinin belirlenmesinde sınırlayıcı rol oynar. Bu nedenle WP hücrede antioksidan GSH miktarının artırılması için yararlı bir strateji sağladığı düşünülmektedir (Kent, Harper ve Bowser, 2003). Diğer protein kaynakları ile karşılaştırıldığında, WP' nin en önemli özelliği protein metabolizmasında kilit rolü oynayan lösin, izolösin ve valin gibi dallanmış amino asitleri bol miktarda içermesidir (Kimball ve Jefferson,2002).

Çalışmamızda endojen olarak oluştuğu gibi çevresel olarak da kaçınılmaz olarak maruz kaldığımız AK ile özellikle artan obezite ile birlikte son yıllarda zayıflatıcı supplement olarak sıkça kullanılan WP karaciğer mitokondriyal oksidatif stres durumu ve bioenergetik parametreleri üzerine olan etkisini inceledik.Yukarıda da açıkladığımız gibi hücrelerin enerji merkezleri olan mitokondrilerdeki bozukluklar birçok metabolik hastalıkla yakından ilişkilidir. Bu nedenle çalışmamızda elde ettiğimiz veriler, vücudun metabolizma ve detoksifikasyon merkezi olan karaciğerde bioenergetik ve hücresel seviyedeki değişikliklerin ortaya konması açısından çok değerlidir ve ilgili hastalıkların aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Whey Proteini (Peynir Altı Suyu Proteini)

Süt, iki temel protein kaynağı olan kazein ve WP içerir. WP' nin biyolojik bileşenleri bağışıklık kazandıran bir dizi özellik sergilemektedir. Ayrıca WP bir antioksidan, antihipertansif, antitümör, hipolipidemik, antiviral ve antibakteriyel olarak hareket etme kabiliyetine sahiptir (Naclerio, Alkhatib ve Jimanez, 2013; Ahmed ve diğerleri, 2011). WP, zengin bir amino asit profiline sahip eksiksiz, yüksek kaliteli bir proteindir .WP yüksek protein kalitesi ve zengin dallı zincir aminoasit yapısı (BCAAs) ile uzun zamandır kas geliştirmek için kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda WP'nin kas geliştirme dışında çok geniş alanlarda kullanılabileceği gösterilmektedir. WP peynir suyundan elde edilir. Peynirin bir yan ürünü olarak üretilmektedir. Bu sebeple “peynir altı suyu” da denmektedir (Bayford, 2010).

WP toplam protein içeriğinin yaklaşık yüzde 20' sini oluşturur. Peynir altı suyu, peynir yapımı sırasında kazandan ayrılan çeşitli fraksiyonlardan oluşur. Bu fraksiyonlar istenen son bileşime bağlı olarak farklı konsantrasyonlara kadar saflaştırılır ve protein, laktoz, karbonhidratlar, immünoglobülinler, mineraller ve yağ içeriğinde değişiklik gösterebilir. WP ürününün seçimi, istenen beslenme uygulamaları ve hedeflerine göre belirlenmektedir. En yaygın kullanılan formlar, yüksek proteinli çubuklar, içecekler ve WP konsantresidir (Ahmed ve diğerleri, 2011).

Sütün % 87 si sudur, geriye kalan yüzde % 13 ü ise katıdır. Geriye kalan bu % 13 lük kısmın: % 30' u yağ, % 37 si laktoz, % 27 si protein, % 6' sı ise minareldir. % 27 lik protein kısmının ise % 20 si WP, % 80 i ise kazeindir. Peynir yapım sürecinde WP, saydam yada sarı bir sıvı olarak ayrılır (Naclerio ve diğerleri, 2013). Sığır sütünden oluşan WP, amino asitlerden sisteininin disülfid formu olan sistein açısından zengindir. Sistein, yararlı bir antioksidan olan GSH sentez hızını belirleyen bir amino asittir. Beslenirken WP tüketimi, hücre içi GSH düzeyinin yükselmesini olumlu yönde etkileyecektir. Süt, WP fraksiyonları olan glutamin, triptofan, fenilalanin ve tirozin açısından zengindir (Ahmed ve diğerleri, 2011).

WP yüksek kaliteli bir proteindir. Yapılan araştırmalarda WP etkili bir şekilde kas stimule ettiği düşünölmektedir. WP' nin protein sentezini hızlandırdığı ve sonrasında daha iri ve güçlü kasların oluşmasına katkı sağladığı düşünölmektedir. Sporcularda enerjiye ve proteine olan ihtiyaç egzersizle birlikte arttığından dolayı performansı en üst düzeylere çıkaracak besin takviyeleri aramaktadırlar. WP yapısı ve özellikleri bakımından sporcularda gerekli olan enerji, performans ve kas büyüme ihtiyacına cevap olabilecek ideal ve esansiyel aminoasitler bakımından zengin bir besin kaynağı haline gelmektedir. WP, kas protein sentez oranlarının uyarılmasında özellikle etkilidir. Çünkü WP' ndeki amino asit profili iskelet kası ile hemen hemen aynıdır ve WP' ndeki yüksek esansiyel amino asit seviyeleri erişkin kasta protein sentezini uyarmada etkilidir (Dimke, Ventrella, ve Wilcox, 2014). WP beta-laktoglobölin, alfa-laktümin gibi çeşitli bir dizi proteinden oluşur. Serum albümin (BSA) ve glikomakropeptit (GMP) toplu olarak bunlar bir dizi spektrum içerir. BCAAs lösin, izolösin ve valin de dahil olmak üzere amino asitler BCAA lar doku büyümesi için gereklidir. Lösin özellikle protein sentezinin translasyonunun başlatılmasında ve onarımda önemli bir rol oynamaktadır. Sülfür içeren aminoasitlerde, sistein ve metionin de yüksek konsantrasyonlarda bulunur. WP hücre içi dönüşümle artırılmış, bağışıklık fonksiyonuna katkıda bulunur (Bayford, 2010). WP ile düzenli ve doğru bir şekilde beslenildiğinde, bu uyarlamaları büyük ölçüde arttırabilme yeteneğine sahiptir. Protein takviyesi kullanımı sporcularda normal kişilere göre daha fazla olduğu bilinmektedir. Halterciler ve vücut geliştiricileri özellikle WP' ni daha çabuk ve daha büyük kaslara sahip olmak için alırlar (Dimke ve diğerleri, 2014). Çoğu tüketici, diyetlerini geliştirmeleri ve sağlığını iyileştirmeleri için beslenme takviyelerine yönelmektedir. Sağlık bilincine sahip tüketicilerin, bu amaçlı diyetlerinde WP içermektedir (DCC, 2013).

Yukarıda açıklanan tüm bu sebeplerden dolayı, son 20 yılda, WP, peynir üretmenin atık bir ürünü olmaktan çıkarak, beslenme ve fonksiyonel özelliklere sahip oldukça değerli bir ürün haline gelmiştir. WP artık her yaştan insana yönelik çeşitli sağlık hedeflerine ulaşmak için bebek mamaları, besin takviyeleri, enerji barları, spor içecekleri gibi birçok üründe kullanılmaktadır (DCC, 2013).

WP oksidatif stres ile ilişkili hastalıklarda terapötik araç olarak düşünölmektedir. Sistein bakımından zengin WP izolatının GSH sentezini hızlandırarak GSH seviyelerini arttırdığı yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır. GSH eksikliği olan hasta grupları ve GSH eksikliğinin çok fazla görüldüğu ileri insan immün yetmezlik virüsü (HIV) olan hastalarda WP

uygulandığında bu hastalardaki GSH miktarında artış meydana geldiği gözlenmiştir. WP hem erkek hem de kadınlarda oral olarak uygulandığında, toplam kolesterol ve trigliserit miktarını önemli ölçüde azalttığı görülmüştür (Hamad, Taha, Dawood, Sitohy ve Hamid, 2011). WP'nin kemoterapiye maruz kalan kanser hastalarında kanser önleyici ilaç olarak faydalı olabileceği düşünülmektedir. Bir takım hayvan çalışmaları, WP'nin antikanser potansiyelini incelemekte olup WP yapısında büyük oranda GSH ve laktoferrin gibi antioksidanların bulunduğu ve bağışıklık artırıcı etkileri olduğu düşünülmektedir (Bayford, 2010).

Yapılan çalışmalarda WP İçeriğinde bulunan laktoferrinin sıçanlarda indüklenen kolon kanseri tümör ekspresyonunda azalmalar meydana getirdiği görülmüştür. İn vitro bir çalışmanın sonucunda da insan meme kanseri hücrelerinde büyümenin engellenmesine yönelik etkileri görülmüştür. Yine yapılan bir in vitro çalışmada, laktoferrininin hepatit C virüsünün (HCV) üzerinde de olumlu etkilerinin olduğu izlenmiştir. Bununla birlikte, hepatit B için sonuçların (HBV) daha olumlu olduğu, özellikle günlük 12 g WP almakta olan 8 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada deneklerin karaciğer fonksiyon belirteçlerinin iyileştiği ve lipid peroksidazının azaldığı tespit edilmiştir (Bayford, 2010).

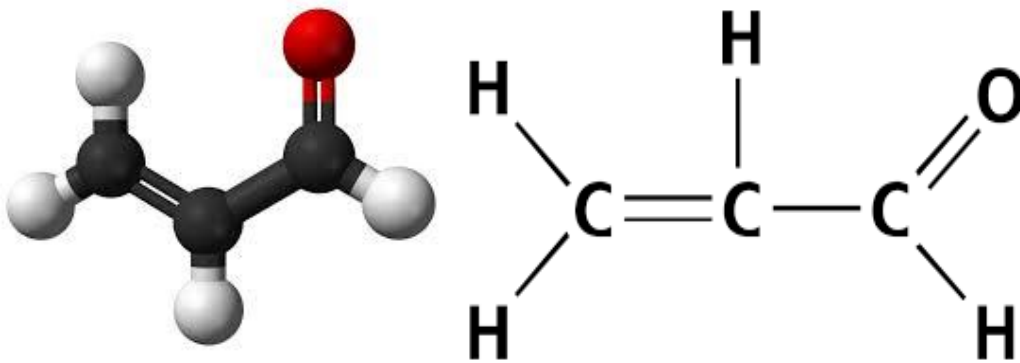
Yaşlanma, sıklıkla şizofreni, bilişsel bozukluk, Alzheimer ve Parkinson gibi çeşitli hastalıkların eşlik ettiği karmaşık ve doğal bir durumdur. Hastalıklar ve insan bedeninde meydana gelen diğer olaylar sonucu Oksidatif stres oluşumu neticesinde meydana gelen hasarın, biyolojik yaşlanma sürecinde önemli bir rol oynadığını gösteren çok sayıda kanıt vardır (Peng, Kong, Yu ve Diao, 2013).

Serbest Oksijen radikalleri, normal metabolizmanın bir parçası olarak canlı hücrelerde sürekli olarak üretilen bir reaktif türüdür ve aşırı üretilmesi durumunda, hücrelere zararlı hale gelerek bazı hastalıkların ve yaşlanmanın patogeneğinde rol oynar (Peng ve diğerleri, 2013). Yapılan çalışmalar, WP'nin enzim hidrolizatlarının demir katalizli bir lipozom oksidasyon sisteminde oksidatif bozulmaları önleme potansiyeli taşıdığını göstermiştir (Peng ve diğerleri, 2013). Deney hayvanları ile yapılan çalışmalar ve analizler neticesinde, WP verilen sıçanların, antioksidan enzimlerin etkinliğini önemli ölçüde yükselttiği, lipid peroksidasyon ürünlerinin seviyelerini ise düşürdüğü ve sıçanlarda şiddetli oksidatif stres sırasında oksidatif ve antioksidatif dengelerin korunması yönünde etkilerinin olduğu anlaşılmıştır (Peng ve diğerleri, 2013).

Athire ve arkadaşlarının deney hayvanları ile yapmış olduğu çalışmada, farelerde parasetamol ile indüklenen hepato-nefrotoksisiteye karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır. WP önemli miktarda *in vitro* antioksidan aktiviteye sahipti, WP verilen fareler ile toksik madde olarak parasetamol verilen fareler, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, WP verilen farelerde antioksidan enzimlerin aktivitelerinde artış ve tiyobarbitürik asit reaktif maddelerinde azalma gösterdiği izlenmiş. WP koruyucu etkisi, oral olarak verildiğinde intraperitonealden daha az olduğu izlenmiştir. WP'nin parasetamolün neden olduğu hepato-nefrotoksisiteye karşı potansiyel koruyucu olduğu ve biyofonksiyonel bir bileşen olarak sağlığı teşvik eden yiyeceklerde etkin bir şekilde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (Athire ve diğerleri, 2013).

## 2.2. Akrolein

AK, renksiz veya sarı bir sıvı olup, hoş olmayan bir kokuya sahiptir, suda kolayca erir ve ısıya maruz kaldığında hızlı bir şekilde buhar haline dönüşür ve kolayca yanar (ATSDR, 2005). AK sigara (tütün) dumanında, otomobillerin eksoz dumanında, yanmış yağlarda ve benzeri yerlerde bulunur. AK yapısal olarak çevremizde her yerde bulunabilen a, b doymamış aldehytler sınıfının en basit üyesidir. Geniş kapsamda düşünüldüğünde, AK otomobillerin egzoz dumanında, çeşitli organik materyallerin parçalanmasıyla, sigaranın buhar fazında, yağ içeren besinlerin yakılması sonucu belli konsantrasyonlarda çevreye salınır (Arumugam, Thanislass, Rangunath, N. Deveraj ve H. Deveraj, 1999).



Şekil 2.1. Akroleinin kimyasal yapısı

AK deri, göz ve solunum rahatsızlıklarına sebebiyet verir. Hücrelerde mitoz bölünmeye müdahale eden bir tiol reaktif bileşiktir. AK; yosun, yabani ot, bakteri ve yumuşakçaları

kontrol etmek için bir pestisit olarak da kullanılır. Ayrıca AK başka kimyasallar yapmak için de kullanılan toksik bir maddedir (ATSDR, 2005). AK sulama kanalları çevresinde bulunan alglerin ya da bitkilerin kontrol edilmesi amacı ile de kullanılır. AK “Papite” kod adı altında kimyasal silah olarak dahi kullanılmıştır (Tuokko, 2012).

Yapılan çalışmalara göre, fazla miktarlarda AK maruziyetinin akciğerlere zarar verdiği hatta ölüme bile neden olduğu bilinmektedir. Daha düşük miktarlarda AK maruziyeti göz sulanmasına, burun ve boğaz yanmasına ve solunum hızının düşmesine neden olur (ATSDR, 2005).

Sigara dumanının ana bileşenlerinden olan ve aynı zamanda bir lipid peroksidasyon ürünü olan AK, oksidatif hasara ve antioksidan üretiminde önemli düşüşe neden olduğu yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir. AK' e maruz kalındığında retinal pigment epitelyal (RPE) hücrelerde oksidatif mitokondriyal hasara neden olabilmektedir (Liu ve diğerleri, 2007). AK' in solunması sonucu burun boşluğunda tahrişe neden olduğu, solunum hızında düşüşe neden olduğu ve akciğer zarında hasara neden olduğu görülmektedir. AK' i yutan hayvanlarda mide tahrişi, kusma, mide ülseri ve kanama olduğu yapılan çalışmalardan anlaşılmaktadır (ATSDR, 2005).

Sigara dumanında sağlık açısından ciddi anlamda risk oluşturan özellikle şu altı toksik madde vardır: AK, asetaldehit, akrilonitril, benzen, 1,3-butadien ve formaldehit. Bunların arasında, AK, yüksek tehlike indeksine sahip toksinlerden birisidir ve sülfhidril gruplarıyla reaksiyona girerek oksidatif strese neden olur ve bu sebeple formaldehit, asetaldehit ve 4-hidroksinonenal' den daha toksiktir (Liu ve diğerleri, 2007). AK, sigara dumanının gaz fazında yaklaşık olarak 124-468 µg / sigara miktarı ile bulunur ve sigara içimi nedeniyle solunum yolu dolgu sıvılarında 80 µmol / L'ye kadar konsantrasyona erişebilir. AK, bir sigara bileşeni ve çevre içinde her yerde bulunabilen bir kirletici madde olmasının yanı sıra, hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak lipid peroksidasyonu sırasında poliadrenat yağ asitleri ile poliamin metabolitlerinin enzimatik oksidasyonundan da oluşabilir (Liu ve diğerleri, 2007).

Lipid peroksidasyonunun yaşlılık sonucu ve hastalıklarda arttığı gösterilmiştir. Lipid peroksidasyonu sebeplerinden biri de yaşlılıkla birlikte artan oksidatif strestir. AK, a, b-doymamış aldehydlerin en reaktifi olduğundan dolayı özellikle hücresel hasarı arttırmada

önemli rol oynamaktadır. Yapılan araştırmalar, serbest radikaller aracılığı ile meydana gelen lipid peroksidasyonunun bir yan ürününü olan AK' in, ROT üretimi ve lipid peroksidasyonu yoluyla toksik etkiler gösterebileceğini göstermektedir (Luo ve She, 2004). Lipid peroksidasyonu sonucunda doymamış yağ asitleri ve sitotoksik alkaniller gibi malonaldehit, 4-hidroksinonena (HNE) ve AK üretilir. Mitokondrilerde yaşlandıkça oksidatif zararın arttığı yada biriktiği biliniyor. Bunların mitokondrial disfonksiyonlardaki güçlü kanıtı yaşlılıkta ortaya çıkan dejeneratif hastalıklardır. AK' in mitokondrial fonksiyonlar üzerindeki inhibisyon etkisi ilk olarak 1973 yılında Zollner tarafından ortaya çıkarılmıştır (Sun, Luo, Long, Wei ve Liu, 2006).

AK' in karaciğerde zarara ve hücre ölümlerine sebep olan Sitotoksik ve genotoksik etkileri vardır. Yapılan bazı çalışmalarda rat karaciğerinden izole edilmiş, mitokondrial solunum enzimleri olan, Complex 1-2-3-4, FoF<sub>1</sub> ATP (Adenozin Tri Fosfat) Sentaz ve protein oksidasyonu üzerine AK' in etki mekanizması araştırılmıştır (Sun ve diğerleri, 2006).

AK maruziyeti, karaciğer mitokondriyal GSH miktarında düşüşe neden olurken GPx ve SOD artışına sebep olmaktadır. AK verilen ratlarda karaciğer mitokondrisindeki sitratik asit döngüsü bu toksisiteden etkilenir, ayrıca sitokrom c oksidaz ve NADH dehidrogenaz enzim aktiviteleri, mitokondrinin enzim aktivitelerine etki eder. AK verilen rat karaciğerinde mitokondrideki ATP düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir. AK verilen ratların karaciğer mitokondrilerinde a, b, c1 ve c sitokromlarının seviyelerinde azalmaya neden olmuştur. AK verilen ratların karaciğer mitokondrilerinde NADH' in oksidasyonunda artış meydana geldiği yapılan çalışmalardan anlaşılmaktadır (Arumugam ve diğerleri, 1999). AK ile meydana gelmiş toksisite sonucu etki ettiği dokularda hepatoksisite gibi AK toksisitesinde önemli bir role sahip olarak mitokondrial toksin ve mitokondrial disfonksiyona sebep olur (Sun ve diğerleri, 2006).

Genel olarak çocuklar, AK' den yetişkinlerden daha fazla etkilenirler. Bununla birlikte, havadaki tahriş edici maddelere duyarlı çocuklar (astımlı çocuklar gibi) AK' den akciğer tahrişine karşı daha duyarlı olabilirler. Hayvan çalışmalarında gebelik sırasında çok büyük miktarlarda AK' e maruz kalındığında yeni doğanlarda düşük doğum ağırlıkları ve iskelet deformitelerine neden olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, bunlara neden olan düzeyler etkiler genellikle anneye öldürücüdür (ATSDR, 2005).



Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda; sıçanlara 45 gün süre ile AK (2.5 mg / kg vücut ağırlığı / gün) verildiğinde, karaciğerdeki lamellerde kayba neden olarak mitokondriyanın membranöz yapısında tahribata yol açtığı NADH' nin yükseltgenmesine sebep olduğu anlaşılmıştır. Zar bütünlüğünün bozulması, trikarboksilik asit döngüsü enzimlerinin ve sitokrom seviyelerini değiştirmiştir. ADP (Adenezin di Fostat) ile uyarılan oksijen alımı, ATP sentezinde azalma gözlemlenmiş ve AK kaynaklı toksisitenin sıçanlarda karaciğer mitokondriyal fonksiyonunun bozulmasına ve ayrıca GSH oranında azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (Arumugam ve diğerleri, 1999).

AK'in mitokondri üzerindeki toksik etkileri polimeraz zincir reaksiyonu tekniği ile hücre kültüründe *in vitro* olarak çalışılmış, ve CHO hücreleri veya spinal korttan ve beyinden izole edilmiş, mitokondrilerde kalp akciğer ve mitokondrial enzim pruvat dehidrogenaz gibi AK ve onun ön maddesi alil alkolün *in vitro* ve *in vivolarda* hepatoksisiteye sebep olduğu görülmüştür. Bazı karaciğer mitokondri fonksiyonları 45 gün boyunca AK verilen ratlarda incelenmiş, Yapılan çalışma neticesinde rat karaciğerinden izole edilmiş mitokondriler fonksiyonları üzerinde mitokondrial solunum enzimleri, kompleks 1,2,3,4, F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP Sentaz, PDH (Piruvat Dehidrogenaz),  $\alpha$ -KGDH (Alfa-Ketoglutarat dehidrogenaz) ve Malat Dehidrogenaz üzerinde AK'in toksik etkileri incelenmiştir (Sun ve diğerleri, 2006).

Sun ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma sonucunda ; AK' in kompleks 1 ve 2 yi indüklediği, AK miktarı arttıkça mitokondrilerde kompleks 1 ve kompleks 2 aktivitesinde düşüş olduğu izlenmiştir. Aynı zamanda AK'in, PDH ve KGDH aktiviteleri üzerinde etkisinede bakılmış ve bunlarında aktivitelerinde düşüş olduğu izlenmiştir (Sun ve diğerleri, 2006). Yapılan bu çalışmalarda karaciğer mitokondrilerinde karaciğer zararına ve karaciğer hücre ölümlerine sebep olduğu bilinen AK ve onun ön maddesi olan Alil alkol kullanılmış, AK' in karaciğer hücrelerindeki etkileşimi ve hücre ölümleri sonucu GSH miktarında hızlı bir düşüş meydana geldiği görülmüştür (Sun ve diğerleri, 2006). Sun ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada AK' in mitokondri fonksiyonları üzerindeki toksik etkilerine ve karaciğer mitokondrisindeki toksik mekanizmaya bakıldığında; AK'in 10-1000  $\mu$ M (0.002-2  $\mu$ mol /mg mitokondrial protein) inkübasyonu NADH ve mitokondrial baskılanmaya neden olduğu solunum zincirinde, karbonil proteinin arttığı kompleks 1,2, PDH, KGDH' in inhibe olduğu ama mitokondrial kompleks 3-4-5 ve malat

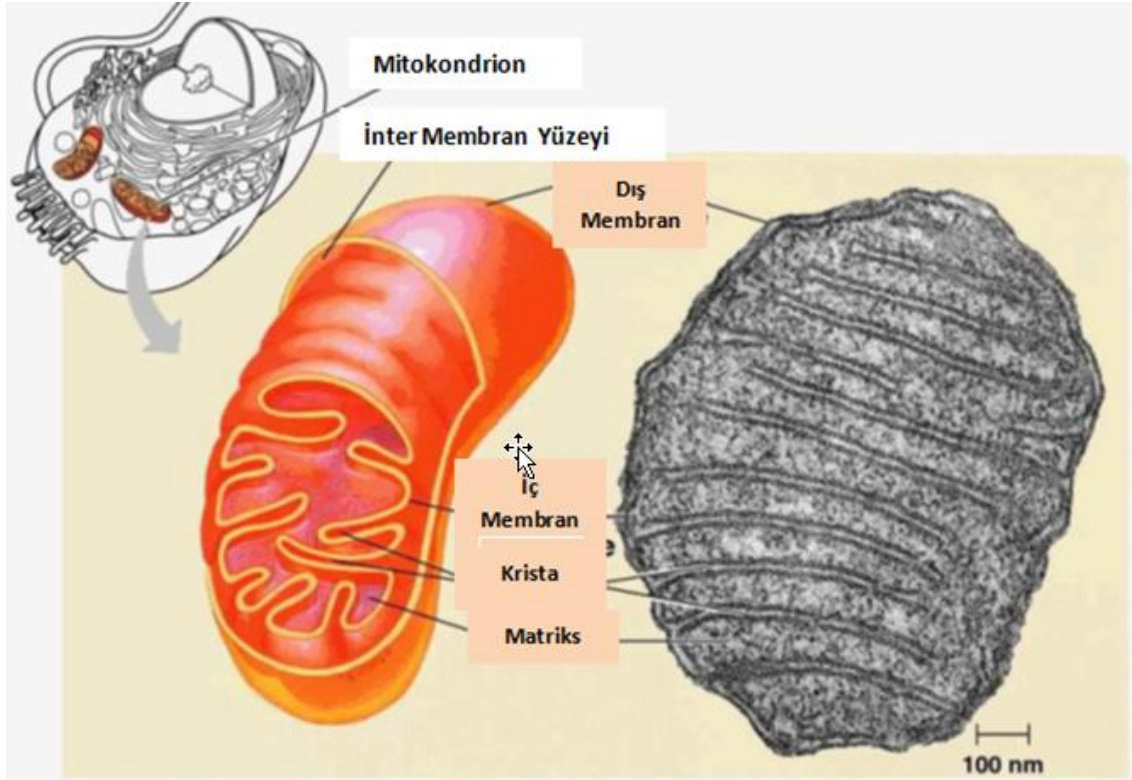
dehidrogenazın konsantrasyonunda 1  $\mu M$  gibi belirgin olmayan bir etki gösterdiği görülmüştür (Sun ve diğerleri, 2006).

Luo ve She nin deney hayvanları ile yapmış olduğu çalışma neticesinde lipit peroksidasyonunun yan ürünü olan AK' in, Gine domuzundan izole edilmiş omuriliğe önemli yapısal ve fonksiyonel hasar verdiği gösterilmiştir. Ayrıca AK ile birlikte Reaktif oksijen türlerinin bu toksik etkiye ve zarara aracılık ettiği düşünülmektedir. Yapmış oldukları çalışmada, AK' in, mitokondriyal oksidatif stresi doğrudan stimüle edebileceği gösterilmektedir. Özellikle saflaştırılmış beyin mitokondrisinin AK' e maruz bırakılması, ROT' nin doz bağımlı bir şekilde artmasına neden olduğu ve GSH miktarında azalmaya neden olduğu görülmüştür. Bu etkilerin yanında ayrıca mitokondriyal elektron taşıma sistemi fonksiyonunda da bozulmalar görülmüştür. Aynı zamanda, AK varlığında mitokondriyal adenin nükleotit translokasının önemli derecede inhibe olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda AK varlığından kaynaklı ROT miktarında artış meydana geldiği varsayılmaktadır (Luo ve She, 2004).

### 2.3. Mitokondri

Mitokondriler bir çok hücrede sitoplazmada bulunur, mitokondriler besin maddeleri ve oksijenden enerji üreten önemli organellerdir (Şekil 2.2) (Söker, 2013). Hücre içindeki sayıları o hücrenin enerji ihtiyacı ile doğru orantılıdır ve organizmadaki bir hücrede bir kaç yüz mitokondri bulunabileceği gibi bazı hücrelerde birkaç bin mitokondri de bulunabilir. Mitokondriler büyüklük ve şekil açısından değişkenlik gösteren bir organeldir ve bu organeller bir kaç yüz mikron çapında ve küresel yapıda olabileceği gibi, bir mikron çaplı ipliksi görünümde küçük yapılarda olabilirler (Koç ve Sarıca,2003).

Bir insanın vücudundaki her bir hücrede çok sayıda mitokondri bulunmaktadır. Mitokondrilerin tamamına yakını anneden kalıtılır ve mitokondrilerin her biri enerji üretilmesi ile alakalı olan 37 tane gen içeren çok sayıda halkasal yapıda DNA moleküllerine sahiptirler. Mitokondriler süperoksit radikali ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molekülünün en büyük kaynağı olup hücre içerisinde oksidatif strese sebep olurlar. Mitokondrilerin bu şekilde radikallerin kaynağı olması gibi iç faktör ve bazı dış faktörlerin etkisi sonucunda mitokondriyal DNA' da (mtDNA) mutasyonlar meydana gelir (Zeytinoğlu, 2000).



Şekil 2.2. Mitokondri

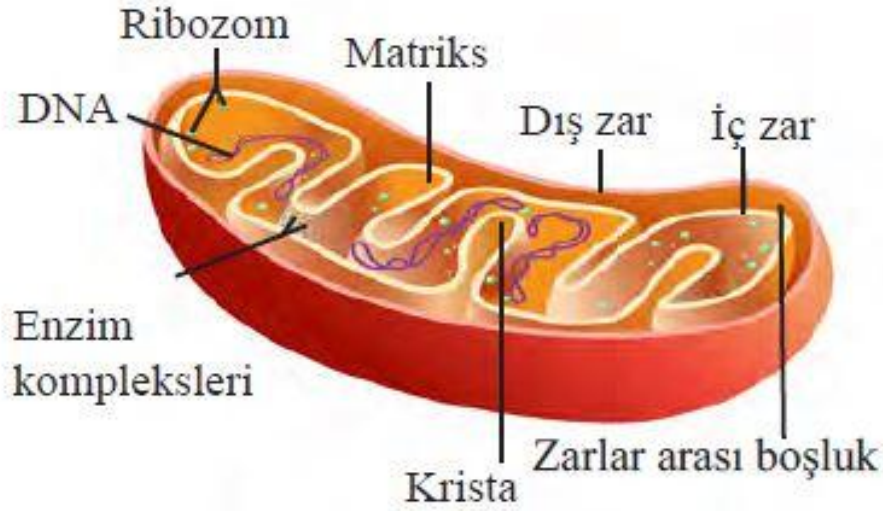
Mitokondride meydana gelen mtDNA mutasyonlarının; yaşlanma fenotipi ve özellikle beyin ve kaslarla ilgili birçok dejeneratif bozukluklarla alakalı oldukları bulunmuştur. Dokulardaki hücrelerin her biri farklı biyoenerji üretebilme yeteneğine sahiptir ve yaşlanma sırasında mtDNA mutasyonlarının birikimi neticesinde biyoenerji kaybı meydana gelir ve bir dokudaki her bir hücre, biyoenerji kaybını farklı oranlarda gösterir (Zeytinoğlu, 2000).

### 2.3.1. Mitokondrinin yapısı

Mitokondriler iç ve dış zar olmak üzere iki zarla çevrelenmiştir ve bu zarların yapı ve işlevleri birbirlerinden farklılık gösterir. İç zar oldukça kıvrımlı bir yapıya sahiptir ve yapısında çok sayıda protein ihtiva eder (Şekil 2.3) (Coşkun, 2011).

Mitokondriler, ışık mikroskobu altında görülebilirler, ortalama bir karaciğer hücresinde; 800 kadar mitokondri bulunur. Bu da karaciğer hücresinin % 20 sine yakındır (Ergül,2003). Dış membranda, bazı moleküllerin geçişini sağlayacak şekilde özelleşmiş transport proteinlerinden oluşur. Dış membran küçük moleküllere karşı geçirgen olup

membranlar arasındaki boşluk bu küçük moleküllerin geçişi sırasında herhangi bir engel teşkil etmez (Koç ve Sarıca,2003).



Şekil 2.3. Mitokondrinin yapısı

İç membran, içe doğru kıvrımlı bir yapıya sahiptir ve seçici geçirgen özelliktedir. ETZ enzimleri ve oksidatif fosforilasyona ait enzimler bu kısımda yer alır. İç membranlar ATP, ADP ve Pi, piruvat, süksinat, malat, sitrat ve KGDH gibi özel maddeler için taşıma sistemine sahiptirler (Koç ve Sarıca, 2003). İç membran, dış membrandan daha ince olup % 80 protein, % 20 lipitten meydana gelmiştir. Çok sayıda krista adı verilen kıvrımlı yapılara sahiptir. Bir fosfolipit olan kardiolipin açısından zengindir. ATP sentetaz enzimi ve respiratuar zincirin protein kompleksleri burada bulunur (Söker, 2013).

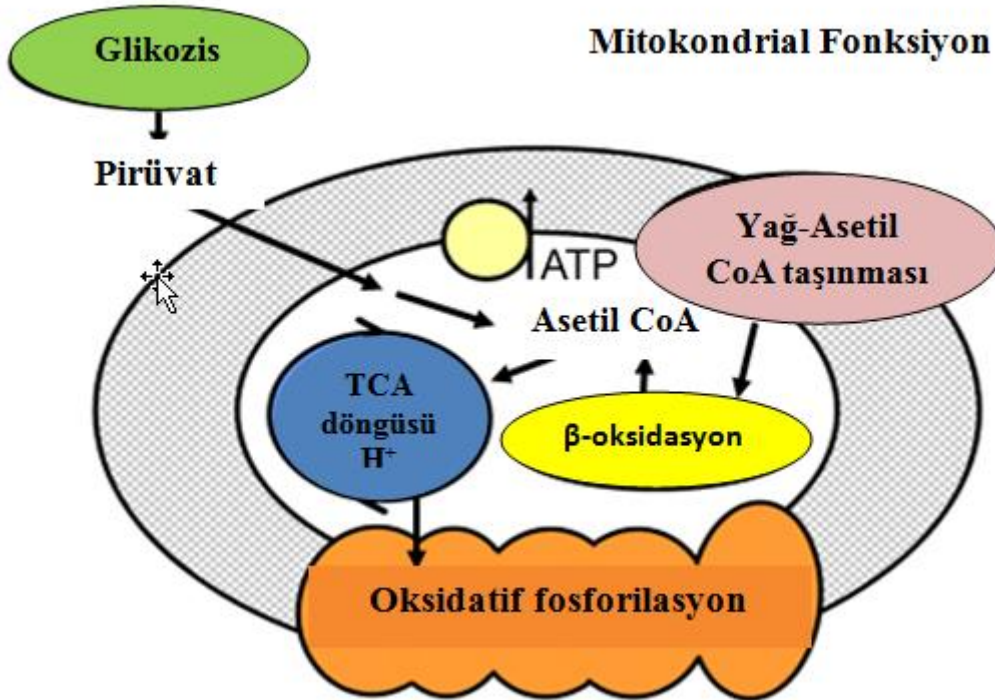
Matriks; içerisinde erimiş vaziyette bir çok enzim bulunduran jel kıvamında bir yapıdır. Matriks içerisinde bulunan bu enzimler, iç membranda bulunan oksidatif enzimlerle birlikte hareket ederek besinlerin CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O'ya dönüşmesine sonuç olarak ATP adı verilen yüksek enerjili maddenin oluşmasına sebep olurlar. İç membrana bağlı bulunan matrikste, TCA döngüsü ve yağ asitlerinin β-oksidasyonunda görev alan enzimler rol oynarlar (Koç ve Sarıca, 2003).

Mitokondriler hücre çekirdeğindeki şeklinde ancak birbirinden farklı bir DNA bulundurmaktadırlar. mtDNA mitokondrilerin çoğalmasında rol oynar (Koç ve Sarıca, 2003).

### 2.3.2. Mitokondrinin işlevleri

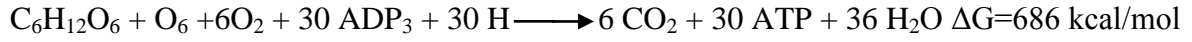
Mitokondrilerin çok sayıda muazzam özelliklerinden en önemlilerinden biri organizma için ATP sentezlemektir. Hücreler ATP sentezinde hidrokarbon (yağ asitleri) ve karbonhidratların (şeker) yakılarak ATP sentezlenmesi için inanılmaz mekanizmalara sahiptir. Bu mekanizmalardan birisi aerobik oksidasyondur. Mitokondriler enerji üretme görevinin yanında bir çok yaşamsal faaliyetlerde de görev alırlar (Saatçi, 2008).

Mitokondriler oksidatif fosforilasyondan sorumlu hücre içi organelerdir. Piruvat oksidasyonu, Krebs siklusu, yağ asidi oksidasyonu ve amino asit metabolizmasında da görevleri vardır (Şekil 2.4) (Muhtaroglu, 2009). Ayrıca adaptif termogenez, iyon homeostazı, doğal immün yanıtlar gibi önemli hücresel süreçlerde de kilit rol oynarlar (Ekmekci, Karasoy ve Yüceyar, 2012).



Şekil.2.4. Mitokondri fonksiyonları

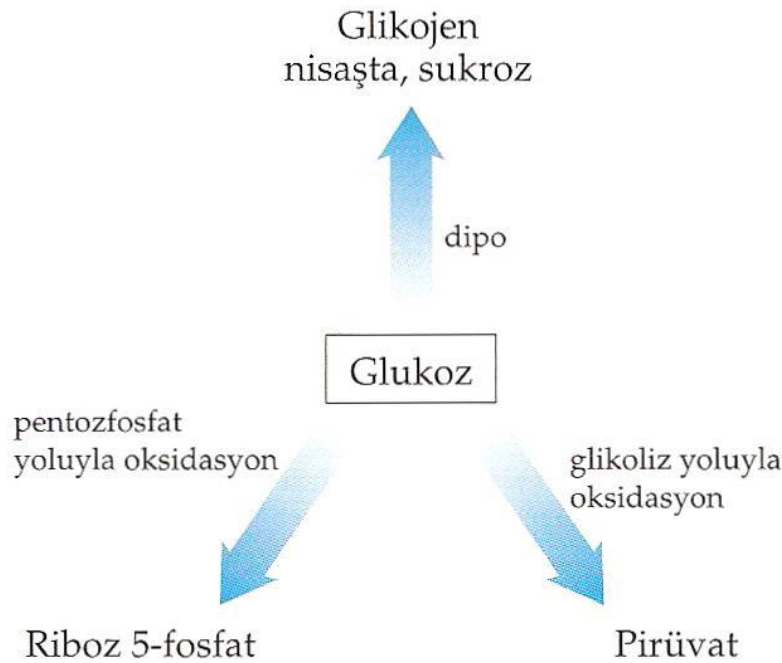
Aerobik oksidasyonla enerji üretimi glukoz ve yağ asitlerinin sindirim sürecini incelediğimizde her bir glukoz molekülünün tam olarak aerobik oksidasyonu 6 CO<sub>2</sub> molekülü üretir ve bu 30 kadar ATP molekülünün senteziyle birlikte enerji ortaya çıkar (Lodish ve diğerleri, 2008/2011: 480-481).



Ökaryotlardaki glukoz oksidasyonu dört evrede gerçekleşir.

- Bir adet 6 karbonlu glukoz molekülünün sitoplazmadaki iki adet 3 karbonlu piruvat molekülüne dönüştürülmesi (Glikoliz)
- 2 karbonlu asetil CoA ara ürünü aracılığıyla piruvatın mitokondride CO<sub>2</sub> e oksidasyonu (Sitrik Asit Döngüsü)
- Bir proton hareket kuvveti üretmek için elektron taşınması.
- Mitokondride ATP sentezlenmesi (Oksidatif Fosforilasyon)

### Glikoliz

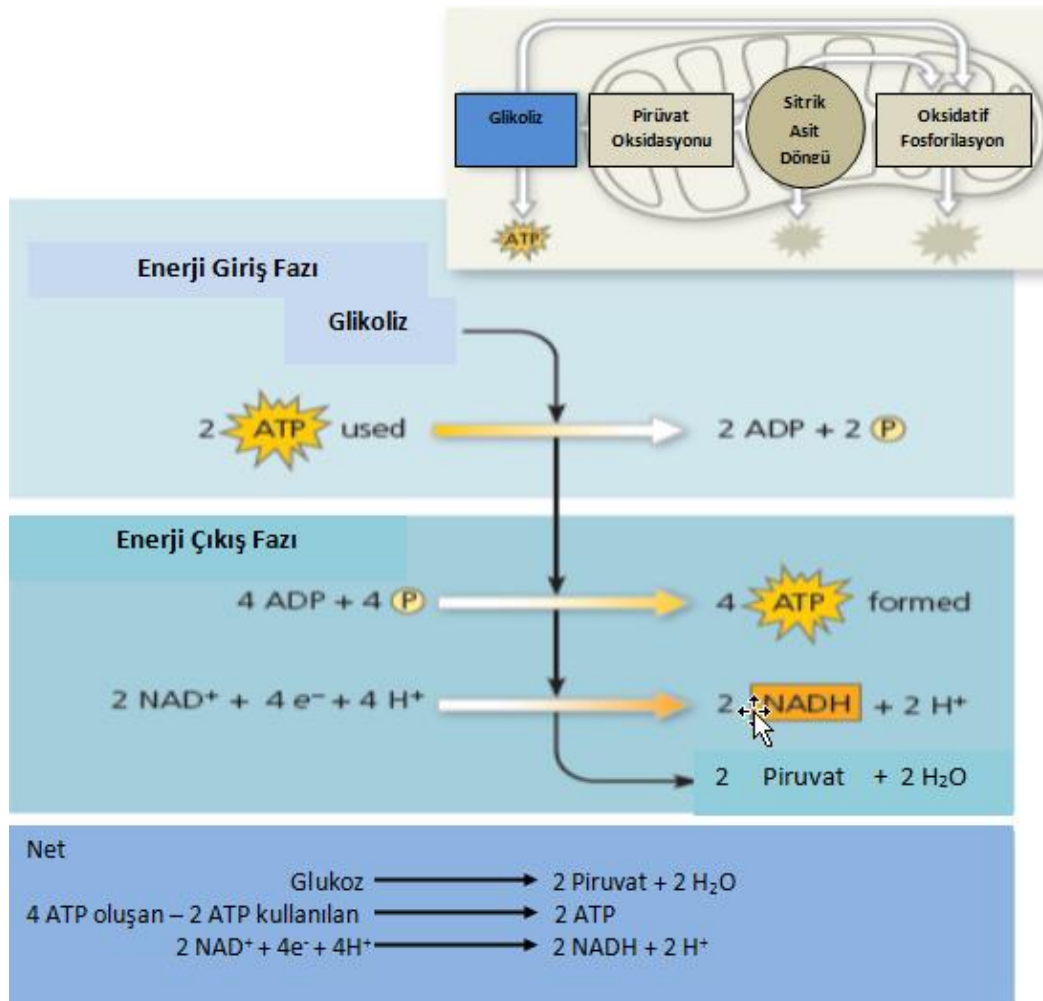


Şekil 2.5. Glikoliz



Glikoliz; Yunanca bir kelime olup, kelime anlamı olarak glykys:tatlı, lysis:parçalanma anlamına gelmektedir. Bir glukoz molekülü, enzimlerin katalizlediği peşpeşe gelen bir dizi tepkime sonucunda üç karbonlu bir bileşik olan, iki molekül pirüvata yıkılırlar (Şekil 2.5). Glikoliz tepkimeleri sırasında, açığa çıkan serbest enerjinin bir kısmı ATP ve NADH şeklinde saklanır (Yazar, 2015; Nelson ve Cox, 2005: 527-528).

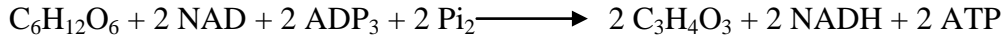
Glikoliz, iki fosfat grubunun glikoza bağlanıp, glikoz molekülünü fosforlamasıyla başlar. Bu duruma fosforilasyon denir ve fosfatların glikoza bağlanması sonucu şeker aktive edilir. Glikozun fosforlanması sonucu; 3 karbon ve tek fosfat bulunduran iki moleküle ayrılır. İkinci reaksiyon ise fosfogliseraldehidin, 1, 3-difosfogliserata dönüşmesidir.  $\text{NAD}^+$ , substratları oksidasyonunu sağlayan çoğu enzimin koenzimi olarak işlev görür. Bu molekül genelde niacin adı verilen bir vitaminde bulunur ve bu vitaminde genelde et ve sebzelerle beslenildiğinde alınır. Glikoliz sonucunda her biri 3 karbonlu 2 molekül pirüvik asit oluşur. Net olarak 2 ADP ve 2 NADH molekülü oluşur (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Glikoliz ile enerji girişi ve enerji çıkışı

Fermantasyon, NADH moleküllerinin elektronlarını bir organik maddeye aktarması sonucu meydana gelir. Hidrojenlerin elektron taşıma sistemi ile bir elektron alıcısına aktarılması olayına ise oksijenli solunum denir (Ergül,2003).

Glukoz metabolizmasının ilk evresi olan glikolizin kimyasal denklemi aşağıdaki gibidir.



Glikoliz sonrasında glukozun mevcut enerjisinin küçük bir kısmı açığa çıkarılarak ATP ve NADH ye dönüştürülmüştür. Enerjinin geri kalanı 2 piruvat molekülünün kovalent bağlarında bulunmaktadır (Lodish ve diğerleri, 2008/2011: 482).

Glikoliz aerobik koşullarda glukozun yıkımının ilk aşamasıdır. Glikoliz sonucunda oluşan piruvat, karboksil grubunun CO<sub>2</sub> şeklinde kaybı ile oksitlenir, Asetil Ko enzim A'nın asetil grubunu oluşturur; asetil grubu daha sonra sitrik asit döngüsüyle CO<sub>2</sub> e tamamen oksitlenir. Bu oksidasyonlardan açığa çıkan elektronlar H<sub>2</sub>O oluşturmak üzere mitokondrideki bir dizi taşıyıcı aracılığıyla O<sub>2</sub> e geçirilir. Elektron transfer tepkimelerinden açığa çıkan enerji mitokondrideki ATP sentezini sürdürür (Nelson ve Cox, 2005: 530).

*2 Karbonlu asetil CoA ara ürünü aracılığıyla pürüvatın mitokondride CO<sub>2</sub> ye oksidasyonu*

Çoğu ökaryot hücreler zorunlu aerobdur ve yalnızca moleküler oksijenin varlığında büyüyebilirler. Glukozu tamamen CO<sub>2</sub> ye dönüştürürler ve aynı zamanda yüksek miktarda ATP üretirler. Oksijen yokluğunda mayalar glikolizle üretilen piruvatı bir molekül etanole ve bir molekül CO<sub>2</sub> ye dönüştürür. Bu reaksiyonlarda etanole dönüştürülen her iki piruvat için 2 NADH molekülü NAD<sup>+</sup> ya okside edilir. Ve bu yolla yeniden NAD<sup>+</sup> kaynağı üretilmiş olur ve bu olay Glikozun fermantasyonu olarak adlandırılır (Lodish ve diğerleri, 2008/2011: 485).

Glikoliz sonucu oluşan piruvat, oksijen varlığında bir dizi oksidasyon reaksiyonuyla CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O ya okside edildiği mitokondriye taşınır. Hücrenin O<sub>2</sub> kullandığı ve CO<sub>2</sub> ürettiği işlemin tamamı Hücresel solunum olarak adlandırılır. Mitokondrideki reaksiyonlar başlangıçtaki her bir orjinal glukoz molekülü için yaklaşık 28 ek ATP molekülü üretilir



ve bu sayı anaerobik glukoz metabolizmasının veriminin çok üzerindedir (Lodish ve diğeri, 2008/2011: 485).

Pirüvat için ikinci yol Laktik Asit Fermantasyonu yoluyla laktata indirgenmesidir. İskelet kasları düşük oksijenli şartlarda işlev görmek zorunda oldukları zaman, NADH yeniden  $NAD^+$  ye oksitlenemez ve pirüvatın daha ileri oksidasyonu için bir elektron alıcısı olarak  $NAD^+$  ya gereksinim duyulur. Bu şartlar altında piruvat, NADH dan elektronları alarak, glikolizin devamı için gerekli olan  $NAD^+$  yi yenilerken, laktata indirgenir. Bazı dokular ve hücre tipleri glukozu aerobik şartlar altında dahi laktata çevirir ve laktat bazı mikroorganizmalarda anaerobik şartlar altında da glikolizin bir ürünüdür (Nelson ve Cox, 2005: 530).

Pirüvatın yıkımındaki üçüncü yolda etanolla sonlanır. Pirüvat bazı bitki dokularında ve bir kısım omurgasızlarda protistlerde ve bira mayası gibi mikroorganizmalarda hipoksik veya anaerobik şartlarda alkol fermantasyonu denilen bir işlemle etanol ve  $CO_2$  e dönüştürülür (Nelson ve Cox, 2005: 530).

#### Asetil CoA oluşumu

Mitokondriyal Matriksteki piruvat, ko enzim A ile reaksiyona girerek  $CO_2$ , asetil CoA ve NADH üretir. Piruvat Dehidrogenaz tarafından katalize edilen bu reaksiyon, yüksek düzeyde egzogeniktir ve geri dönüşümsüzdür. Asetil CoA yağ asitlerinin ve amino asitlerin oksidasyonunda merkezi rol oynar. Ayrıca bir çok memeli proteinleri ve histon proteinlerine asetil grubunun taşınması ve kolesterol gibi lipidlerin sentezi de dahil olmak üzere çok sayıda biyosentetik reaksiyonda yer alan ara üründür. Bununla birlikte mitokondrinin solunumunda asetil CoA nın asetil grubu, sitrik asit döngüsüyle her zaman  $CO_2$  ye okside edilir (Lodish ve diğeri, 2008/2011: 482).

#### Elektron taşıma zinciri ve oksidatif fosforilasyon

Mitokondrilerin en önemli fonksiyonu enerji üretmektir ve bunuda ETZ ve oksidatif fosforilasyonla gerçekleştirir. Aerobik hücrelerde substratlardan alınan elektronlar yükseltgenerek yada indirgenerek oksijene kadar taşınırlar ve olayın gerçekleştiği yola ETZ adı verilir. Substratlardan geçen bu elektronlar, matriksten iç membran üzerinde

bulunan kompleks I, III, IV' te hidrojen iyonlarına enerji sağlar (Crouch, Cimdins, Duce, Bush ve Trounce, 2007). Matriksten gelen elektronlar enerjilerini kompleks I, III, IV' te kademe kademe bırakarak ATP oluşmasını sağlarlar (Crouch ve diğerleri, 2007).

Organizmada ATP iki yolla sentezlenir.

- Oksijen bağımlı oksidatif fosforilasyonla ATP sentezi
- Oksijenden bağımsız substrat düzeyinde fosforilasyonla ATP sentezi (Saatçi, 2008).

Glukoz, yağ asitleri ve amino asitler gibi metabolik yakıtların enzim katalizi sonucu oksidasyonu ile elde edilen elektronlar  $\text{NAD}^+$ , FMN, FAD gibi ko enzim nükleotitleri olan elektron taşıyıcılarına aktarılırlar. Oluşan  $\text{NADH}^+$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{FADH}_2$  gibi indirgenmiş nükleotitler ETZ adı verilen özelleşmiş elektron taşıma sistemlerine aktarılırlar. Solunum zincirinde bir dizi kompleks üzerinden elektronlar moleküler oksijene taşınmakta ve moleküler oksijende suya indirgenmektedir (Saatçi, 2008). Elektron taşıma sisteminde  $\text{NADH}$  ve  $\text{FADH}_2$  ye bağlanan hidrojenler yardımıyla yolaklarda ortaya çıkan elektronların enerjileri kademeli olarak azaltılır ve son olarak bu elektronlar son elektron alıcısı olan  $\text{O}_2$  atomuna aktarılarak oksijen indirgenir ve  $\text{H}_2\text{O}$  ya dönüşür. Bu şekilde bir glikozun toplam enerjisinin % 34' ü kullanılarak 32 ATP elde edilir (Mater). Elektronların  $\text{NADH}$  ve  $\text{FADH}_2$  den moleküler oksijene aktarılması sırasında elde edilen ve proton gradienti şeklinde depolanan enerji ATP sentezi için gerekli olan enerjiyi sağlar. Elektronların ETZ de taşınması sırasında oluşan enerjinin ADP ve İnorganik fosfat (Pi) ile birleşip ATP oluşturması olayına oksidatif fosforilasyon denir (Saatçi, 2008; Crouch ve diğerleri, 2007).

ATP vücudumuzda depolanmaz ve ATP ihtiyaç olduğu anda vücudumuzda sentezlenir ve ihtiyaç olmadığı anda ATP sentezi gerçekleşmez. Organizmada yada hücrelerde harcanan ATP nin gerek olduğu anda üretilmesi ve sürekli yenilenmesi gerekir. Glikolizle ve Krebs döngüsü sonucu elde edilen ATP miktarı günlük organizmanın ihtiyacı olan ATP miktarını karşılamamaktadır. Bu iki metabolik yol sonucu 1 glikoz yıkımında toplam olarak 4 ATP sentezlenmektedir. Krebs döngüsü ile GTP (Guanozin trifosfat) sentezlenir ve bu bileşik daha sonra ATP' ye dönüşecektir. Bu sebeple yetersiz kalan enerji miktarını karşılamak için enerji üreten başka yapılara ihtiyaç vardır ve bu yapılarda mitokondride mevcuttur.

### NAD ve NADP bağımlı dehidrogenazlar

Piruvat dehidrogenaz, malat dehidrogenaz,  $\alpha$ -ketoglutarat dehidrogenaz, gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz,  $\beta$ -hidroksiaçil-KoA dehidrogenaz, laktat dehidrogenaz, Glukoz-6 fosfat dehidrogenaz, NAD bağımlı dehidrogenazlardır. Glutamat dehidrogenaz ve İzositrat dehidrogenaz NAD veya NADP bağımlı dehidrogenazlardır. NADH ve NADPH dehidrogenazlardan serbest bir şekilde ayrılabilir ve bu ayrılma geri dönüşlüdür. NADH ve NADPH mitokondri iç membranını geçemezler ancak elektronlar membranı mekik sistemi ile geçerler (Gelişgen, 2006).

### Flavinli dehidrogenazlar

Yapısında flavin nükleotit: FMN veya FAD içerir. Okside flavin nükleotit 1 yada 2 elektron alabilir. Flavoproteinler 1 yada 2 elektron transferi yapabilir, NAD ve flavoproteinler dışında ETZ de elektron taşıyan; demir sülfür proteinleri, ubikinon ve sitokromlar olmak üzere 3 tip molekül görev yapmaktadır.

### *Demir Sülfür Proteinleri*

1 elektron transferi gerçekleşen reaksiyonlarda görev alır. Kompleks I, II ve III Fe-S proteinleri içerir (Gelişgen, 2006).

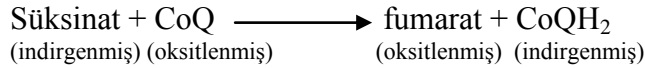
### *Ubikinon (Koenzim Q)*

Uzun yan zincire sahiptir ve yağda eriyebilen moleküldür. Mitokondrial lipidlerin yapı taşıdır ve yapı olarak E ve K vitaminleri ile benzer yapıdadır. Ubikinon 1 elektron aldığıında semikinon radikali (QH•) veya 2 elektron aldığıında Ubikinol e (QH<sub>2</sub>) dönüşebilir. Ubikinon iki elektron vericisiyle bir elektron alıcısı arasında taşıyıcı olarak görev yapar. Küçüktür ve hidrofobik yapılıdır, bu sebeplede mitokondri iç zarını kolaylıkla geçer. Ubikinon iç membranda bir elektron taşıyıcısı olarak görev yapar ve hareketli bir elektron taşıyıcısıdır (Gelişgen, 2006).



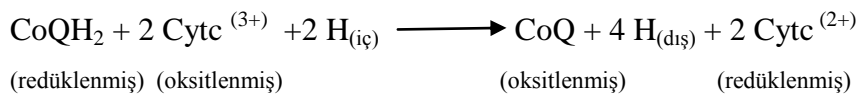
basamağı elektronların substrattan dehidrogenazın FAD' sine geçişine kapsar, elektronlar sonra elektron transfer eden flavoproteine geçer, dönüşte de üzerindeki elektronları ubikinon oksidoredüktaza verir. Bu enzim elektronları solunum zincirine ubikinonu indirgeyerek aktarır (Nelson ve Cox, 2005: 668).

Bu kompleksin katalizlediği reaksiyon aşağıdaki gibidir.



*Kompleks III (sitokrom bc1 kompleksi veya ubikinon: sitokrom c oksidoredüktaz)*

Kompleks III, sitokrom b ve sitokrom C<sub>1</sub> ve Fe-S proteinlerinden oluşmaktadır. Kompleks I, II ve mitokondride bulunan diğer dehidrogenazlar vasıtasıyla ubikinona gelen elektronlar sonucu, ubikinon-ubikinole indirgenir. Ubikinolde bulunan elektronları sitokrom c ye aktaran Kompleks III aynı zamanda protonların membranlar arası boşluğa geçişinide sağlarlar ve bunun sonucunda bir protein gradienti meydana gelir. Kompleks I veya kompleks II tarafından oluşturulan CoQH<sub>2</sub> elektronu CoQH<sub>2</sub>-sitokrom redüktaza vererek oksitlenmiş CoQ yu yeniden meydana getirir. Önceden matriks yüzünden alınan iki protonu, eş zamanlı olarak zarlar arasındaki boşluğa bırakarak proton hareket kuvvetinin bir kısmını meydana getirir. Kompleks III içerisinde salınmış, durumdaki elektronlar ilk önce kompleks III içerisindeki demir-kükürt kümesine ve daha sonra sitokrom C<sub>1</sub> veya iki b-tip sitokroma (b<sub>L</sub>, b<sub>U</sub>) taşınırlar. Son olarak iki elektron sırayla zarlar arası boşlukta iki molekülüne difüze olan suda çözünebilir periferik protein sitokrom c' nin oksitlenmiş formuna taşınır. Taşınan her elektron çiftinde CoQH<sub>2</sub>-sitokrom c redüktaz kompleksi tarafından katalizlenen genel reaksiyon aşağıda gösterilmiştir (Lodish ve diğerleri, 2008/2011:487-488).



*Sitokrom c*

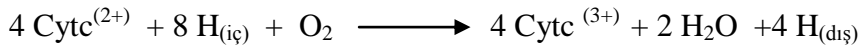
Bir enzim kompleksi parçası olmayıp, Mitokondri membranlar arası boşluğunda bulunan ve suda çözünen bir hem proteindir (Gelişgen, 2006).

### *Komhleks IV (sitokrom oksidaz veya sitokrom aa3)*

Kompleks IV solunum zincirinde elektronları sitokrom c' den moleküler oksijene taşıırken oksijen suya indirgenir, Sitokrom oksidaz 13 alt birimi bulunan kompleks ve büyük bir enzimdir, 2 hem grubu (hema ve hema<sub>3</sub>) ve üç Cu<sup>2+</sup> iyonu içerir. Hema<sub>3</sub> ve Cu<sub>B</sub> bu kompleks üzerinden her dört elektronun geçişi için enzim matriksden dört H<sup>+</sup> alarak O<sub>2</sub> yi 2H<sub>2</sub>O ya çevirir. Bu redoks reaksiyonunun enerjisini de geçirdiği her bir elektron için membranlar arası boşluğu bir proton pompalamak için kullanır (Gelişgen, 2006; Nelson ve Cox, 2005: 670-671).

Sitokrom oksidaz ile moleküler oksijen arasında çekim kuvveti yüksek olup solunum zincirindeki geri dönüşümsüz reaksiyonlardandır (Gelişgen, 2006; Nelson ve Cox, 2005: 670-671).

Taşınan dört elektron için sitokrom c oksidazın katalizlediği genel reaksiyon aşağıdaki gibidir.



### *F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP sentaz ve ATP sentezi*

ATP sentaz enzim kompleksi mitokondri iç zarında bulunur ve ADP + Pi dan ATP sentez reaksiyonunu katalizler. ATPaz; F<sub>0</sub> ve F<sub>1</sub> biriminlerinden oluşur (Gelişgen, 2006).

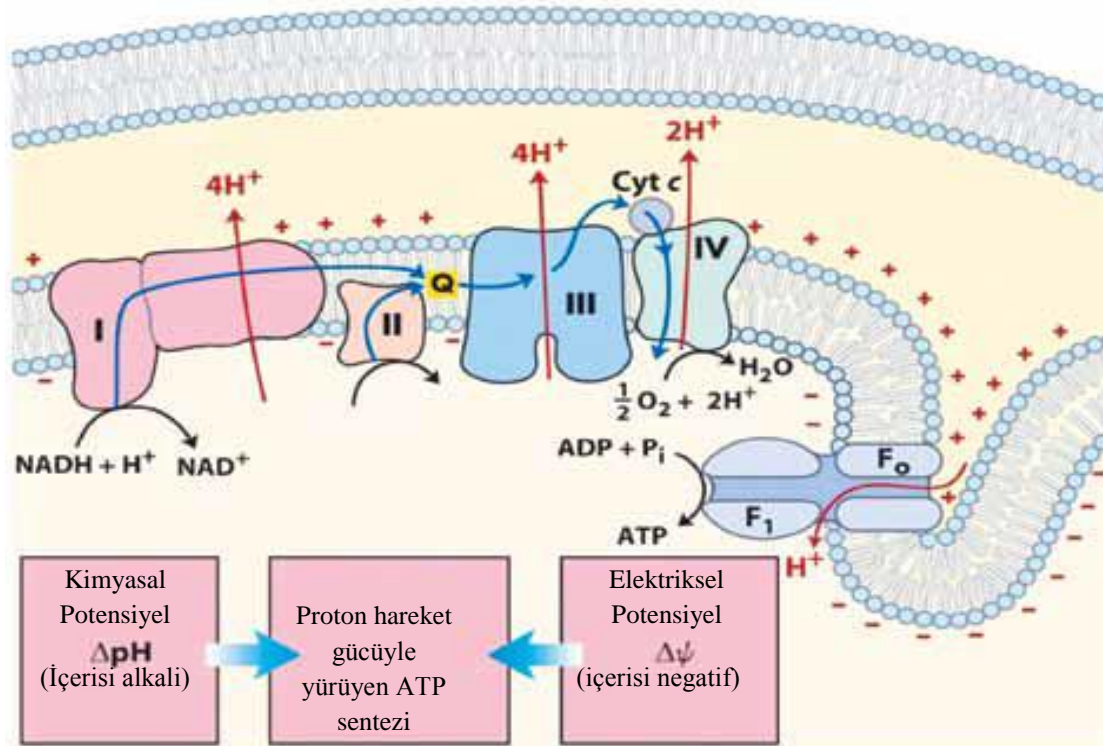
### F<sub>0</sub> Kompleksi

İntegral bir protein olup iç mitokondri membranı kaplayarak protein kanalını oluşturur. Üç farklı alt birimden meydana gelir (a, b, c). F<sub>0</sub> ve F<sub>1</sub> birbirine bağlı şekildedir proton geçisi esnasında F<sub>0</sub> birimi döner ve buna bağlı olarak F<sub>1</sub> birimide döner sonuçta ATP sentezlenir (Gelişgen, 2006).

### F<sub>1</sub> Kompleksi

ATP sentazın, ADP + Pi dan ATP sentezini katalizleyen birimi F<sub>0</sub> a bağlı periferel bir membran proteini ve matrikse uzanan küre şeklinde bir yapıdır. F<sub>1</sub>, ATP az aktivitesine sahip olup aktivitesi için proton gradienti gereklidir (Gelişgen, 2006).

ATP Sentazı oluşturan  $F_0$  ve  $F_1$  birimleri birbirine bağlıdır ve ATP sentezi için  $F_1$  birimini dönmesi gerekmektedir. Mitokondride zarlar arası bölgede yüksek derişimde proton bulunur, bu protonlar matrikse,  $F_0$  ünitelerine bağlı kanallar aracılığı ile geçebilir. Protonların geçişi esnasında  $F_0$  birimi döner ve ona bağlı olan  $F_1$  birimi de dönerek ATP sentezlenir. Mitokondride çok sayıda ATP Sentaz vardır. Enerji üretebilmek için mitokondrinin zarlar arası bölgesinde matriksteki proton gradientine göre çok daha fazla proton biriktirmesi gerekir. Birikecek olan bu protonlar sayesinde meydana gelen derişim farkı sonucu yüksek derişimdeki protonlar ATP Sentaza bağlı kanallardan geçmekte ve bu esnada da ATP Sentazı çalıştırarak ATP sentezlenmektedir. Zarlararası bölgede enerji harcanmadan mitokondri iç zarında bulunan proton pompaları kullanılarak yüksek derişimde proton birikmektedir. Pompaların çalışması için gerekli olan enerji elektronların taşınması sırasında açığa çıkan enerjiden karşılanır (Coşkun,2011).



Şekil 2.7. Kemiozmotik kuram - mitokondride elektronların matriksten zarlar arası boşluğa geçişi ve zarlar arası bölgede proton birikimi

Mitokondriler toplam ATP üretiminin % 95' inden sorumludur. Mitokondrilerin bu kadar ATP' yi kısa zamanda nasıl ürettiği kemiozmotik kuramda detaylı bir şekilde açıklanmıştır.

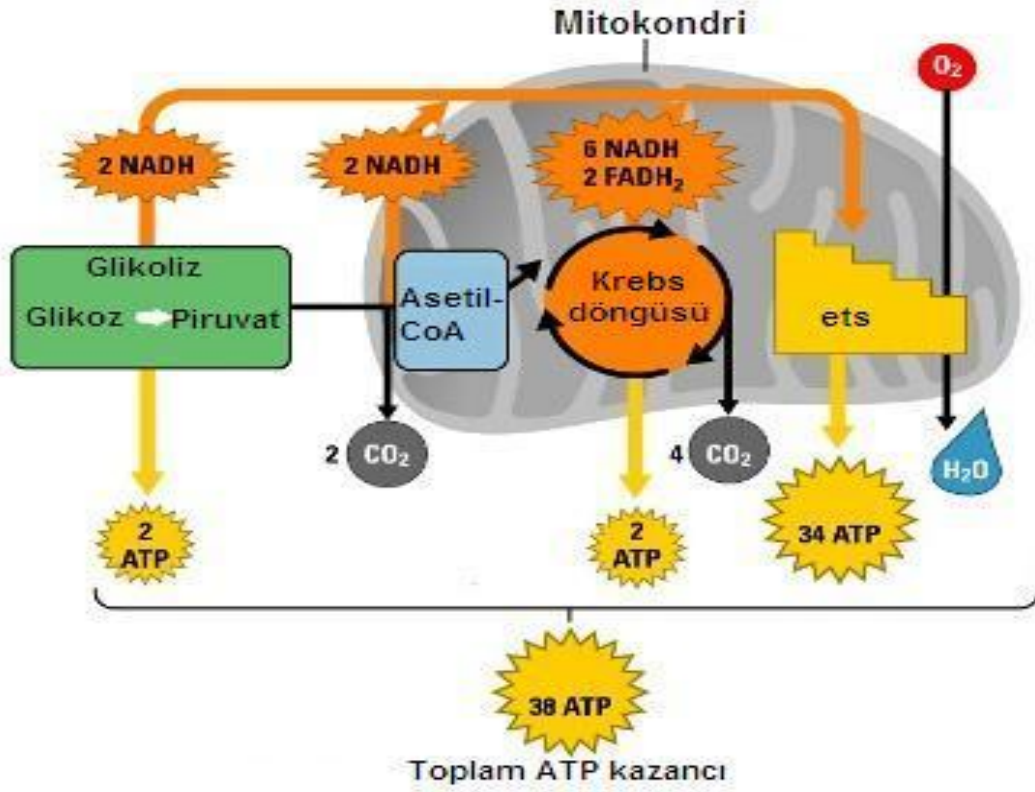
Kemiozmotik kuram İngiliz biyokimyacı Peter ennis Mitchell tarafından ortaya atılmıştır ve bu kuram kendisine 1978 yılında Nobel Kimya Ödülü kazandırmıştır (Coşkun,2011).

Kemiozmotik kurama göre, mitokondri matriksinde bulunan hidrojen iyonları zarlararası bölgeye pompalanarak mitokondri iç zarının iki yüzü arasında potansiyel bir fark meydana getirilir. Matrikste bulunan protonlar düşük derişimde iken, zarlar arasındaki bölgenin proton derişimi yüksektir, protonları düşük derişimli bölgeden yüksek derişimli bölgeye pompalanması için, elektronların oksijene doğru akışı sırasında açığa çıkan enerji kullanılır. Pompalanan protonların matrikse tekrar geri dönebilmesi için özel bir kanaldan geçmesi gerekir ve geçiş sırasında ATP sentezlenir (Şekil 2.7) (Coşkun,2011).

### Trikarboksilik asit döngüsü

Ökaryot canlılarda Krebs döngüsü mitokondrinin matriksinde gerçekleşir. Prokaryot canlılarda ise Krebs döngüsü sitoplazmada gerçekleşir. Pürivik asit 2 aşamada paraçlanır ve akabinde 2 karbon ve 1 karbona ayrılır. Bir karbonlu olan molekül elektornlarından birisini  $NAD^+$  ya aktarır ve sonuçta  $CO_2$  olarak ayrılır. 2 karbonlu olan asetil molekülü bir taşıyıcı ile birlikte asetil koenzim A yı meydana getirir ve asetil-koenzim A'nın okzalo asetik asit ile birleşmesi sonucu Krebs reaksiyonları başlar. Koenzim A ayrılır ve tekrar kullanılarak sitrik asit oluşur. Bu aşamadan sonraki diğer iki aşamada 2 karbon  $CO_2$ ' e dönüşür ve elektronlar 2  $NAD^+$  molekülüne aktarılır, sonuç olarak 1 ATP oluşur. Süksinik asitten malik asite gittiği esnada elektronlar FAD' a aktarılır. FAD, vitamin riboflavinden elde edilen bir koenzimdir. Krebs çemberinin son ürünü olan okzalo asetik asit, yeni bir asetil Koenzim A ile birleşerek yeniden reaksiyon başlatır. Her Krebs çemberi reaksiyonları sonucu pürivat,  $CO_2$ ' e çevrilir. Her bir glikoz için 2 döngü gerekmekte olup enerjinin çoğunluğu NADH ve  $FADH_2$  de saklanır ve bu enerji daha sonraki aşamalarda  $O_2$  ye aktarılır (Ergül, 2003).





Şekil 2.8. ETS, KREPS ve gikoliz ile ATP kazancı

Substrat seviyesinde toplamda elde edilen enerji, glikoliz ile 2 ATP, Krebs ile 2 ATP olmak üzere toplam 4 ATP dir. Geri kalan enerji ise ETZ de açığa çıkar (Şekil 2.8). Mitokondrideki elektron taşıyıcıları çekim kuvvetlerine göre azdan, çoğa doğru sıralanmışlardır. En son elektron alıcısı ise oksijendir ve oksijen çok yüksek bir elektron çekicidir (Ergül, 2003).

Net ATP: 1 pürivik asitin Krebs yoluyla preaksiyonu sonucu 4 NADH, 1 FADH<sub>2</sub> ve 1 GTP açığa çıkmaktadır. Bu durum her glukoz molekülü için 8 NADH, 2FADH<sub>2</sub>, 2GTP molekülü etmektedir. Her NADH molekülü, 3 ATP; her FADH<sub>2</sub> molekülü ise 2 ATP ye denk gelmektedir. Ökaryot hücrelerde sitoplazmadan mitokondriye aktarma esnasında kullanılan 2 molekül ATP, prokaryot hücrelerde kullanılmaz. Bu durum göz önüne alındığında toplam enerji ökaryotlarda 36 ATP iken, prokaryot canlılarda 38 ATP dir (Şekil 2.8). Bu olayın denklemi aşağıdaki gibidir (Ergül, 2003).



Krebs' te organik moleküllerden açığa çıkan elektronlar yüksek enerji bulunduran elektronlardır. Bu elektronlar NADH ve FADH<sub>2</sub> molekülleri ile taşınırlar, ETZ den aktarılırlar ve tüm enerjeyi ADP ile ATP çevriminde kullanırlar. Elektronların ETZ de ilerlediği esnada açığa çıkan enerji, protonların matriksten dış bölüme aktarılması sırasında kullanılır. Bu durumda zar boyunca bir proton irtifası meydana getirir. ETZ' de son taşıyıcı sitokrom oksidaz proteinidir, bu taşıyıcı zarı dolaşır ve kalmış olan son elektronların da oksijene aktarılmasını sağlar (Ergül, 2003).

## **2.4. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller**

Mitokondri, ROT üretiminin en önemli hücrel kaynaklarından biridir ve özellikle oksidatif strese duyarlıdır . ETZ' nin işlevi tehlikeye girdiğinde ROT üretiminin önemli ölçüde artacağı iyi bilinmektedir (Luo ve She, 2004). ETZ de kullandığımız elektronların en az % 2-3' ü oksijene ulaşmadan Kompleks 1 ve 3 den radikal olarak dışarı çıkar. Canlılar dışardan herhangi bir oksidatif strese maruz kalmasa bile mitokondri içeren hücrelerde bu elektron kaçağı oksidatif strese sebep olur (Ruszkiewicz and Albrecht, 2014).

Mitokondrial ETZ, ROT' nin en önemli kaynağıdır. Yüksek düzeyde ROT kanser ve çeşitli hastalıklara neden olur ve genellikle DNA hasarına neden olan redoks sinyalizasyon basamaklarıyla ilişkilendirilmiştir. Mitokondri sürekli dış etkilere bağımlı veya kendiliğinden ROT ürettiği için organel içindeki DNA molekülü kimyasal hasara maruz kalmaktadır. Mitokondride ROT' ni etkisiz hale getirmek için birkaç antioksidan savunma mekanizması bulunmaktadır. Hücreler normalde ROT tutucular veya SOD, KAT ve GPx gibi antioksidanlar ile kendilerini ROT' ne karşı koruyabilirler. Bu antioksidanlar genellikle tümör hücrelerinde yeterli miktarda yoktur. Bu sebeplede, hücrelerdeki sürekli oksidatif stres kanser ilerlemesi, büyümesi ve metastaza yol açar.

### **2.4.1. Serbest radikaller**

Yapılarında eşlenmemiş elektron bulunduran moleküllere serbest radikal denir. Yani serbest radikaller; yapılarında tek sayılı elektron bulundurur ve bu moleküller açık elektron kabuğu konfigürasyonuna sahip atom veya moleküllerdir (Çakatay ve Kayalı, 2006).

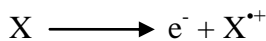
Biyolojik sistemlerde serbest oksijen radikalleri veya reaktif oksijen türleri çeşitli nedenlerle ve yollarla meydana gelebilir ancak bu metabolitlerin en yaygın kaynağı oksijendir. Serbest radikallerin üretildiği bir çok kaynaklar vardır ancak en önemli kaynak mitokondrilerdir. Canlılar dışardan herhangi bir oksidatif strese maruz kalmasa bile mitokondri içeren hücrelerde bu elektron kaçağı oksidatif strese sebep olur (Ruszkiewicz ve Albrecht, 2014).

Atomların son elektron yörüngeleri dolu olduğunda veya boş olduğunda kararlı bir yapı gösterirler. Atomlar elektron alışverişi yaparak son yörüngelerindeki atomları ya tamamen doldurarak ya da tamamen boşaltarak kararlı bir yapıya geçerler. Serbest radikaller yapısında bulunan eşlenmemiş elektronlardan dolayı oldukça reaktif bir yapıya sahiptir. Serbest radikaller yapılarında bulunan eşlenmemiş elektronlarını paylaşmak ya da eşlemek için radikal olmayan diğer maddeler ile hızlı bir şekilde reaksiyona girerek elektron alışverişi yaparlar, bu elektron alışverişinin en önemli sebebi radikallerin son yörüngelerinde bulunan eşlenmemiş elektronlarını boşaltmak ya da eşleme istemesidir. Bu sebeple radikaller diğer moleküllerle hızlı bir şekilde reaksiyona girerler. İki serbest radikal birbirini ile reaksiyona girdiğinde eşlenmemiş elektronları birbirini eşleyerek bu moleküller radikal olmaktan çıkarlar. Organizmalarda bulunan moleküllerin çoğunluğu genelde eşlenmemiş elektron içermediği için serbest radikaller çoğunlukla organizmalardaki radikal olmayan bu moleküllerle tepkimeye girerek yeni serbest radikaller oluşturlar (Aksu, 2006).

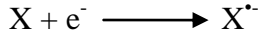
Serbest radikaller, metabolizma sırasında meydana gelen son derece etkin kimyasal ürünlerdir. Serbest radikallerin hücre büyümesi ve gelişimi üzerine doğrudan etkileri vardır ve hücre yaşamı üzerindeki bu direkt etkilerinden dolayı kanser ve romatizmal hastalıklar ayrıca yaşlılık hastalıkları gibi önemli bazı hastalıkların oluşmasında etkin rol oynarlar (Öğüt ve Atay, 2012).

Serbest radikallerin oluşumu 3 şekilde olabilir

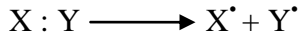
1. Radikal olmayan moleküllerin bir elektron kaybetmesi sonucu;



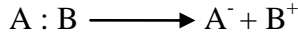
2. Radikal olmayan moleküllerin bir elektron kazanması sonucu;



3. Homolitik yarıma sonucu, kovalent bağların, her bir elektronun ayrılan parçalarda kalarak ayrılması neticesinde (Öğüt ve Atay, 2012).



Sıcaklık, elektromanyetik radyasyon veya benzeri durumlar neticesinde kovalent bağlar kopması gerçekleşir. Kovalent bağ kırılırken bir atomun iki elektronuda almasına heterolitik yarıma denir (Aksu, 2006).



#### Serbest radikal kaynakları

Organizmada bulunan serbest radikaller endojen kaynaklı yada eksojen kaynaklı olarak oluşur. Serbest radikaller hücrelerde ve çevrede sürekli olarak üretilir (Karabulut ve Gülay, 2016). Biyolojik sistemlerde ve organizmalarda; normal metabolik olaylar sırasında meydana gelen elektron kaçağı sonucu yada organizmada bazı yabancı maddelerin metabolize edildiği esnada veya radyasyon ve benzeri dış etkiler sonucunda serbest radikaller oluşur (Freeman ve Crapo, 1982). Elektron taşıma zincirindeki elektron kaçağı sonucunda bir O<sub>2</sub> molekülü oluşur ve bir elektron serbest radikal oluşturur. Mitokondride Oksijen molekülünün suya indirgendiği esnada moleküler oksijen, süperoksit (O<sub>2</sub>)<sup>•</sup>, hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ve nitrikoksit (NO)<sup>•</sup> gibi oksijen metabolitlerinin oluşmasına sebep olur. Süperoksit (O<sub>2</sub>)<sup>•</sup> veya hidroksil radikalinin (OH)<sup>•</sup> hidrojenperoksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile reaksiyona girmesi sonucu peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) ve daha sonra azot dioksit (NO<sub>2</sub>)<sup>•</sup> oluşur (Castellani ve diğerleri, 2002). Mitokondrilerde meydana gelen bu serbest radikaller karşılaştıkları herhangi bir molekülü okside etme eğilimindedirler. Bu sebeplede serbest radikaller oluşur oluşmaz; proteinlere, lipitlere, karbonhidratlara ve DNA'ya zarar verirler ve vermiş oldukları bu zarar sonucunda büyük oksidatif hasara neden olurlar. Sonuç olarak vermiş oldukları zararlar neticesinde hücre ölümlerine yol açarlar (Z., Şekeroğlu ve V.

Şekeroğlu, 2009). Serbest radikal oluşturan mekanizmalar endojen ve ekzojen olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.

#### *Endojen kaynaklar*

Aerobik solunum sırasında ETZ tarafından katalize edilen oksijen molekülleri serbest radikallerin yan ürün olarak üretilirler. Stres yada yorgunluk kaynaklı hücrelerde toksik yan ürün olarak serbest radikal üretilebilir. Ayrıca kortizol ve kateşolamin gibi hormonlar vücutta stres reaksiyonlarına yol açar aynı zamanda bu hormonların kendileri de serbest radikale dönüşebilir. İmmun sistem hücreleri patojenlere karşılık ROT ve oksidatif radikaller üretebilir (Karabulut ve Gülay, 2016).

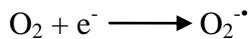
#### *Eksojen kaynaklar*

- UV, X-rays, gamma ışınları,
- Organik maddelerin pişirme sırasında yanması,
- Orman yangınları
- Karbonmonoksit, formaldehit, ozon, asbest ve benzen gibi hava kirleticiler,
- Temizlik ürünleri, boya, tiner, parfüm ve böcek ilaçları gibi kimyasallar,
- Kloroform ve diğer trihalometanlar gibi su kirliliğine sebep olan maddeler,
- Alkol, sigara dumanı, egzoz dumanı (Karabulut ve Gülay, 2016).

#### Oksijen merkezli serbest radikaller

##### *Süperoksit radikali ( O<sub>2</sub>•)*

Moleküler oksijene tek elektronun eklenmesi sonucu oluşan yada ortaya çıkan serbest radikallerdir.

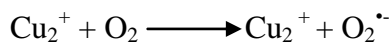
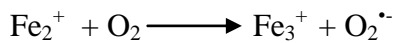


Organizmada sürekli olarak yüksek miktarlarda süperoksit radikali meydana gelir. Süperoksit radikalleri süperoksit dismutaz ile tepkimeye girmesi sonucu dismutasyona uğrayarak  $H_2O_2$  oluşur. Süper oksit radikalleri birbiri ile etkileştiği sırada, bu radikallerden birinin yükseltgenmesi ve diğerinin indirgenmesi sonucu,  $H_2O_2$  ve  $O_2$  molekülleri oluşmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1999). Süperoksit radikallerinin ortamdan bir proton alması sonucu perhidroksi radikali ( $HO_2\bullet$ ) oluşmaktadır.  $HO_2\bullet$  radikali süperoksit radikaline kıyasla daha reaktif bir radikaldir ve bu radikal hücre membranında bulunan yağ asitleri ile tepkimeye girerek, bunların peroksidasyonuna sebep olabilir (Winterborn ve Kettle, 2003). Süperoksit radikali ve nitrik oksit radikalinin (NO) reaksiyona girmesi neticesinde bu radikallerden çok daha reaktif olan peroksinitrit radikali oluşabilir. Süperoksit radikalleri, fenoksil radikalleri ile reaksiyona girerse, bu reaksiyon neticesinde proteinlerin yapısında modifikasyonlar meydana gelebilir. Fenoksil radikali, fenollerin oksidasyonu neticesinde oluşur, tirozin ve E vitamini organizmadaki başlıca fenol kaynaklarından (Halliwell ve Gutteridge, 1986).

#### *Moleküler oksijen*

$O_2$ , paralel spin durumlu iki ortaklanmamış elektrona sahiptir. Organizmada oksidasyon reaksiyonları; geçiş metallerini içeren enzimlerin aracılığı sonucu moleküler oksijene tek elektronun transferi sonucu meydana gelir. Moleküler oksijen, yüksek derecede ROT oluşturma eğilimindedir (Winterborn ve Kettle, 2003).

Süperoksit radikali ( $O_2\bullet$ ) hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alması sonucu indirgenmesi ile oluşmaktadır.



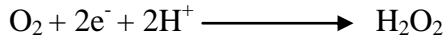
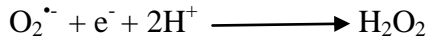
Süperoksit radikalının direkt olarak bir zararı yoktur ancak asıl önemi, hidrojen peroksidin kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgenmesine sebep olmasıdır. Süperoksit radikali genelde düşük pH değerlerinde daha reaktif etki göstermektedir. Süperoksit radikali ile perhidroksit radikalleri arasında gerçekleşen reaksiyon sonucu, bu radikallerden biri okside olur, diğeri ise indirgenir. Meydana gelen bu dismutasyon reaksiyonu sonucu

moleküler oksijen ve hidrojen peroksit oluşmaktadır. Süperoksit radikalının hem oksitleyici hem indirgeyici özelliği vardır (Acar, 2015).

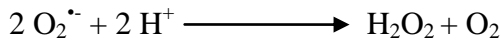
Süperoksit radikali epinefrinin oksidasyonu ile bir oksidan gibi davranır ve sonuç olarak bir elektron alarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indirgenir. Süperoksit radikalının fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit (NO) ile birleşerek tepkimeye girmesi sonucu bir reaktif oksijen türü olan peroksinitrit (ONOO) meydana gelir. Peroksinitrit, nitrit (NO<sub>2</sub>) ve nitrat (NO<sub>3</sub>) oluşturmak üzere metabolize edilir. Peroksinitrit, azot dioksit (NO<sub>2</sub>), OH•, nitronyum iyonu (NO<sub>2</sub>) gibi toksik ürünlere dönüşebilir ki nitrik oksitin (NO) zararlı etkilerinden peroksinitrit sorumludur (Halliwell ve Gutteridge, 1999; Reiter, 1997).

### *Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)*

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, süperoksitten bir elektron alması yada moleküler oksijenden iki elektron alması ile oluşan peroksitin iki proton (H<sup>+</sup>) ile birleşmesi sonucu meydana gelir (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

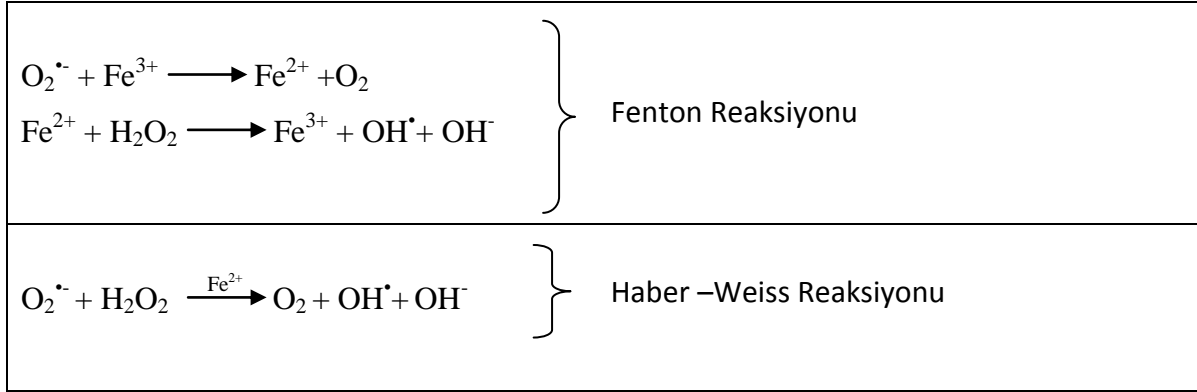


Organizmada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in asıl üretimi, süperoksidin (O<sub>2</sub>) dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülünün dismutasyonu sonucu iki proton alarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve moleküler oksijen oluşur.



Bu reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler olduğundan dolayı, bur dismutasyon reaksiyonu olarak bilinmektedir. Bu reaksiyon ya spontan olarak gerçekleşir ya da SOD enziminin katalizi sonucu gerçekleşir (Winterbourn ve Kettle, 2003).

Hidrojen peroksit bir serbest radikal olamamasına rağmen ROT kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü Fe<sup>2+</sup> veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu, süperoksit radikalının (O<sub>2</sub>•) varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan OH• oluşur (Şekil 2.9) (Schoneic, 1999).



Şekil 2.9. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu.

### Singlet oksijen ( $^1\text{O}_2$ )

Singlet oksijen bir radikal değildir ve eslenmemiş elektronu yoktur. Fakat bu molekülün çok reaktif bir molekül olması ve molekülün üretimi sırasında radikal tepkimeler meydana getirdiğinden dolayı serbest radikal olarak kabul edilmektedir. Enerji girişi ile oksijenlerin paylaşılmasını dışta bulunan elektronların spinleri değişebilir. Oksijenin uyarılmışı olan bu molekül dış iki elektronu ayrı veya aynı yörüngeyi işgal edebilir. Oksijenin uyarılmış bu iki formuna singlet oksijen denilmektedir (Lledias, Rangel ve Hansberg, 1998). Oksitleme özelliği daha fazla artmış olan oksijenin daha reaktif bir formudur ve bu radikalın DNA hasarı oluşturduğu ve mutajenik etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

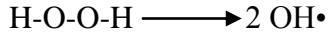
Singlet oksijeni aşağıdaki reaksiyonlar sonucu meydana gelir (Tamer, Polat ve Eskandari, 2000).

- Süperoksidin enzimatik olmayan dismutasyonu ile,
- Haber-Weiss reaksiyonu sonucu,
- Süperoksid radikalının diaçil peroksidlerle reaksiyonu ile,
- Süperoksid ve hidroksil radikalının reaksiyonu ile,
- Fagositoz sırasında myeloperoksidazın hidrojen perokside etki etmesi sonucu oluşabilir.

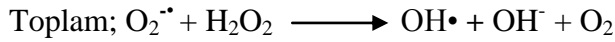
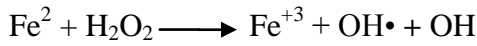
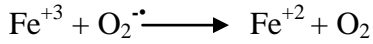


### *Hidroksil radikali (OH•)*

Bilinen en reaktif oksijen radikalidir. Biyolojik hasar yapma potansiyeli yüksektir, hücre içindeki tüm moleküller ile reaksiyona girebilir ve zincir tepkimelerini başlatabilir (Aksu, 2006). Fenton reaksiyonu ile, hidrojen peroksitlerin oksijen bağlarının ultraviyole etkisiyle homolitik yarılmaları sonucu hidroksil radikali oluşabilir.



Haber-Weiss reaksiyonu ile, süperoksit radikalinin hidrojen peroksit ile reaksiyona girmesi sonucu hidroksil oluşabilir.



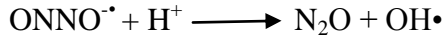
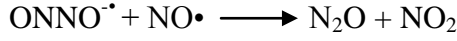
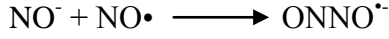
Hidroksil radikalleri suyun iyonizasyonu sonucu da oluşabilirler. Bu yolla oluşan hidroksil radikallerinin hasar oluşturma seviyeleri düşüktür. Nitrik oksit radikalinin oluşturduğu bir reaksiyonla geçiş metali iyonlarından bağımsız olarak da hidroksil radikali oluşabilir (Schoneich, 1999). Hidroksil radikali membran yapısında bulunan doymamış yağ asitlerinin peroksidasyona uğramasını sağlayarak lipid radikallerinin oluşmasına sebep olmaktadır. Hidroksil radikali üç tür reaksiyona katılabilir (Reiter, 1997).

- Hidroksilin alkollerle reaksiyonu sonucunda bir karbon radikali ve su açığa çıkar.
- Hidroksil radikali, aromatik bileşiklerdeki çift bağlara eklenebilir.
- Hidroksil radikali, organik ve inorganik bileşiklerde elektron transferi tepkimelerine neden olur.

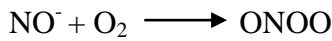
### *Nitrojen oksitler*

Nitrik oksit (NO•), renksiz bir gazdır. Suda ve organik çözücülerde çözünür hücre zarından kolaylıkla geçebilir. Dışyörüngesinde eslenmemiş elektronu bulunur ve bu sebeple serbest radikaldir (Winterbourn ve Kettle, 2003). Eslenmemiş elektronu bir

elektron oksidasyonu aracılığı ile yükseltgenirse nitronyum katyonu ( $\text{NO}^+$ ) oluşur yada bir elektron indirgenirse nitroksil anyonu ( $\text{NO}^-$ ) oluşur.



Nitroksil, oksijen ile reaksiyona girerek peroksinitriti oluşturabilir.



Havadaki moleküler oksijenle Nitroksil reaksiyona girdiğinde daha reaktif olan ve kahverengi renkli nitrojen dioksit ( $\text{NO}_2\cdot$ ) oluşur (Halliwell ve Gutteridge, 1999). Nitrik oksit biyolojik sıvılarda çeşitli reaksiyonlara girerek nitrit, nitrat ve peroksinitritlerin oluşmasına neden olur (Beckman ve Koppenol, 1996).

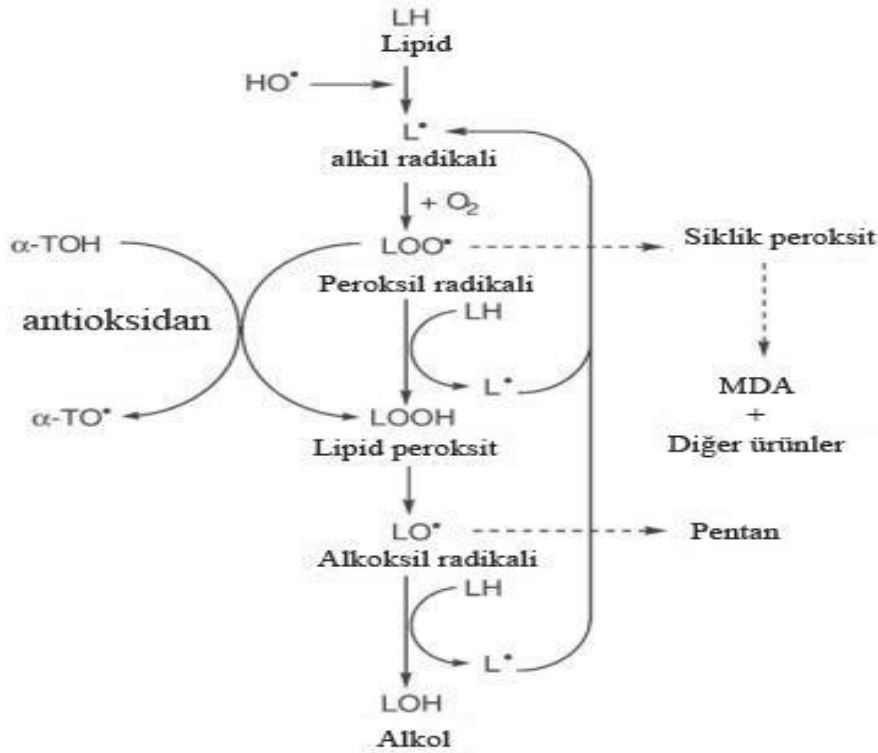
### *Lipit peroksidasyonu*

Lipid peroksidasyonu; serbest radikaller tarafından başlatılan kimyasal bir olaydır, membran yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olur ve böylece membran lipid yapısını değiştirerek hücrelerin yapısında ve fonksiyonlarında bozukluklara neden olur. Normal şartlarda az da olsa tüm hücre ve dokularda lipit peroksidasyonu meydana gelir. Lipid peroksidasyonuna en duyarlı bileşikler membran fosfolipidlerinin yapısında bulunan çoklu doymamış uzun zincirli yağ asitleridir, özellikle araşidonik asit ve dekosohexaenoik asittir. Bu sebeple lipit peroksidasyonu sonucu en önemli hasar hücre membranında meydana gelir (Erdal ve diğerleri, 2005).

Lipit peroksidasyonu hücre membranı yapısında meydana getirdiği önemli zararlar sonucunda membran akışkanlığı ve geçirgenliğini bozar. Lipit peroksidasyonu bir metilen grubundan ( $\text{CH}_2$ ) bir hidrojen (H) atomunun uzaklaşmasıyla birlikte karbon atomu (CH) üzerinde eşleşmemiş bir elektron oluşmasıyla sonuçlanır (Karabulut ve Gülay, 2016).

Yapısında birden fazla sayıda çift bağ içeren aşırı doymamış yağ asitlerinden hidrojenin ayrılması daha kolaydır. Bu sebeple doymuş ve tekli doymamış yağ asitleri, radikal etkilerine karşı aşırı doymamış yağ asitlerine kıyasla daha dirençlidir. Yağ asidinden

hidrojen ayrılmasından sonra oluşan lipid radikali, molekül içi değişiklik geçirerek oksijenle reaksiyona girer ve peroksil radikalini oluşturur. Oldukça reaktif olan bu radikal, diğer yağ asitlerini de benzer şekilde etkileyerek zincir reaksiyonu şeklinde lipid peroksidasyonunu devam ettirir (Şekil 2.10). Fenton reaksiyonu sonucu oluşan hidroksil radikali, lipid peroksidasyonunun başlaması için ana etkenlerden birisidir (Zengin, 2015).



Şekil 2.10. Lipit peroksidasyonunun zincir reaksiyonları

Aldehitler lipidperoksidasyonu sonucu oluşan en toksik ürünler olup, Malondialdehit (MDA) non-enzimatik oksidatif lipit peroksit dekompozisyonu sonucu oluşur ve peroksidasyonun son ürünüdür (Erdal ve diğerleri, 2005).

Lipid peroksidasyonu otokatalitik zincir reaksiyonu ile hasar yapar. Kuvvetli bir oksidanın etkisiyle PUFA zincirindeki  $\alpha$ -metilen grubundan bir hidrojen atomunun ayrılması sonucu başlar ve lipid hidroperoksitlerin doymamış yağ asidi aldehitleri, alkanlar, epoksi yağ asitleri, hidroksi yağ asitleri gibi ürünlere yıkılması ile etan, pentan gibi uçucu gazların oluşması ile sonlanır. Bunlarda doğrudan membran yapısına, dolaylı olarak da hücre bileşenlerine zarar verirler (Erdal ve diğerleri, 2005; Halliwell ve Gutteridge, 1999).

### *Proteinler*

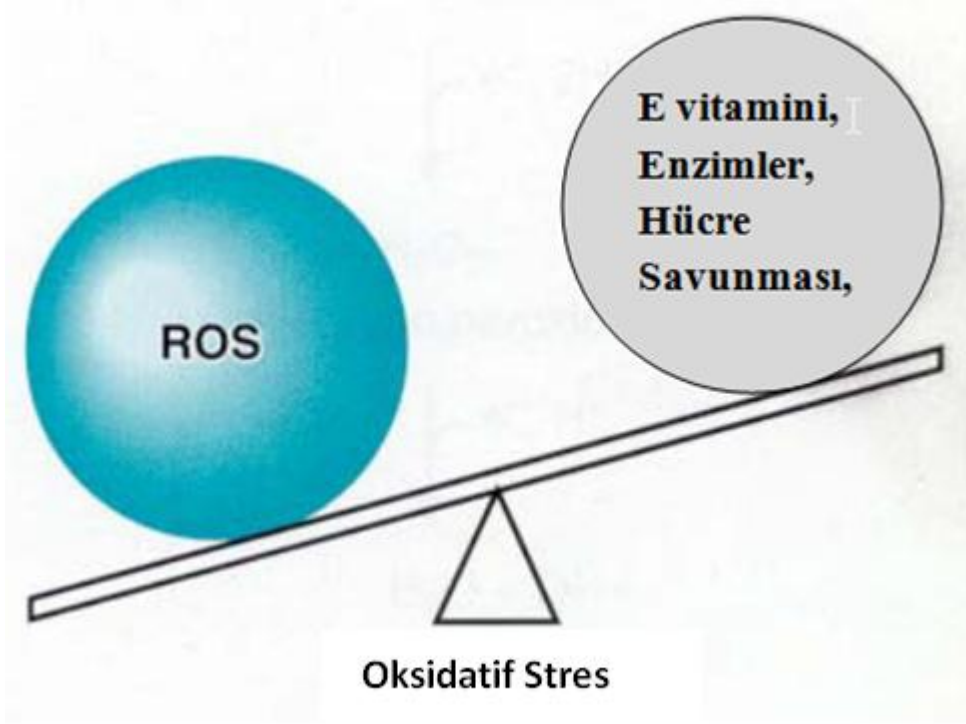
Serbest radikaller proteinleri doğrudan etkilerken proteinlerin etkilenme derecesi yapısındaki aminoasit içeriğine göre değişir. Doymamış bağ ve sülfür içeren triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin ve sistein gibi aminoasitler içeren protein molekülleri daha yüksek reaktiviteye sahip olduklarından dolayı serbest radikallerle daha kolay reaksiyona girerler. ROT ve RNT (Reaktif Nitrojen Türleri) nin neden olduğu protein oksidasyonu ile, proteinler hidroperoksitler gibi kararlı ve yüksek derecede reaktif olan ürünler meydana gelir. Bu ürünler ile geçiş metal iyonlarının etkileşimi sonucunda radikaller oluşabilir. Bununla beraber oksitlenmiş proteinlerin birçoğu, fonksiyonel olarak doğada inaktif haldedir ve hızlı bir şekilde uzaklaştırılırlar. Fakat zaman ile bir miktar birikebilir ve böylece çeşitli hastalıkların yanı sıra yaşlılık ile ilişkili hasarlarada sebep olur (Karabulut ve Gülay, 2016).

### *DNA ve serbest radikal hasarı*

Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin kansere ve kanserin ilerlemesine neden olmaktadır. ROT pürin ve pirimidin bazlarında kimyasal modifikasyonlara neden olur ve bu oksidatif baz modifikasyonları mutasyonla sonuçlanabilir (Ashook ve Ali, 1999). Hidroksil radikalının DNA' da modifikasyonu daha kapsamlı olup, bütün bazlarda modifikasyona sebep olmaktadır, singlet oksijeni ise öncelikle 8-hidroksilasyon yoluyla guanin bazını modifikasyonuna sebep olmaktadır. Serbest radikaller baz lezyonları, şeker lezyonları, tek zincir kırılması, DNA protein çapraz bağları oluşturma gibi çok değişik yollarla DNA ve nükleoproteinler delesyonlara neden olur (Cardozo-Pelaez, Brooks, Stedeford, Song ve Sanchez-Ramos, 2000).

### **2.4.2 Serbest radikaller ve oksidatif stres**

Organizmada reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri ile antioksidan sistem arasında hemostatik bir denge bulunmaktadır. Oksidan moleküllerin oluşum hızında artma ya da antioksidan savunma sistemi etkinliğinde meydana gelen azalmaya bağlı olarak, oksidan/antioksidan dengenin bozulması sonucu “oksidatif stres” meydana gelir (Şekil 2.12) (Şahan Fırat ve diğerleri, 2008).



Şekil 2.11. Oksidatif stres

Oksidatif stres, organizmadaki pro-oksidan ve anti-oksidan dengenin bozulması olarak da tanımlanmaktadır. Radikaller; lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi temel hücresel bileşenlerde hasara yol açabilmektedir ve oluşan bu hasar kanser, ateroskleroz, amiloidoz, yaşa bağlı bağışıklık yetersizliği, senil demans ve hipertansiyon gibi çeşitli hastalıklar ile ilişkili olduğu ve biyolojik yaşlanma sürecinde rol oynadığı bilinmektedir (Çakatay ve Kayalı, 2006).

#### Oksidatif stres ve buna bağlı gelişebilen hastalıklar

Oksidatif stres basit bir şekilde, bedenin Antioksidan savunması ile hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna neden olan Serbest Oksijen Radikallerinin üretimi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif stres, toksisitenin olası bir mekanizması olarak son on yıldır toksikolojik araştırmaların odağı haline gelmiştir. Oksidatif stres, lipidler, proteinler, enzimler, karbonhidratlar ve DNA gibi hücredeki hayati öneme sahip makromoleküllere zarar vererek; hücre zarı hasarına yada parçalanmaya, DNA, enzim ve proteinlerde rastgele çapraz bağlanmalara ve DNA fragmantasyonu ve lipid peroksidasyonu ile hücre ölümlerine neden olabilir (Acar, 2015).

Oksidatif stres; süperoksit anyon radikali ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri tarafından başlatılır. Her iki reaktif oksijen türü de güçlü oksidanlardır, ancak dokularda oluşan zararlı reaksiyonlar sonucunda daha da tehlikeli oksidanlar haline dönüşebilmektedirler. Oksidatif strese bağlı olarak lipidler, proteinler, enzimler, karbonhidratlar ve DNA zarar görebilmekte, membranlardaki hasarın neticesinde DNA zincirlerinde rastgele kırılmalar ve bağlanmalar meydana gelebilmekte, enzim ve yapısal proteinlerin zarar görmesi hücrenin ölmesiyle sonlanabileceği gibi bu olgular kanser, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar ile diyabet ve otoimmün bozuklukların gelişiminde moleküler temeli oluşturmaktadır. Bazı nörodejeneratif hastalıklarda önemli oranda kan-beyin engelini aşabilen Antioksidan' lara ihtiyaç vardır. Hava kirliliği, sigara kullanımı, kötü beslenme alışkanlıkları, streste eksojen ve endojen olarak Serbest Oksijen Radikalleri oluşumunu artırmaktadır. Organizmanın Antioksidan kapasitesinin yetersizliği durumunda, metabolik reaksiyonlar hücreler için zararlı olmakta ve önlenemeyen bu zararlı reaksiyonlar neticesinde deride akne ve kırıxıklık, premature yaşlanma, koroner damar hastalıkları, diyabet, Alzaymır, Parkinson ve değişik kanser türlerinin oluşmasına zemin hazırlamaktadır (Acar, 2015).

ROT' nin neden olduğu oksidatif stresin ortaya çıkışı, çoğu hastalığın önemli bir etiyolojik veya patojenik ajanı olarak düşünülür (Lenaz ve diğerleri, 2008). ROT' ne sürekli maruz kalan hücreler, en hayati makromoleküllerinde hasar görürler. Hem ROT üreticisi olan, hemde ROT hedefi olan mitokondri; mitokondriyal yaşlanma teorisinin temelini oluşturur. ROT' e maruz bırakılarak uyarılan mtDNA' nın somatik mutasyonlarının birikiminin mtDNA ile kodlanmış polipeptitlerde hatalara yol açtığı öne sürülmüştür. Serbest oksijen radikallerinin etkileşimi sonucu meydana gelen hücre hasarları birçok kronik hastalığın belirtilerinin meydana çıkmasına sebep olmaktadır. Aterogenez, Parkinson hastalığı, Duchenne tipi musküler distrofi, gebelik preeklampsis, serviks kanseri, alkolik karaciğer hastalığı, hemodiyaliz hastaları, diabetes mellitus, akut renal yetmezlik, Down sendromu, retrolental fibroplazi, serebrovasküler bozukluklar, iskemi/reperfüzyon injürisi gibi bir çok hastalığın temelindeki sebeplerden biriside serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarlarıdır (Lenaz ve diğerleri, 2008).

Yaşa bağlı olarak oksidatif stresin seviyesinde artış meydana gelir; yaşın artışıyla membran lipidlerindeki peroksidasyon ve oksidasyona uğramış proteinlerin birikimide artmaktadır. Serbest radikallerin çoklu doymamış yağ asitleri ile tepkimesi sonucu lipid peroksidleri

oluşur ve bunların hücre yırtılmalarına yol açarak membran akışkanlığının ve elastikiyetinin geri dönüşümsüz hasarına neden olduğu ortaya konulmuştur.



Şekil 2.12. Mitokondriyal ROM, oksidatif mtDNA hasarı ve yaşlanma

Son yıllarda yapılan çalışmalar, artmış serbest oksijen radikallerinin birçok hastalığın fizyolojisi ve patofizyolojisinde rol aldığını göstermektedir. Kardiyolojik hastalıklar, nörolojik hastalıklar, astım, diabetes mellitus, romatoid artrit, kanser, Alzaymır ve Parkinson gibi yaşlılıkta görülen pek çok hastalığın oksidatif stres ile ilişkisi gösterilmiştir (Ruszkiewicz ve Albrecht, 2014).

### 2.4.3. Antioksidan savunma sistemleri ve antioksidanlar

ROT oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler. Hücrelerde metabolik işlemler sonrasında sürekli olarak reaktif oksijen üretilir. Bu radikaller SOD, GPx, KAT gibi enzimler aracılığı ile A, C, E vitaminleri ile ubikinon, GSH ve flavonoidler gibi enzim dışı antioksidan içeren antioksidan savunma sistemleri tarafından nötralize olurlar (Urso ve Clarkson, 2003).

Okside olabilecek maddelerin oksidasyon sürecini geciktiren veya önleyebilen maddelere antioksidanlar denir (Rikans ve Hornbrook, 1997). Belirli seviyelere kadar bulunan antioksidanlar, yine hücrelerde kendiliğinden bulunan endojen doğal antioksidanlar tarafından nötralize edilmektedir. Bu şekilde hücre içerisinde antioksidanlar ve oksidanlar arasında bir denge sağlanır. Oksidanlar belirli bir seviyenin üzerine çıkar ve antioksidanlar yetersiz kalırsa bu denge bozulur ve önemli yapı taşları olan protein, lipit, karbonhidrat, nükleik asit ve bazı faydalı enzimler üzerinde oksidatif stres meydana gelir (Yu, 1999).

### Antioksidan kaynakları

Antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı olabilirler, ayrıca antioksidanlar; eksojen, endojen, protein, vitamin, kompleks bileşik, hidrofilik, hidrofobik, direkt etkili, indirekt etkili olanlar şeklinde gruplandırılabilir gibi, zar, dolaşım, sitosol ve sistem antioksidanları şeklinde de sınıflandırılmaktadır (Akkuş, 1995; Moure ve diğerleri, 2001)

#### *Endojen kaynaklı antioksidanlar*

Endojen kaynaklı antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan (nonenzimatik) antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılırlar (Akkuş, 1995).

- Enzimatik antioksidanlar, Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px), Glutasyon Redüktaz, Glutasyon S-Transferaz (GST), Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz, Katalaz
- Enzimatik olmayan antioksidanlardan, Glutasyon (GSH), Sistein, Ürik Asit, Glikoz, Albumin, Bilirubin, Melatonin, Seruplazmin, Transferrin, Laktoferrin, şeklindedir.

#### Süperoksit dismutaz (SOD)

SOD süperoksit serbest radikalının ( $O_2$ ) hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve moleküler oksijene ( $O_2$ ) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. McCord ve Fridovich tarafından 1968' de keşfedilmiştir. 3 tür SOD vardır. Birincisi mitokondride lokalize Mn-SOD, ikincisi sitozolde lokalize Cu-Zn-SOD ve üçüncüsü de Cu içeren ve plazmadaki süperoksit radikallerini metabolize eden vasküler endotele bağlı Cu-SOD' dır (Young and Woodside,



2001). Süperoksit dismutazlar, merkezlerinde bulunan geçiş metallerine göre, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD ve Fe-SOD olmak üzere üç sınıfa ayrılır (Halliwell ve Gutteridge, 1999). SOD bir süperoksit molekülünü  $O_2$  molekülüne yükseltgeyip, diğer süperoksit molekülünü  $H_2O_2$ ' e indirger.

Bu dismutasyon reaksiyonu süperoksit radikalinin anyon ve kation formlarının eşit oranda bulunduğu pH 4,8' de kendiliğinden de gerçekleşir. Ancak fizyolojik şartlarda yani pH' nın 7,35-7,45 arasında iken bu reaksiyon çok daha yavaş gerçekleşecektir. SOD enzimi varlığında, pH en az 7,4 olduğu bu durumda bu reaksiyon 4 kat daha hızlı olacaktır (Cherubini ve diğerleri, 2005).

SOD' ın fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalinin ( $O_2$ ) lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. SOD, fagosite edilmiş bakterilerin intrasellüler olarak öldürülmesinde de rol oynar. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku  $pO_2$  artışıyla artar. SOD' ın ekstrasellüler aktivitesi çok düşüktür (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

#### Glutasyon peroksidaz (GPx)

GSH-Px sitozolde bulunur, 4 selenyum atomu içerir, tetramerik yapıdadır. GPx oksidoredüktaz, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PLGSH-Px) adı verilen bir enzim monomerik yapıdadır ve esas olarak membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger (Halliwell ve Gutteridge, 1999 ).

Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PLGSH-Px) membrana bağlı en önemli antioksidan olan vitamin E yetersiz olduğunda membranı peroksidasyona karşı korur. GPx' ın fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GPx, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini önler. GPx eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. Eritrosit GPx aktivitesi yaşlılarda ve Down sendromlu hastalarda yüksek, prematürelde düşüktür. Lökosit GPx aktivitesi yaşlılarda ve hipertansiyonlu hastalarda yüksektir (Joti ve diğerleri, 1994).

### Glutasyon redüktaz

Yükseltgenmiş glutasyonu indirgenmiş hale çeviren 2 subünitten oluşmuş bir dimerdir. Her bir subünit NADPH bağlayan, FAD bağlayan ve ara yüz alan olmak üzere 3 tane yapısal alan içerir. Glutasyonun indirgenme reaksiyonu sırasında sıklıkla elektronlar NADPH' dan FAD' a transfer edilir. Daha sonra subünitlerdeki iki sistein arasında bulunan disülfid köprüsüne transfer edilerek okside glutatona aktarılırlar (Cherubini, Ruggieno, Polidori ve Mecocci, 2005).

### Glutasyon S-Transferazlar (GST)

GST, başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı GSH-Px aktivitesi göstererek bir antioksidan savunma mekanizması oluştururlar. GST katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahip olup, bunlar hem detoksifikasyona sebep olurlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı görevleri vardır. (Fernandez-Checa ve Kaplowitz, 2005).

### Katalaz (KAT)

Katalaz ( $H_2O_2:H_2O_2$ ) oksidoredüktaz, yapısında dört tane hem grubu bulunan bir hemoprotein olup, esas olarak peroksizomlarda daha az olarak ise sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. KAT' ın en önemli işlevi hidrojen peroksidi ( $H_2O_2$ ) suya ve oksijene parçalamaktır. En önemli görevi hücrede oluşan hidrojen peroksidi ( $H_2O_2$ ) hidroksil serbest radikali ( $OH\bullet$ ) oluşumunu önlemek için ortadan kaldırır (Halliwell ve Gutteridge, 1999)

### Glutasyon (GSH)

GSH, tüm hücrelerde yüksek konsantrasyonlarda bulunan bir tripeptide sahip olup, Sitozolde glutamat, sistein ve glisinden iki aşamada sentezlenir. Mitokondrilerde, GSH ağırlıklı olarak azaltılmış formda bulunur ve toplam GSH' nin küçük bir kısmını (% 10-15) temsil eder (Fernandez-Checa ve Kaplowitz, 2005). GSH serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan çok önemli bir antioksidandır. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde de GSH rol

alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutarak bu grupları oksidasyona karşı korur ve böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunun önüne geçer. GSH bazı yabancı ve zararlı bileşiklerin detoksifasyonu ve aminoasitlerin hücre membranlarından geçişinde rol oynar (Fernandez-Checa ve Kaplowitz, 2005).

Mitokondri, sürekli oksijen radikale maruz kalsada, organik madde, antioksidan bir savunma sisteminin varlığı nedeniyle işlevsel kalır. Hidrojen peroksit birikimi sınırlandırılmazsa, mitokondriyal bileşenleri (proteinler, lipidler, DNA) okside edebilir. Hidrojen peroksit birikiminin önüne geçme görevi ağırlıklı olarak GSH tarafından gerçekleştirilir; çünkü mitokondride KAT yoktur ve GSH, GPx ve NADPH-bağımlı GSSG redüktazın katılımıyla redoks döngüsünün ayrılmaz bir bileşenidir. Dahası, hidrojen peroksitin etkin bir şekilde atılmasını sağlamak için MnSOD ve GSH redoks döngüsü arasındaki bir denge olmalıdır (Sözmen ve diğerleri, 2002). mGSH konsantrasyonu yüksek olduğu için, orta şiddette mGSH tükenmesinin hidrojen peroksitin GSH peroksidazı tarafından veya mitokondriyal fonksiyon ile elden çıkarılması üzerinde olumsuz etkisi olması beklenmemektedir. Bununla birlikte, mGSH'nin kritik bir seviyenin altına düşürülmesi, özellikle mitokondriyal elektron taşıma zincirinden uyarılan ROT oluşum koşullarında, hidrojen peroksitin yeterli bir şekilde indirgenmesini tehlikeye atacaktır. Mitokondriada GSH ve S transferazların (GST) varlığı, lipid peroksidasyon ürünlerini içeren organik hidroperoksitlerin azaltılmasını sağlar. Bu nedenle, oksidanları azaltmada ve elektrofilleri eşleştirmedeki çok yönlü fonksiyonlarından da anlaşılacağı üzere, mGSH mitokondriyayı sağlıklı tutmada önemli bir rol oynamaktadır ve hücrenin hasar görmesinin önüne geçer. Buna ek olarak Mitokondriyal GSH, patofizyolojide rol oynadığı bilinen mitokondriyal membran permeabilizasyon (MMP) yoluyla meydana gelen mitokondriyal hücre ölüm yolunda etkiler ve hücre ölümünün önüne geçer (Fernandez-Checa ve Kaplowitz, 2005).

### Karotenoidler

A vitamininin ön maddesi olan  $\beta$ -karoten singlet oksijenin baskılanmasını sağlar ve süpürür, peroksit radikali ile doğrudan etkileşime girerek antioksidan görevi görür (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

### Melatonin

Melatonin çok yaygın olarak bulunan ve serbest radikallerden OH• radikalini ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır. antioksidanların en güçlüsüdür, hidroksil serbest radikali (OH•) ile reaksiyona girdikten sonra bir indolil katyon radikaline dönüşür, buda ortamdaki süperoksit radikalini (O<sub>2</sub>•) tutar ve antioksidan aktivite gösterir. Melatoninin lipofiliktir ve bu sebepten dolayı hücre membranlarından kolayca geçer böylece hücrenin bütün organallerine hatta hücre çekirdeğine ulaşabilir. Bu nedenden dolayı hücrede çok geniş bir alanda antioksidan aktivite gösterir (Aksu, 2006).

### Ürat

Normal plazma konsantrasyonunda ürat; hidroksil, süperoksit, peroksit radikalleri ve singlet oksijeni temizler. Fakat lipid radikalleri üzerinde bir etkisi olmayıp, C vitamini oksidasyonunu engelleme yönünde etkisi vardır (Akkuş, 1995).

### Albümin

Albümin göstermiş olduğu antioksidan aktivite ile LOOH ve HOCl toplayıcısı olarak görev yapar.

### Seruloplazmin

Seruloplazminin etki mekanizması SOD' un etki mekanizmasına benzer mekanizmayla etki gösterir. Ferro demiri, (Fe<sup>2</sup>) ferri demire (Fe<sup>3</sup>) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve böylece hidroksil radikali oluşumunu inhibe eder.

### Sistein

Sistein süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır. Önemli bir aminoasit olup, antioksidan ve antikanser etkisi yüksektir. Glutasyon üretiminde önemli yeri olup, glutasyon miktarının belirlenmesinde etkilidir.

### Sitokinler

Sitokinler başta KAT olmak üzere antioksidan enzimleri aktive ederler. Ancak proteolitik enzimleri aktive ettiklerinden dolayı zararlı da olabilirler.

### *Eksojen kaynaklı antioksidanlar*

Eksojen antioksidanlar; vitaminler ve ilaç antioksidanları olarak sınıflandırılırlar (Akkuş, 1995).

- Vitamin-C (askorbik asit)
- Vitamin-E (tokoferol)
- Provitamin A (B-karoten)
- Koenzim Q (ubikinon)

### Vitamin C (askorbik asit)

C vitamini organizmalarda birçok hidroksilasyon reaksiyonunda indirgeyici ajan olarak görev yapar, kollajen sentezinde lizin ve prolinin hidroksilasyonu için gereklidir. C vitamini immün sistemin güçlenmesinde ve yara iyileşmesinde etkin rol oynar (Ashok ve Ali, 1999).

C vitamini, güçlü indirgeyici aktiviteye sahiptir, bu sebepten dolayıda aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Süperoksit radikalleri ( $O_2\bullet$ ) ve hidroksil radikalleri ( $OH\bullet$ ) ile reaksiyona girer ve onları ortamdaki temizlerler (Blumenthal ve diğerleri, 2000; Ladas ve diğerleri, 2004).

### Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol)

E vitamini çok güçlü bir antioksidandır, hücre membranında bulunan fosfolipidlerdeki poliansatüre yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyarak ilk savunma hattını oluşturur. Membranlarda oksijen radikallerinin ana temizleyicisidir ve en aktif formu  $\alpha$ -tokoferoldür (Jialal and Grundy, 1993; Steinberg and Chait, 1998). E vitamininin en

önemli fonksiyonu, biyolojik sistemlerde zincir kırıcı bir antioksidan olarak görev yapar ve serbest oksijen radikallerin reaksiyonlarının yayılmasını önler ayrıca hücreleri lipid peroksidasyonuna karşı koruma sağlar (El-Demerdash, Yousef, Kedwany ve Baghdadi, 2004).

Organizmada önemli derecede biyolojik rolü olan Se (selenyum), semimetalik bir element olup E vitamini ile birlikte sinerjetik etki göstermekte ve çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu birlikte önlemektedirler (Smith, 1996; Köşkeröglü, 1998).

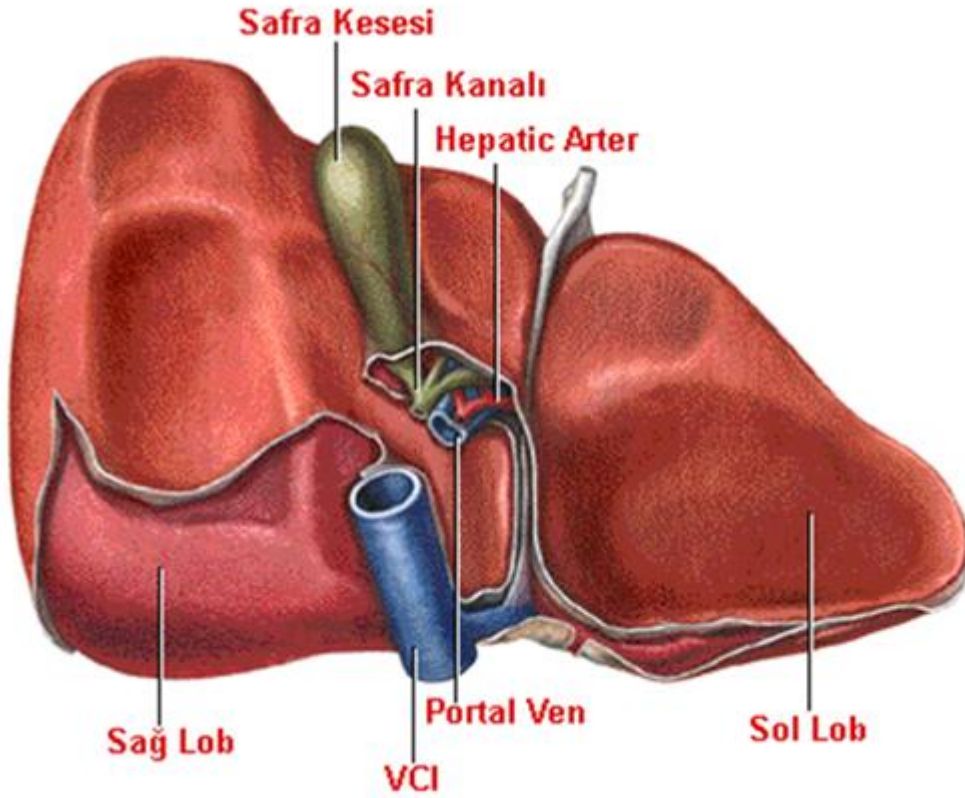
## 2.5. Karacacigerin Yapısı ve Önemi

Karaciğer normalde kahverengi renkli ve dış yüzey pürüzsüz bir organdır. Karaciğer vücudun yaklaşık % 2' sini oluşturur ve yetişkin kadınlarda yaklaşık 1400 g, erkeklerde 1800 g ağırlığındadır (Lena Sibulesky, 2013). İnsan vücudunun en büyük organı karaciğerdir, karaciğer; batın sağ üst kadranda diaframın hemen altında yerleşim göstermektedir. Karaciğer dual kan akımı alan tek parankimatöz organdır. Portal ven karaciğer kan akımının yaklaşık % 75' ini, hepatic arter ise yaklaşık % 25' ini sağlamaktadır. Karaciğerin venöz drenajı hepatic venler tarafından gerçekleştirilmektedir (Başak ve Akan, 2015).

Karaciğer arteriyollerinden ve portal venüllerden gelen kan, hücre tabakalarının aralarında yerleşmiş, kapiller fonksiyonu olan sinüzoidal kanallardan geçer. Karaciğer sinüzoidlerinde endotelial hücreler ve makrofajlar olmak üzere iki tip hücre vardır. Disse aralığı, sinüzoidal kapiller ile hepatositler arasında yer alır. Hepatic lobüllerin santral venlerindeki venöz drenaj birleşerek hepatic venleri oluşturur. Bunlar da inferior vena kavaya boşalır. Caudat lobun venleri ayrıdır. Safra kanalcıkları her plağın içinde hepatositlerin aralarında doğar ve birleşerek safra kanallarını oluşturur (Morgan, Mikail, ve Michael, 2002).

Kalp debisinin % 25' ini karaciğer alır, 100 g doku başına dakikada 100 ile 130 mL arasında kan gelmektedir. Hepatic arter karaciğere gelen kanın yaklaşık % 25' ini sağlarken oksijen ihtiyacının da % 45-50' sini sağlar. Karaciğere gelen kanın % 75' ini sağlayan portal ven ise oksijen ihtiyacının ancak % 50-55' ini sağlar. Çünkü portal ven mide, bağırsaklar, dalak ve pankreas gibi organların venöz drenajını sağlayıp, parsiyel

olarak deoksijenize olarak gastrointestinal sistemden absorbe ettiği besin ve diğer bileşenler açısından zengin olan kanı taşır. Karaciğer kan akımının regülasyonunda hem intrinsik hem de ekstrinsik mekanizmalar rol oynar (Mushlin ve Gelman, 2001; Pannen, 2000).



Şekil 2.13. Karaciğerin yapısı

Karaciğerin temel fonksiyonel hücreleri hepatositler olup oldukça fazla sayıda metabolik, endokrin ve salgı fonksiyonlarını gerçekleştirirler. Karaciğer kütlesinin % 80 'nini teşkil ederler.

### 2.5.1. Karaciğerin fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonları

Karaciğer hem duodenuma safra salgılayarak bir ekzokrin bez olarak görev yapar, hem de direkt olarak kan dolaşımına salınan çeşitli maddeleri sentezleyen bir endokrin bez olarak görev yapar (Fawcett, 1986). Karaciğer dolaşım sisteminde, metabolitlerin bir araya getirilmesi, dönüştürülmesi, biriktirilmesi ve toksik maddelerin nötralize ve elemine edilmesi için çok uygun bir organdır. Bu eliminasyon karaciğerin lipit sindirimine yarayan

ve ekzokrin bir salgı olan safrada gerçekleşir (Junquera ve Carneiro, 2006). Salgı yapma fonksiyonundan başka, yaşama ilgili çok çeşitli işlevleri yerine getiren bir organdır. Sindirim kanalı ile vücudun diğer kısımları arasında kalan tam bir kesişme noktasında yer alan karaciğer, vücudun metabolik dengesini sağlar. Karaciğerin metabolik dengeyi sağlamaya yönelik bazı görevleri; sindirilen aminoasitlerin, karbonhidratların, lipitlerin ve vitaminlerin işlenmesi, serum proteinlerinin sentezi, endojen atık ürünlerin ve zararlı ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ve safra ile atılması şeklindedir (Kumar, Cotran, ve Robbins 1999).

Karaciğerin koagülasyonun kontrolü ve gerçekleşmesi ile ilgili bazı fonksiyonları vardır. Karaciğerin kanın pıhtılaşmasında birçok yoldan katkısı vardır. Tüm koagülasyon faktörleri (Faktör VIII ve Faktör IV hariç) karaciğerde sentezlenir. K vitamininin emilimi safra tuzları sayesinde olur. Karaciğer aynı zamanda trombo proteinin sentezinin düzenlenmesi ile de trombosit yapımını kontrol eder (Mushlin ve Gelman, 2001). Karaciğer anjiyotensin, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-I), trombopoetin sentezinde rol oynar. Yine insülin, tiroksin ve östrojenin transport ve metabolizmaları için de gereklidir (Mushlin ve Gelman, 2001). Bilirubin hemoglobin metabolizmasında son ürün olup bilirubin atılmasında karaciğerinde fonksiyonu vardır. Retikuloendotelial sistemde (RES), hem halkasının, miyoglobinin ve sitokrom enzimlerinin parçalanması ile oluşur. Hem oksijenaz tarafından parçalanarak hemoglobin CO<sub>2</sub>, demir (Fe) ve biliverdine parçalanır. Biliverdin redüktaz ile bilirubine dönüşür. Bilirubin konjügasyonu (glukronide bağlanır) karaciğerde gerçekleşir (Morgan ve diğerleri, 2002).

Karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasından karaciğer sorumludur (Mushlin ve Gelman, 2001). Dışardan alınan pek çok madde ve ilacın biyotransformasyonu karaciğerde gerçekleşir. Son ürünler ya inaktiftir ya da suda eriyen safra veya idrarla atılması kolaylaşmış maddelerdir (Morgan ve diğerleri, 2002).

Karaciğer Vitaminlerin depolanması, demir depolanması, glikojen depolanması gibi görevleride vardır. Albumin, globulin, immünoglobulinler, seruloplazmin, transferrin, koagülasyon proteinleri, fibronektin, lipoprotein sentezi, karaciğer enzimleri, üre sentezi, kreatin gibi proteinlerin sentezi gibi olaylarda karaciğerde gerçekleşir. Karaciğerin; sindirim sisteminden kaynaklanan bakterilerin filtre edilmesi, gastrointestinal yolla safra salgılama, bağırsaktan dönen kanın filtrasyonu gibi birçok fonksiyonu vardır (Dilek, 2003).



Bedenimizdeki detoksifikasyon, metabolizma ve savunma sisteminde özelleşmiş, çok fonksiyonlu bir organ olan karaciğerin çeşitli nedenlerle fonksiyonunda bazı aksaklıklar meydana gelebilir ve bu fonksiyonların bozukluğunu tek bir test ile belirlemek mümkün değildir. 1950 yıllarından beri hepatositlerde enflamasyon veya nekroz sonucunda transaminaz yüksekliğinin gösterilmesi ile hepatoselüler hasar belirlenebilmektedir. Hepatositlerde meydana gelen hasar hepatik hasar olarak adlandırılmakta olup akut ve kronik olarak iki grupta incelenmektedir. Akut hepatik hasar aniden veya kısa zaman içinde ortaya çıkan hasarlardır. Kronik hepatit hasarı ise hepatositlerin 6 aydan daha uzun süre hasara maruz kalması ile ortaya çıkan hasarı ifade eder (Burtis ve Ashwood, 2005).

Karaciğer, sentez ve detoksifikasyon görevleriyle vücuttaki en önemli organlardan biridir. Birçok hastalıktan karaciğer dokusu direkt yada dolaylı olarak etkilenir. Karaciğerin işlev ve hasar durumunu alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), laktik dehidrogenaz (LDH), gamaglutamil transferaz (GGT), alkalen fosfataz (ALP), albumin, bilirubin, protombin zamanı (PT) ve parsiyal tromboplastin zamanı (PTT) gibi bazı testler sonucunda belirleyebiliriz. Bu testler içinde en önemli ve en sık kullanılan testler ALT ve AST ölçümüdür ve bu iki enzim en fazla hepatosellüler hasarda artar (Ng ve Balistreri, 2004).

### **2.5.2. Karaciğer hastalıkları ve mitokondri**

Karaciğer, mitokondri açısından zengin bir organ olup, mitokondriler karaciğerde sayıca fazla ve yoğun bir şekilde bulunurlar. Karaciğer hücrelerinin bütünlüğünü ve işlevlerini sürdürmesinde mitokondirinin rolü büyüktür. Mitokondriyal bozukluklarda karaciğer hücresinde fizyolojik stres artar. Son yıllarda Kalıtsal veya mitokondriyal bozukluklara bağlı olarak gelişen akut ve kronik karaciğer hastalıkları teşhis edilmiştir. Çoğu kronik karaciğer hastalıkları, hücrelerdeki hasar görmüş mitokondrilerin sayısındaki artış sonucu meydana gelmektedir. Hepatik mitokondri, karbonhidratların, lipidlerin ve proteinlerin karaciğer metabolizmasını bütünleştiren merkez olduğundan diğer organların mitokondrisine kıyasla çok daha önemlidir (Degli Esposti ve diğerleri, 2012).

Mitokondriler, yüksek enerjili subsratlardan enerjinin elde edilmesinde, hücrelerin metabolik fonksiyon ve bütünlüğünde önemli olan bir solunum organelidir. Bu metabolik makinelerde meydana gelen aksaklıklar sonucunda hücrel enerji depoları tükenebilir,

oksidatif stres meydana gelebilir ve 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 ve Frederick, 2004).

Kronik karaciğer hastalıklarının birçoğu anormal ROT oluşumu, GSH tükenmesi, Protein karbonil gruplarındaki artış ve solunum kompleksi değişiklikleri olan hasarlanmış mitokondrilerin birikmesi ile bağlantılıdır. Mitokondriyal değişiklikler doğalarına ve ciddiyetlerine bağlı olarak lipid birikimi, apoptoz veya nekroza sebep olabilir, böylelikle inflamasyona neden olabilirler. Bu patolojik olaylar, laktoasidoz, hipoglisemi, yüksek serum transaminazları, yüksek konjuge bilirubinemi ve hiperammonemi gibi farklı klinik özelliklere karşılık gelebilir. Mitokondri ROT' nin önemli bir kaynağıdır ve ROT zararlı özelliklerinin yanında aynı zamanda hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasında önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte ROT' nin zararları haricinde, farklı stres tipleri, uyuşturucu, virüs, hipoksi, inflamasyona neden olan sitokinler,  $\beta$ -oksidasyon fazlalığı, sitokrom P450' nin aşırı ekspresyonu gibi nedenlerle karaciğer mitokondrisi zarar görebilir. Bu durumda, ROT' nin 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 ve diğerleri, 2012).

Karaciğer hastalıklarında, hem ROT artışı hem de hücrelerde lipid peroksidasyonu, DNA ve proteinlerin yıkımına yol açtığından karaciğer hasarını artırmaktadır. 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 üretilmesiyle ilgili olabileceği belirlenmiştir. Alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması sonucunda oluşan hepatitide, 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, GSH, E vitamini, beta-karoten ve C vitamini gibi antioksidanların azalması sonucu 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; lipid peroksidasyonu ve inflamasyonu artırır (Güngör ve Türker).

### 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 3-30 K), 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), Isıtıcı 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

AK (CAS Number 01680 ) Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) firmasından satın alındı. Çalışmada kullanılan AK %0, 9' luk NaCl kullanılarak 4.16 mg/ml olacak şekilde stok çözelti olarak hazırlandı. Bu stok çözeltiden hayvanların ağırlıkları göz önünde bulundurularak 5 mg/kg/gün olarak intraperitoneal (i.p) olarak haftada 6 gün 30 gün boyunca verildi. Whey protein General Nutrition Center (GNC, İstanbul, Türkiye) firmasından satın alındı. WP' nin 1 porsiyonu (28 gr) 21 gr protein içermektedir. Amino asit içeriği 493 L-arjinin, 3558 L-glutamin, 1212 valin, 631 tirozin, 355 triptofan, 1350 threonin, 995 serin, 1163 prolin, 719 fenilalanin, 443 methionin, 1025 alanin, 2237 aspartik asit, 522 sistein, 384 glisin, 414 histidin, 1301 izolösin, 2296 lösin ve 1902 mg lizinden oluşmaktadır. Geri kalan kısmı 2 gr doymamış yağ, 1 gr doymuş yağ, 2gr karbonhidrat ve 2 gr şekerden oluşmaktadır. Whey protein % 0, 9' luk NaCl kullanılarak 0.75 gr/ml olacak

şekilde stok çözelti olarak hazırlandı. Bu stok çözültiden hayvanların ağırlıkları göz önünde bulundurularak 200 mg/kg/gün gavaj aleti kullanılarak oral yolla (o.p) haftada 6 gün 30 gün boyunca verildi.

Bunun dışındaki kimyasal maddeler ATP tayini için kalorimetrik/florometrik ATP kiti (K354-100) Bio Vision firmasından satın alındı. Rotenon, antimisin A, 2,6-dichlorindofenol (DCIP), deksilubikinol (CoQ), nikotinamid adenin dinukleotit (NAD<sup>+</sup>), redükte nikotinamid adenin dinukleotit (NADH), beta nikotinamid adenin dinukleotit fosfat (NADPH), oksaloasetat, asetilkoenzim A, trisodyumisositrat, tiyobarbitürik asit (TBA), 1.1.3.3. tetraethoksiopropan (MDA), 5-5'-Ditiobis 2- nitrobenzoik asit (DTNB), sükröz, tris (Hidroksi metil aminometan hidrojen), triklor asetik asit (TCA), etilen diamin tetraasetik asit (EDTA), bovin serum albümin, etilen glikoltetraasetik asit (EGTA), triton X-100, guanidin hidroklorür, o-dianisidineklorid, hekzdesil amonyum bromid (HTAB), 1-kloro, 2,4-dinitrobenzen (CDNB), 2,4-dinitrofenil hidrazin (DNPH), redükteglutasyon (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 250-300 gr ağırlıkta sağlıklı, Spraque Dawley cinsi, 24 adet erkek albino sıçanlar kullanıldı. Deney sürecinde (30 gün) tüm sıçanlar polikarbonat şeffaf kafeslerde standart sıçan yemi ile beslenmiş ve çeşme suyu verilmiştir. Deney hayvanları arasından rastgele seçimle her birinde n=6 sıçan olmak üzere toplam 4 grup oluşturuldu. Bu gruplar;

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

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

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

Grup (AK+WP): Deney hayvanlarına 30 gün boyunca yukarıdaki doz ve sürelerde AK ile birlikte WP 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 karaciğerleri 0,15 M NaCl solüsyonu kullanılarak perfüze edildi, kırmızı kan hücreleri dokulardan uzaklaştırıldı. Dokular hızlı bir şekilde kurutma kağıdı ile kurutuldu, tartıldı ve kullanılmaya kadar -80°C' lik derin dondurucuda saklandı.

### **3.2.2. Karaciğerden mitokondri izolasyonu**

Karaciğerden mitokondri izolasyonu diferansiyel santrifüj yöntemi kullanılarak yapıldı (Johnson ve 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 1000 g de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatantın bir kısmı ATP tayini için ayrıldı. Kalan süpernatantlar alınarak 7000 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, 0,1 mM EGTA, pH 7,6) kullanılarak 1000 ve 7000 g de 15 dk santrifüj edilerek yıkandı. B tamponu ile yıkanma sırasında cam çubuklar kullanılarak mitokondriyal pelletin iyice dağılması ve yıkanması sağlandı. Bu mitokondriyal yıkama işlemi 2 kez gerçekleştirildi. Elde edilen yıkanmış pellet daha sonra az miktarda tampon B ile süspansiyon edildi. Bu süspansiyonda protein tayini yapıldı (Lowry, Rosebrough, Fair ve

Randall, 1951). Mitokondriyal fraksiyon ve postmitokondriyal fraksiyon kullanılıncaya kadar  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de derin dondurucuda saklandı.

### **3.2.3. Mitokondriyal oksidatif stresin belirlenmesi**

#### Mitokondriyal süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi

Mn-SOD aktivitesi (EC 1.15.1.1) Madamanchi ve diğerlerine göre yapıldı. Reaksiyon karışımı fosfat tamponu (0,05 M, pH 7) 0,1 mM EDTA, 13 mM methionin, 2  $\mu\text{M}$  riboflavin, nitrobluetetrazolium (NBT) ve enzim ekstraktı içermektedir. Karışım karıştırılarak karanlık bir ortamdaki floresans ışığa (15-W) 30 dk.maruz bırakıldı. Işık kapatıldı, reaksiyon durduruldu. Numunelerin absorbanları 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 (Madamanchi, Donahve, Cramer, Alscher ve Pedersen, 1984).

#### Glutatyon peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

GPx aktivitesi Flohé ve Gunzler' e göre yapıldı. Reaksiyon karışımı fosfat tamponu (0,05 M, pH 7), 1 mM EDTA, 0,2 mM NADPH, 1 mM  $\text{NaN}_3$ , GSH, 1U/ml GR ve substrat olarak  $\text{H}_2\text{O}_2$  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 (Flohe ve Gunzler, 1984).

#### Redükte glutatyon düzeyinin belirlenmesi

Dokulardaki GSH düzeyi Moron ve diğerlerine 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 (Moron, Depierre and Mannervik, 1979).

### Lipit peroksidasyon düzeyinin belirlenmesi

Doku LPO seviyesi Esterbauer ve Chessman '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 3000 g de santrifüj edildi. Temiz süpernatantlar 535 nm' de spektrofotometrede köre karşı okundu. LPO ürünlerinin % 99' unu MDA oluşturmaktadır ve MDA için molar absorblama katsayısı  $\epsilon=1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  kullanılarak hesaplama yapıldı ve sonuçlar nmol malondialdehit/mg protein olarak ifade edildi (Esterbauer ve Chessman, 1990).

### Protein karbonil miktarının belirlenmesi

PK miktarının belirlenmesinde PK gruplarının DNPH ile reaksiyonları esas alınarak çalışılmıştır (Levine ve diğerleri. 1990). Mitokondriyal fraksiyonlar üzerine olası DNA kontaminasyonunu ortadan kaldırmak amacı ile % 10 olacak şekilde streptomisin sülfat eklendi ve 11,000 g de 4°C' de 5dk santrifüj edildi. Süpernatantlar alınarak 0,5 ml DNPH ilave edildi, 15 dakikada bir vorteksenerek oda ısısında, karanlıkta 1 saat bekledi. Proteinlerin çökmesi için 0,5 ml % 20'lik TCA ilave edildi. Karıştırıldıktan sonra 11000 g' de 4°C' de 5 dk santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Pellet 3 kez etanol:etil asetat (1:1,v/v) ile yıkanarak serbest DNPH ve lipit kontaminantları uzaklaştırıldı. En son pellet 6 M guanidinehidroklorit 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- $\beta$ -D-maltozid kullanıldı. Mitokondriyal fraksiyon üzerine 1/10 olacak şekilde bu deterjandan ve % 1 olacak şekilde proteaz inhibitor kokteyl ilave edildi.



Belirli aralıklarla yaklaşık 10 dakika orta hızda su banyosunda sonike edildi. Final protein konsantrasyonu Tris-HCl tamponu (50 mM, pH7,5) kullanılarak 5 mg/ml olacak şekilde ayarlandı ve 10 000 g' de 4 °C' de 15 dk santrifüj edilerek süpernatant ayrıldı.

#### Kompleks I (NADH ubikinon oksidoredüktaz veya NADH dehidrogenaz) aktivitesinin belirlenmesi

Kompleks 1 aktivitesi Janssen ve diğerleri 'ne 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 MgCl<sub>2</sub>, ubikinon, 80 µM 2,6-diklorofenolindofenol (DCIP), 0,2 mM NADH ve mitokondriyal proteinden oluşmaktadır. Absorbans 600 nm' de 2 dk boyunca izlenir. DCPIP için ε=19,1 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar µmol DCIP/dk/mg protein olarak ifade edildi (Janssen ve diğerleri, 2007).

#### Kompleks II (Süksinat dehidrogenaz) aktivitesinin belirlenmesi

Kompleks II aktivitesi de Janssen ve diğerleri 'ne 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 (Janssen ve diğerleri, 2007).

#### Kompleks 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, Casarin, Pertegato, Salviati, ve Angelini, 2013). 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 kahverengiden turuncu-pembeye dönüncüye kadar vortextlendi. Kompleks IV aktivitesi Trounce ve diğerleri' ne 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  $\mu\text{mol}$  okside stokrom C/dk/mg protein olarak ifade edildi (Trounce, Kim, Jun ve Wallanace, 1996).

#### İzositrat dehidrogenaz aktivitesinin belirlenmesi

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

#### Alfa ketoglutarat dehidrogenaz aktivitesinin belirlenmesi

Alfa ketoglutarat dehidrogenaz aktivitesi Lucas ve diğerleri' nin metoduna göre yapıldı. Reaksiyon karışımı fosfat tamponu (0,025 M, pH 7,2), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 Mm rotenon, alfa-ketoglutarat, 40  $\mu\text{M}$  asetilkoenzim A, 0,2 mM, tiamin pirofosfat, 0,5 mM NAD<sup>+</sup> ve sonike edilmiş mitokondriyal proteinden oluşmaktadır. Reaksiyon oda ısısında 340 nm' de NAD<sup>+</sup>' nin redüksiyonu spektrofotometrik olarak izlendi. Sonuçlar  $\mu\text{mol}$  redükte NAD<sup>+</sup> /dk/mg protein olarak ifade edildi (Lucas, Aryal, Szveda, Koch ve Leinuand, 2003).

#### Malat dehidrogenaz aktivitesinin belirlenmesi

MD aktivitesi Gelpi ve diğerleri' ne göre belirlendi. Reaksiyon karışımı fosfat tamponu (0.1M, pH7,4), 0,14 mM NADH, oksaloasetat ve mitokondriyal proteinden oluşmaktadır. Reaksiyon 30 °C' de 340 nm' de NAD<sup>+</sup>' nin redüksiyonu spektrofotometrik olarak izlendi. Sonuçlar  $\mu\text{mol}$  redükte NAD<sup>+</sup> /dk/mg protein olarak ifade edildi (Gelpi, Dordal, Montserrat, Mazo ve Cortes, 1992).

#### 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 mikropilok 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.

### İstatiksel analiz

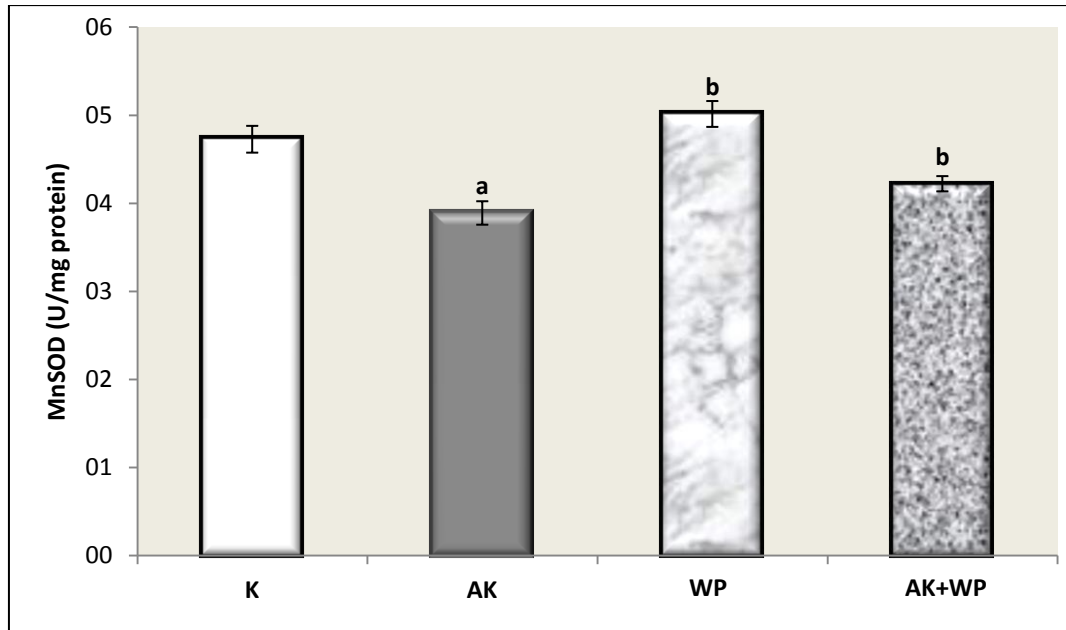
Çalışmamız sonucu deney gruplarından elde edilen verilerin değerlendirilmesinde “SPSS 20,0 for Windows” paket programı ile “OneWayAnnova-Tukey” testi kullanılmıştır. Bütün uygulanan testlerde güven aralığı % 95 olup,  $p < 0,05$  olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. AK ve Whey Proteinin Karaciğer Mitokondrial fraksiyonunda Enzimatik ve Enzimatik Olmayan Oksidatif Stres Parametreleri Üzerine Etkisi

#### 4.1.1. Mn-Süperoksit dismutaz üzerine etkisi

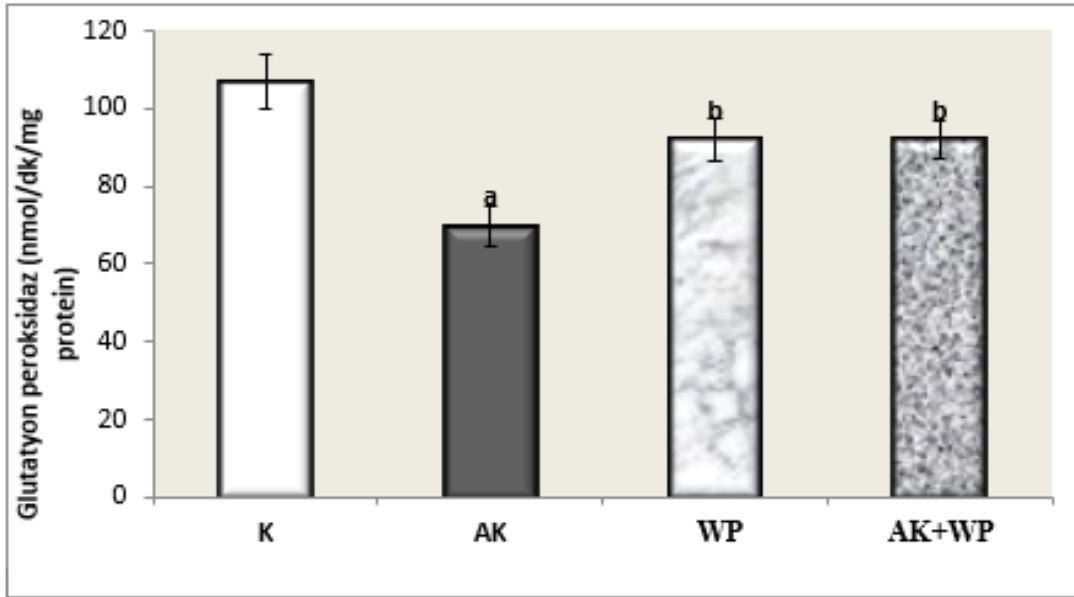
Şekil 4.1' de gösterildiği gibi, AK verilen grupta Mn-SOD kontrol grubu ile kıyaslandığında % 17,71 oranında azalma göstermiştir ( $p < 0,05$ ). WP ve AK+WP gruplarında kontrol grubuna göre önemli farklar görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). AK verilen grupla kıyaslandığında WH ve AK+WP gruplarında sırası ile % 28,9 ve % 8,53 oranında istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlemlenmiştir ( $p < 0,05$ ) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Grupların karaciğerde Mn-SOD aktivitesi

#### 4.1.2. GPx üzerine etkisi

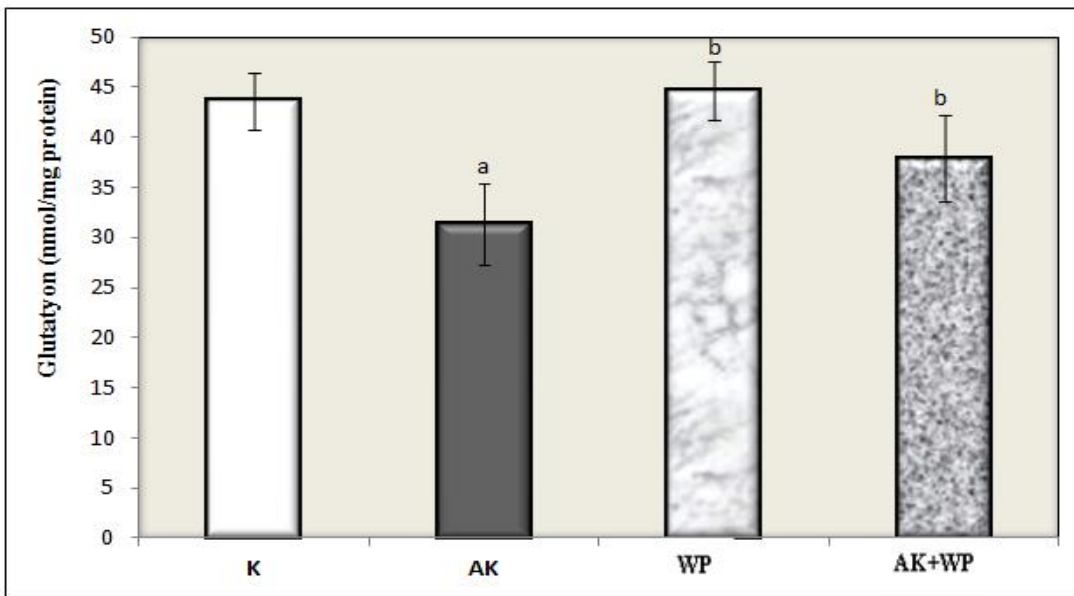
Önemli bir mitokondriyal enzimatik antioksidan olan GPx' da da AK etkisi ile MnSOD gibi % 32,84 oranında azalma görülmüştür ( $p < 0,05$ ). WP ve AK+WP gruplarında kontrol grubuna göre önemli farklar görülmezken ( $p > 0,05$ ), AK verilen grupla kıyaslandığında WH ve AK+WP gruplarında sırası ile % 32,27 ve % 22,54 oranında istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlemlenmiştir ( $p < 0,05$ ) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Grupların karaciğerde GPx aktivitesi

#### 4.1.3. Redükte glutatyon üzerine etkisi

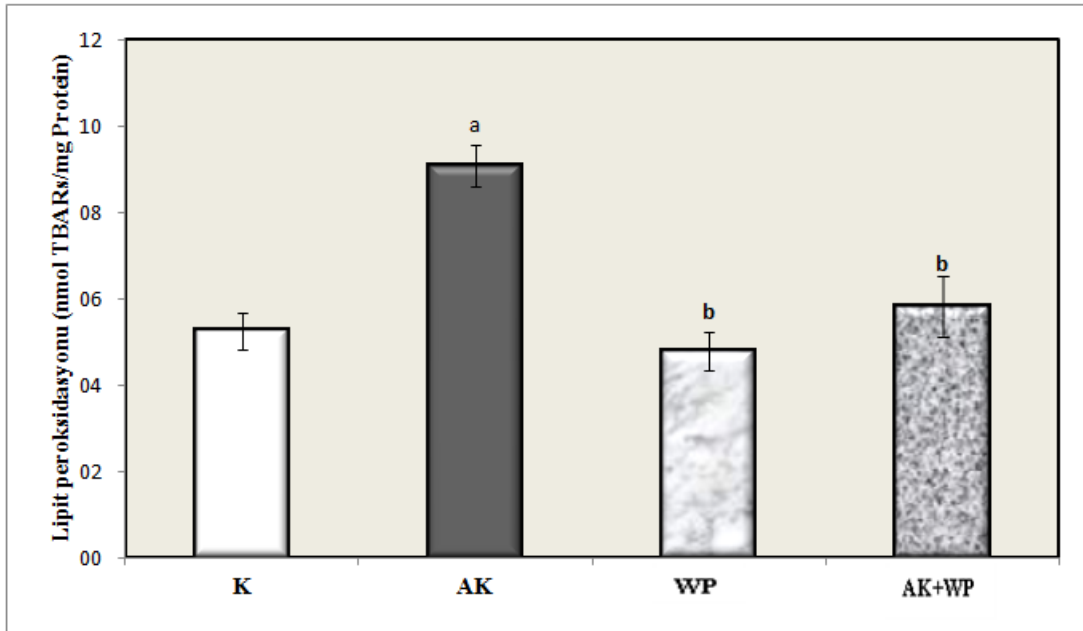
Önemli bir non-enzimatik antioksidan olan GSH, AK etkisi ile % 28,14' lük istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür ( $p < 0,05$ ). Karaciğer GSH miktarında WP ve AK+WP gruplarında kontrol grubuna göre önemli farklar görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). AK verilen grupla kıyaslandığında WP ve AK+WP gruplarında sırası ile % 42,38 ve % 20,65 oranında istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlemlenmiştir ( $p < 0,05$ ) (Şekil4.3).



Şekil 4.3. Grupların karaciğerde GSH miktarları

#### 4.1.4. Lipit peroksidasyonu üzerine etkisi

Serbest radikal hasarının en önemli belirteçlerinden biri olan lipit peroksidasyon seviyesi AK verilen grupta % 72,81 oranında artmıştır ( $p<0,05$ ). Bu durum verilen dozlarda AK' in karaciğerde önemli bir oksidatif stres hasarına neden olduğunu göstermektedir. Karaciğer LPO miktarında WP ve AK+WP gruplarında kontrol grubuna göre önemli farklar görülmemiştir ( $p>0,05$ ). AK verilen grupla kıyaslandığında AK+WP grubunda % 35,97 oranında istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlenmiştir ( $p<0,05$ ). Kontrol grubu ile AK+WP verilen grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ), bu durum AK ile birlikte WP verilmesi AK ile oluşan LPO hasarını önemli ölçüde azalttığını göstermektedir (Şekil 4.4).

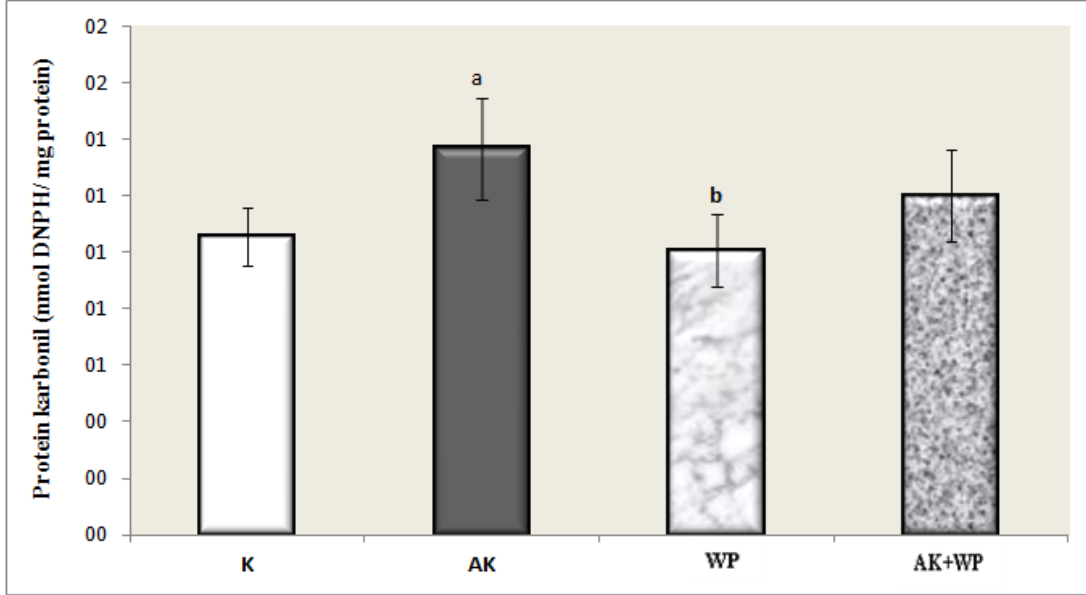


Şekil 4.4. Grupların karaciğerde LPO miktarları

#### 4.1.5. Protein karbonil miktarı üzerine etkisi

AK etkisi ile LPO miktarında olduğu gibi PK miktarında da anlamlı artış görülmüştür. AK verilen grupla kontrol grubu kıyaslandığında % 29,52 lik anlamlı artış görülmüştür ( $p<0,05$ ). Bu değer AK etkisi ile artan LPO değeri kadar fazla olmasa bile istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0,05$ ). Karaciğer PK miktarında WP ve AK+WP gruplarında kontrol grubuna göre önemli farklar görülmemiştir ( $p>0,05$ ). AK verilen grupla kıyaslandığında AK+WP grubunda % 12,5 oranında istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlenmiştir

( $p < 0,05$ ). AK' le birlikte WP verilmesi AK ile oluşan PK hasarını önemli ölçüde azaltmıştır (Şekil 4.5).

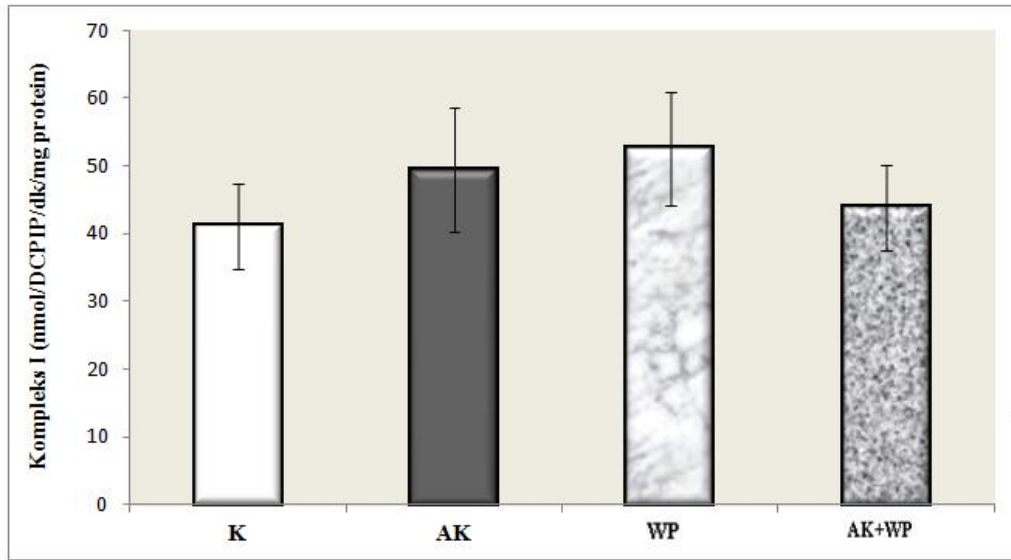


Şekil 4.5. Grupların karaciğerde PK miktarları

## 4.2. AK ve Whey Proteinin Karaciğer Mitokondrial Oksidatif Fosforilasyon ve Trikarboksilik Asit Döngüsü Enzimleri ve ATP Üzerindeki Etkileri

### 4.2.1. Kompleks I üzerine etkisi

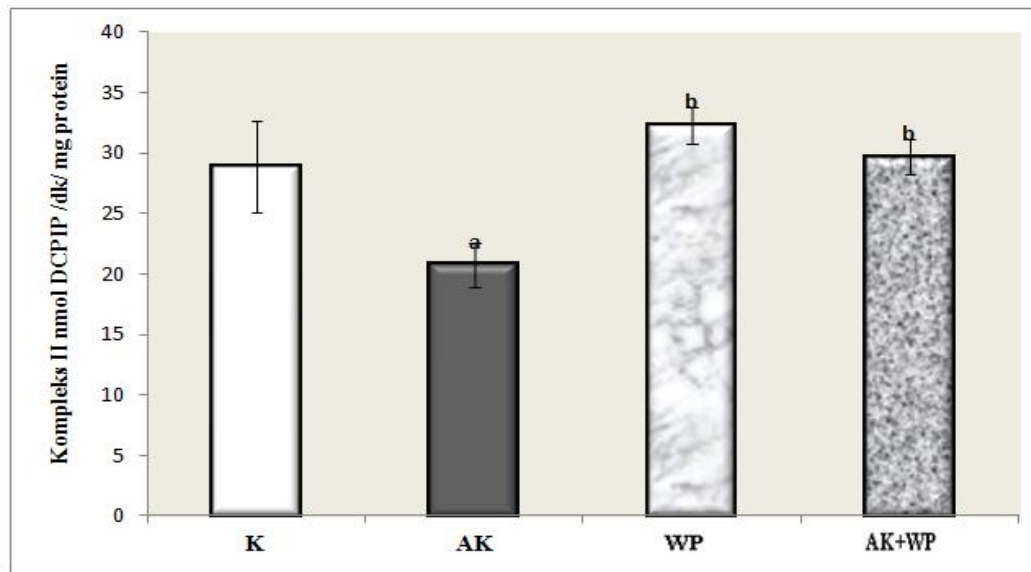
AK verilen grupla kontrol grubu kıyaslandığında AK verilen grupta Kompleks I aktivitesinde % 20,43 lük artış görülmesine rağmen bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ( $p > 0,05$ ). Karaciğer Kompleks I aktivitesinde WP ve AK+WP gruplarında kontrol grubuna göre önemli farklar görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). AK verilen grupla kıyaslandığında WP grubunda % 6,35' lük artış ve AK+WP grubunda % 11,13' lük azalma görülmüştür. Fakat bu artış ve azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ). Kısaca özetlemek gerekirse AK etkisi ile kompleks I aktivitesinde artış meydana gelmiştir. AK ile birlikte WP proteinin verilmesi bu artışın normalize olmasına neden olmuştur (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Grupların karaciğerde kompleks I aktivitesi üzerindeki etkileri

#### 4.2.2. Kompleks II üzerine etkisi

AK verilen grupla kontrol grubu kıyaslandığında AK verilen grupta Kompleks II aktivitesinde % 38,28 lik istatikselsel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmiştir ( $p < 0,05$ ). Kompleks II aktivitesinde WP ve AK+WP gruplarında kontrol grubuna göre önemli farklar görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). AK verilen grupla kıyaslandığında WP ve AK+WP gruplarında sırası ile % 55,48 ve % 42,87 oranında istatikselsel olarak anlamlı artışlar gözlemlenmiştir ( $p < 0,05$ ). AK etkisi ile azalan kompleks II aktivitesi WP proteinle birlikte verildiğinde tamamen normale döndüğü görülmüştür (Şekil 4.7).

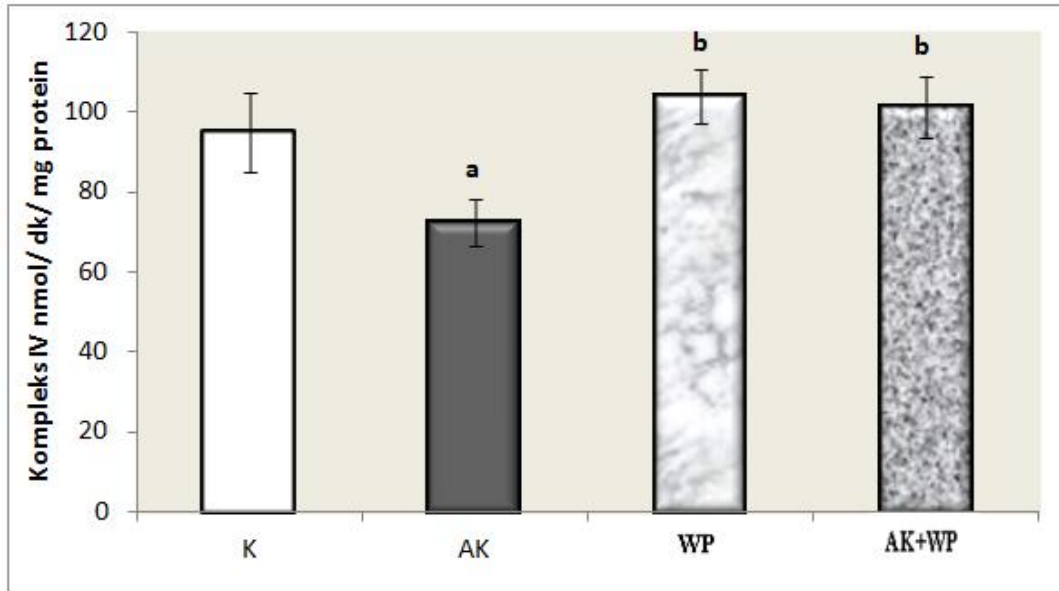


Şekil 4.7. Grupların karaciğerde kompleks II aktivitesi üzerindeki etkileri



### 4.2.3. Kompleks IV üzerine etkisi

Kompleks II aktivitesinde olduğu gibi Kompleks IV aktivitesinde de kontrol grubu ile kıyaslandığında AK etkisi ile istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,05$ ) azalma olduğu (% 23,82) görülmüştür. Kompleks IV aktivitesinde WP ve AK+WP gruplarında kontrol grubuna göre önemli farklar görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). AK verilen grupla kıyaslandığında WP ve AK+WP gruplarında sırası ile % 43,95 ve % 39,84 oranında istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlemlenmiştir ( $p < 0,05$ ). Kompleks II aktivitesinde olduğu gibi kompleks IV aktivitesinde de AK etkisi ile kompleks IV aktivitesinde görülen azalma WP proteinle birlikte verildiğinde ortadan kalkmış ve normale dönmüştür (Şekil 4.8).

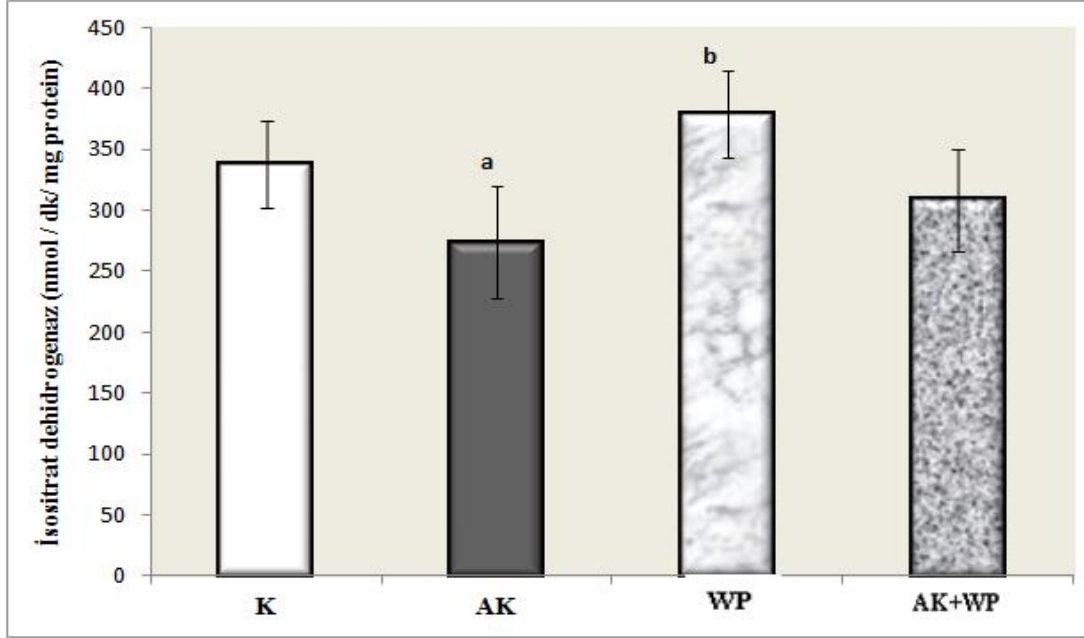


Şekil 4.8. Grupların karaciğerde kompleks IV aktivitesi üzerindeki etkileri

### 4.2.4. İzositrat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkisi

Trikarboksilik asit döngüsünün ilk dehidrogenaz enzimi olan izositrat dehidrogenaz aktivitesinde AK etkisi ile % 18,95' lik istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür ( $p < 0,05$ ). WP ve AK+WP gruplarında izositrat dehidrogenaz aktivitesinde kontrol grubuna göre önemli farklar görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). AK verilen grupla kıyaslandığında WP ve AK+WP gruplarında sırası ile anlamlı % 38,59 ( $p < 0,05$ ) ve istatistiksel olarak anlamlı olmayan ( $p > 0,05$ ) % 12,86 oranında artışlar gözlemlenmiştir. Kısaca AK etkisi ile izositrat

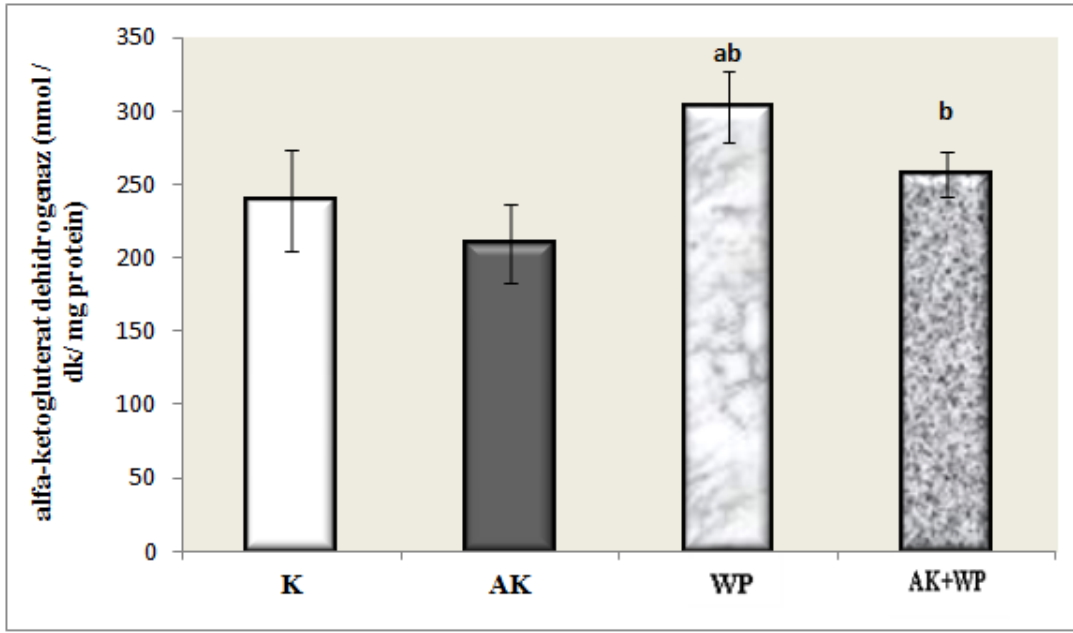
dehidrogenaz aktivitesinde görülen azalma WP ile birlikte verildiğinde ortadan kalkmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Grupların karaciğerde izositrat dehidrogenaz aktivitesi üzerindeki etkileri

#### 4.2.5. Alfa ketoglutarat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkisi

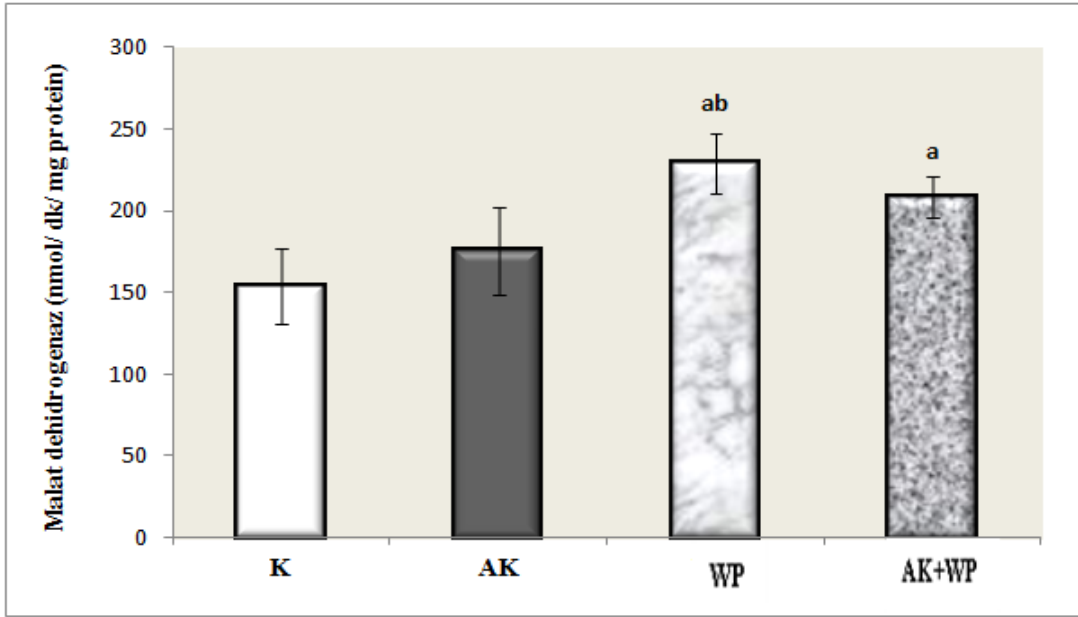
Alfa ketoglutarat dehidrogenaz aktivitesinde AK etkisi ile % 12,37 oranında azalma görülse de bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ( $p>0,05$ ). Diğer çalışılan parametrelerden farklı olarak burada WP proteinin tek başına verilmesi kontrol grubuna göre alfa ketoglutarat dehidrogenaz aktivitesinde anlamlı olarak % 26,55' lik artışa neden olmuştur ( $p<0,05$ ). WP grubu ile AK' in tek başına verildiği grup kıyaslandığında yine WP grubunda anlamlı bir aktivite artışı görülmüştür ( $p<0,05$ ). AK verilen grupla kıyaslandığında AK+WP grubunda % 22,37 oranında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlenmiştir ( $p<0,05$ ). Kontrol grubu ile AK+WP grubu arasında anlamlı fark bulunmamıştır; bu nedenle WP, AK etkisi ile baskılanan alfa ketoglutarat dehidrogenaz aktivitesinin tekrar normale dönmesine neden olmuştur (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Grupların karaciğerde alfa ketoglutarat dehidrogenaz aktivitesi üzerindeki etkileri

#### 4.2.6. Malat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkisi

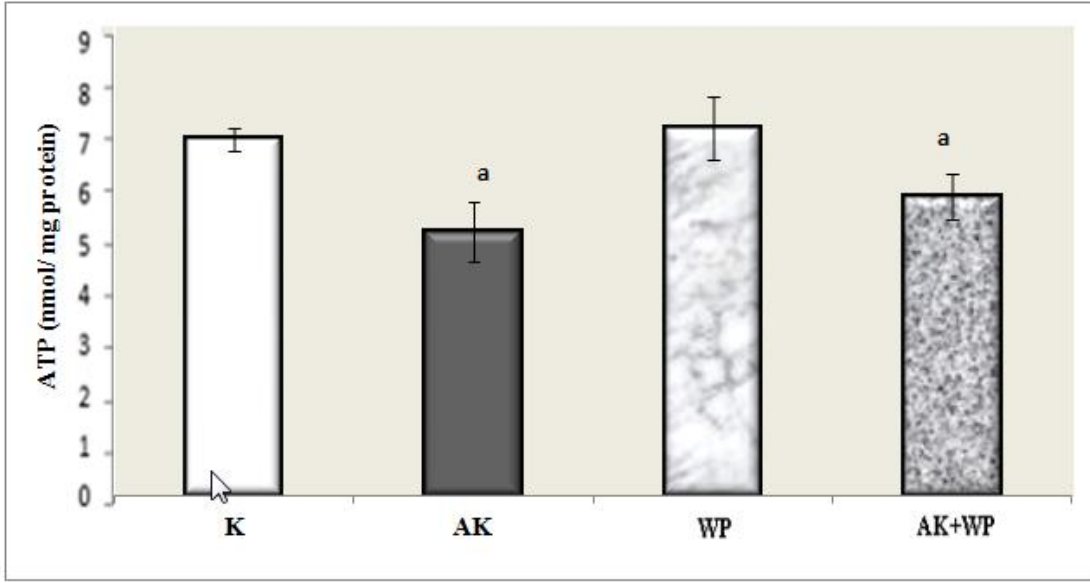
Malat dehidrogenaz aktivitesinde izositrat dehidrogenaz aktivitesinde olduğu AK etkisi ile % 14 oranında azalma görülse de bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ( $p>0,05$ ). Malat dehidrogenaz aktivitesinde de diğer çalışılan parametrelerden farklı olarak WP proteinin tek başına verilmesi kontrol grubuna göre malat dehidrogenaz aktivitesinde anlamlı olarak % 48,78' lik artışa neden olmuştur ( $p<0,05$ ). WP grubu ile AK' in tek başına verildiği grup kıyaslandığında yine WP grubunda anlamlı bir aktivite artışı görülmüştür ( $p<0,05$ ). AK verilen grupla kıyaslandığında AK+WP grubunda sırası ile % 18,86 oranında istatistiksel olarak anlamlı olmayan artış gözlemlenmiştir ( $p>0,05$ ). Öte yandan kontrol grubu ile kıyaslandığında AK+WP grubunda malat dehidrogenaz aktivitesinde % 35,59 oranında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlenmiştir ( $p<0,05$ ). AK ile birlikte WP verilmesi malat dehidrogenaz aktivitesini normalin üstüne çıkarmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Grupların karaciğerde malat dehidrogenaz aktivitesi üzerindeki etkileri

#### 4.2.7. Karaciğer ATP miktarı üzerine etkisi

AK etkisi ile bir çok oksidatif fosforilasyon ve dehidrogenaz aktivitesinde olduğu gibi ATP miktarının azalmasına da neden olmuştur. Kontrol grubu ile kıyaslandığında bu azalmanın % 25,95 oranında anlamlı bir azalma olduğu görülmektedir ( $p < 0,05$ ). WP tek başına verilmesi her ne kadar hem kontrol hem de AK grubuna göre ATP miktarında belirgin bir artışa neden olsa da bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ). AK+WP grubu AK ile kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunamazken ( $p > 0,05$ ) kontrol grubu ile kıyaslandığında % 16,27 oranında anlamlı bir azalma olduğu görülmektedir ( $p < 0,05$ ). Özetle söylemek gerekirse daha önce değerlendirdiğimiz parametrelerin aksine AK ile birlikte WP' in verilmesi AK'in neden olduğu ATP miktarındaki azalmayı tam olarak ortadan kaldırmaya yetmemiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Grupların karaciğerde ATP miktarı üzerindeki etkileri

## 5. TARTIŞMA

Geçtiğimiz 10 yıldır, çok çeşitli dejeneratif hastalıklar, yaşlanma ve kanser mitokondride meydana gelen bozukluklar ile ilişkilendirilmektedir (Wallace, 1999). Çeşitli nedenlerle ortaya çıkan karaciğer yağlanması ve buna bağlı olarak gelişen metabolik sendromun patogeneğinde karaciğer mitokondrilerinde meydana gelen oksidatif stres önemli rol oynamaktadır (Vendemiale ve diğerleri, 2001).

Çalışmamızda AK ile karaciğer mitokondriyal antioksidan enzimler MnSOD ve GPx' in baskılandığı görülmüştür. Buna karşın mitokondriyal GSH miktarında azalma meydana gelirken mitokondriyal lipid hasarını gösteren LPO miktarı ve protein hasarını gösteren PK miktarının arttığını gördük. Bütün bu sonuçlar bize AK etkisi ile karaciğer mitokondrilerinin belirgin bir şekilde oksidatif hasara neden olduğunu göstermektedir. Hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalar göstermektedirki AK toksitesinin esas nedenin ROT oluşturması yani oksidatif strese neden olmasıdır (Moghe ve diğerleri, 2015).

AK ayrıca hüresel nükleofilik grupları tetikleyerek, özellikle GSH gibi hüresel tiyoller ile hızlı bir şekilde reaksiyona girerek oksidatif stresin bir başlatıcısı olabilir (Biswal, Acquah-Mensah, Datta, Wu ve Kehrer, 2002). Daha önce yapılan çalışmalar AK hepatoksitesinin esas mekanizmasının GSH miktarındaki baskılanma ile ilgili olduğunu ortaya koymuşlardır (Comporti, 1989).

Çalışmamızda AK etkisi ile mitokondriyal GSH seviyesindeki azalma mitokondrideki ROT' nin artmasına dolayısı ile mitokondriyal LPO ve PK miktarının artmasına neden olmuştur. Literatürde AK' in çeşitli dokularda oksidatif stres oluşturduğuna ilişkin deneysel hayvan çalışmaları bulunmaktadır. Yapılan bir *in vivo* çalışmada, kırk beş gün boyunca AK' e maruz kalan rat karaciğerinde mitokondriyal fonksiyonları bozulduğu ve hepatoksitesinin ortaya çıktığı görülmüştür (Arumugam ve diğerleri, 1999).

Benzer şekilde *in vitro* izole karaciğer hücre mitokondrilerinde de AK' in oksidatif strese neden olduğu izlenmiştir (Sun ve diğerleri, 2006). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda AK' in primer insan hepatositlerinde ve hepatoma hücrelerinde GSH tükenmesine bağlı oksidatif stres meydana geldiği, mitokondriyal fonksiyonların bozulduğu, endoplazmik

retikulum yolağı da dahil olmak üzere farklı farklı ölüm yolları ile karaciğer hücrelerinde hasara neden olduğu görülmüştür (Mohammad ve diğerleri, 2012).

Deneysel hayvan modellerinde antioksidan maddelerin mitokondri hasarı ile ortaya çıkan karaciğer hastalıklarında etkili oldukları, oksidatif stresi azaltarak özellikle karaciğer yağlanmasını önledikleri görülmüştür. Artan mitokondrial antioksidanların (mitokondrial GSH, Mn-SOD ve GPx) ROT üretimini azalttığı ve mtDNA kopya sayılarının arttığı bildirilmektedir (Geng ve diğerleri, 2017).

Çalışmamızda da karaciğer mitokondrisinde AK etkisi ile baskılanan antioksidan enzimler Mn-SOD, GPx ve GSH miktarının WP ile birlikte verildiğinde arttığını ve buna karşın AK ile artan LPO ve PK miktarlarının ise azaldığını gözlemledik. Bu durum bize karaciğer mitokondrilerinde AK ile artan oksidatif stresin WP ile ortadan kalktığını göstermektedir. WP' nin antioksidan özellikleri olduğunu gösteren bir çok *in vivo* çalışma bizim bulgularımızı desteklemektedir.

Toplam esansiyel amino asitlerin ve dallanmış zincirli amino asitlerin içeriğı, peynir altı suyu proteininde çoğı diyet proteininden daha üstündür (Helaine, Valdemiro, Dias, Borges ve Tanikava, 2001). Whey proteinler kükürt içeren amino asitler sistein ve metiyonin bakımından zengindir. Bu amino asitler çok önemli intrasellüler bir antioksidan olan GSH sentezini artırır (Marshall,2004).

GSH, glisin, glutamat ve sisteinden oluşur. Sistein, oksidasyon ve doku hasarını önlemede aktif bir indirgeyici ajan olarak görev yapan bir tiyol (sülhidril) grubu içerir. Bir antioksidan olarak, GSH ancak redükte formda etkilidir ve GSH nin redükte forma dönüşmesinde GPx işlev görür. GPx, lipit peroksidleri daha az zararlı hidroksi asitlere dönüştürebilen endojen bir antioksidan enzimdir. Whey protein hücrel antioksidan düzeylerini artırdığı için aynı zamanda yaşlanma karşıtı anti-ageing bir madde olarak da bilinmektedir (Bounons, Gervais, Amer, Batist ve Gold, 1989).

Çalışmamızda AK etkisi ile azalan GSH ve GPx enzimlerinin WP etkisi ile normale dönmesi bu nedenledir. Benzer şekilde etoposid kemoterapisi uygulanan ratlarda 100 mg/kg olarak verilen WP' in beyinde kemoterapi ile azalan GSH seviyesini normale

dönüştürdüğünü ve dokunun total antioksidan statusunu artırdığı rapor edilmiştir (Chranthi, R., Gayathri ve Jalajakshi, 2019).

Ratlara (300mg/kg 28 gün) WP rat eritrositlerinde yaşlanmaya bağlı olarak gelişen oksidatif hasarları ortadan kaldırdığı görülmüştür (Geetika ve diğerleri, 2018; Garg, Singh, Sing ve Rizvi, 2018). Konsantre WP' nin (WPC-80) (500 mg/kg,21 gün) rat karaciğerinde glukokonjugat metabolizmasını etkilediği, GSH miktarını artırdığı ve lipit peroksidasyonunu önlediği görülmüştür (Zebrowska-Gamdzyk ve diğerleri, 2018).

Dişi, farelere verilen (4 ve 8 mg/kg 4 gün) WP' nin karaciğerde parasetamol ile indüklenen karaciğer hasarını azalttığı KAT, SOD ve GPx gibi antioksidan enzim düzeylerini ve AST, ALT gibi karaciğer fonksiyon testlerini iyileştirdiği görülmüştür (Athira, Mann, Sharma ve Kumar, 2013).

Çalışmamızda karaciğer mitokondrilerinde AK ile birlikte artan lipit peroksidasyonunun WP verilmesi ile normale döndüğü görülmektedir. Benzer şekilde, ratlarda karbon tetraklorür ile indüklenen karaciğer hasarınının WP /100 mg/kg, 30 day, (i.p) etkisi ile büyük oranda ortadan kalktığı ve karbon tetraklorür ile indüklenen lipit peroksidasyonunun normale döndüğü görülmüştür. Ayrıca WP' in DPPH radikal süpürücü aktivitesine bakılmış ve lipit peroksidasyonunu önleyici etkisinin buradan kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Gad ve diğerleri, 2011).

Ratlarda 28 gün boyunca verilen (1 g/kg) WP kan, karaciğer beyin gibi dokularda GSH ve antioksidan enzim miktarını artırarak buna karşın hidrojen peroksit, lipit peroksidasyonu ve protein karbonil miktarını azaltarak bir antioksidan gibi davrandığı görülmüştür (Kerasioti ve diğerleri, 2018)

Bu çalışmanın bir parçası olarak daha önce yayınladığımız bir çalışmada AK' in rat polimorfo nükleer lökositlerinde, dalakta ve timusta LPO ve PK miktarını artırırken GSH miktarını düşürdüğünü ve WP ile birlikte verildiğinde bu parametrelerin normale döndüğü görülmüştür (Aydin, Z. Şekeroğlu ve V. Şekeroğlu , 2018 a).

WP sadece sitozolik oksidatif streste değil aynı zamanda mitokondriyal oksidatif stresin önlenmesinde de etkili olduğu görülmüştür. AK verilen ratların kalp mitokondrilerinde



WP' nin GSH miktarını artırarak LPO ve PK miktarını azaltarak AK ile indüklenen mitokondriyal oksidatif stresi önlediği daha önceki çalışmalarımızda rapor edilmiştir (Aydin, Z. Şekeroğlu ve V. Şekeroğlu, 2018 b).

Mitokondrideki oksidatif metabolizma hücreler için gerekli enerjinin kaynağını oluştururlar. Özellikle oksidatif stresle ortaya çıkan mitokondriyal bozukluklar hücrede ATP üretiminin azalması bu durum ise hücre ölümü ve doku harabiyeti ile sonuçlanır (Vendemiale ve diğerleri, 2001).

Özellikle obezite ve tip 2 diyabet kaynaklı karaciğer yağlanmasının karaciğer mitokondrilerinde meydana gelen bozukluklar sonucu ortaya çıktığı bilinmektedir (Mantena, King, Andringa, Ecclestdon, ve Bailey, 2008).

Yağlı karaciğer hastalıklarının patogeneğinde mitokondrilerin oksidatif stres kaynaklı hasarlarının olduğu bir çok deneysel çalışma ile ortaya konmuştur. Alkolik olmayan karaciğer yağlanmasında karaciğer mitokondri solunum enzimlerinin baskılandığı görülmüştür (Perez-Carreras ve diğerleri, 2003).

Obez farelerde yapılan çalışmalar karaciğer mitokondrilerinde bioenerjetik bozukluklar olduğu; oksidatif fosforilasyon enzimlerinin baskılandığı ve ATP seviyesinin düştüğü görülmüştür (Chavin ve diğerleri, 1999).

Çalışmamızda AK verilen hayvanlarda karaciğer antioksidan enzimler ve GSH miktarındaki azalma ile birlikte LPO ve PK miktarlarının azalması mitokondriyal kompleks (I-IV) enzimlerinde ve TCA enzimlerinde azalmaya neden olmuştur. Hücrenin antioksidan kapasitesini aşan aşırı ROT üretimi, oksidatif strese neden olur ve apoptosise yol açan lipitler, proteinler ve nükleik asitler (özellikle mtDNA) gibi hücre bileşenlerine zarar verebilir (Boveris and Chance, 1970; Nassir and Ibdah, 2014).

AK' in mitokondri fonksiyonları üzerine olan inhibe edici etkileri, inhibitör etkileri uzun yıllardan beri bilinmektedir (Zollner, 1973). AK'in insan akciğer epitelyal hücreleri ve fibroblastlarında mtDNA hasarına neden olduğu ve mtDNA kopya sayısını azalttığı görülmüştür. Aynı zamanda mitokondriyal membran potansiyelini, ATP miktarını azalttığı ve mitokondriyal solunumu baskıladığı görülmüştür (Wang ve diğerleri, 2017).

AK' nin insan retinal pigment hücrelerinde (ARPE-19) oksidatif stres oluşturarak protein ve DNA ya hasar verdiği mitokondriyal kompleks (kompleksI-IV) aktivitesinde ve mitokondriyal membran potansiyelinde azalmaya neden olduğu görülmüştür (Feng ve diğerleri, 2010). Bu sonuçlar bizim bulgularımızla paralellik göstermesi bakımından önemlidir.

AK etkisi ile *in vitro* karaciğer mitokondrilerinde solunum enzimlerinin (kompleks I-V) baskılandığı görülmüştür. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da gözlemlediğimiz gibi AK aynı zamanda NADH oluşturan TCA döngüsü enzimlerinin yani alfa ketoglutarat dehidrogenaz, malat dehidrogenaz gibi baskılandığını rapor etmişlerdir (Sun ve diğerleri, 2006).

Memelilerde ISD' ın değişik formları bulunmaktadır. Biz çalışmamızda mitokondriyal NADP<sup>+</sup> 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, AK etkisi ile ISD aktivitesinin baskılandığını gözlemledik. Bu durum göz önüne alındığında AK etkisi ile karaciğer mitokondrisindeki GSH miktarının düşmesi beklenen bir sonuçtu. ISD enzimindeki sistein residülerinin enzimin katalitik fonksiyonunda önemli rol oynadıkları ve bu sistein residülerinin NO, peroksinitrit, membran lipid peroksidasyon ürünü 4-hidroksinonenal, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, diamid ve ağır metaller tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (Lee, Yang ve Park, 2003).

AK ile birlikte WP verildiğinde, AK tarafından baskılanan ISD enziminin normale döndüğü görülmektedir. Bu durum WP' nin bu enzimin muhtemel inhibitörleri olan membran lipid peroksidasyon ürünü 4-hidroksinonenal ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' in oluşumunun engellenmesi ile açıklanabilir. Diğer bir ifade ile mitokondriyal GPx gibi antioksidan enzimleri ya da GSH seviyesini artırarak bu enzim aktivitesinde artışa neden olmuş olabilir. Ya da diğer açıdan bakarsak mISD enzimi AK tarafından baskılandığı için mitokondriyal oksidatif stres ortaya çıkmıştır. Nitekim, mitokondriyal ISD enzimi nakavt olan deney hayvanlarında oksidatif stresin arttığı görülmüştür (Han, Choi, Kim ve Park, 2017). Benzer şekilde düşük NADPH seviyesi ile artan oksidatif stres arasında da pozitif korelasyon olduğu görülmüştür (Jo ve diğerleri, 2001).

Sonuç olarak baskılanan mISD enzimi mitokondri içerisinde daha az NADPH meydana gelmesi demektir. Azalan NADPH ise ROT ile mitokondrideki GSSG/GSH oranındaki artışın düzeltilemeyeceği anlamına gelir. Çünkü okside GSSG' nin redükte GSH haline gelmesini sağlayan faktör ortamdaki NADPH' dır.

Çalışmamızda AK' in  $\alpha$ -KGD aktivitesini de inhibe ettiği görülmektedir.  $\alpha$ -KGD, NADH oluşumunda görev alan çok önemli bir TCA döngüsü enzimidir ve aktivitesi ATP / ADP oranı, NADH / NAD<sup>+</sup> oranı, kalsiyum ve substrat varlığı ile düzenlenir. Bu enzimde ISD enziminde olduğu gibi oksidanlara karşı duyarlıdır ve oksidatif stresle inhibe olur (Tretterand ve Adam-Vizi, 2005). Mitokontriyal oksidatif stresin artması bu enziminde inhibisyonuna neden olur. Çalışmamızda AK tarafından baskılanmış bu enzimlerin WP ile ortadan kaldırılmasını mitokondriyal oksidatif stresin WP tarafından ortadan kaldırılması ile ilişkili olabileceğini düşünüyoruz.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bütüncül bir yaklaşımla bakıldığında AK etkisi ile solunum enzimleri ve NADH üreten enzimlerin baskılanması sonucu ATP seviyesinin de düştüğünü görüyoruz. Birbirleriyle son derece ilişkili olan bioenergetik sistemde kısaca AK karaciğer mitokondrilerinde oksidatif strese neden olmuştur. Bu oksidatif stres özellikle mitokondri proteinlerinin hasarına yani bioenergetik sistemde rol oynayan solunum enzimleri ve NADH üreten TCA döngüsü enzimlerinin inhibisyonuna neden olmuştur. Bioenergetik döngünün son çıktısı olan ATP de bütün bu nedenlere bağlı olarak AK etkisi ile belirgin bir şekilde düşmüştür. Yukarıda hücrel antioksidan GSH seviyesini artırdığı ve antioksidan özellikleri olan WP ile bu bioenergetik baskılanmanın büyük ölçüde ortadan kalktığını görüyoruz.

Çalışmamızda önemli bir çevresel toksin olduğu gibi aynı zamanda lipit peroksidasyonunun bir ürünü olması ile de aynı zamanda önemli bir endojen toksin olan AK' in rat karaciğer mitokondrileri üzerine olan etkisini inceledik. Aynı zamanda artan obezite ile birlikte zayıflama maddelerine olan taleplerin hızla arttığı görülmektedir. Peyniraltı suyu proteini olan WP antioksidan özellik göstererek AK ile indüklenen mitokondriyal oksidatif stresi ortadan kaldırdığı ve mitokondriyal bioenergetik sistem üzerinde iyileştirici özelliği olduğunu ortaya koyduk.

Özellikle son on yılda gerek çevresel toksinlere maruziyetin artması gerekse yaşam şekli değişikliklerine (hareketsizlik, endüstriyel beslenme ve obezite) bağlı olarak karaciğer yağlanmasının toplumda hızla arttığını göstermektedir. Yapılan çalışmalar yukarıda da belirttiğimiz gibi karaciğer yağlanmasının en önemli nedeninin (aynı zamanda sonucunun) mitokondriyal fonksiyonlarındaki bozulma olarak ortaya koymaktadırlar. Bu açıdan bakıldığında çalışmamızda değerlendirdiğimiz parametrelerin karaciğerle ilgili metabolik hastalıkların patogenezinde çok önemli rol oynayacağını düşünüyoruz. İlk kez AK' in ve WP' nin karaciğer üzerindeki etkileri hücrel düzeyde değerlendirildi ve olası karaciğer hastalıkları ile ilişkilendirildi. Sağlıklı karaciğer için mitokondriyal toksin olan AK' den korunmalı ve beslenmede mitokondriyal antioksidanların alınımı artırılmalıdır.

## KAYNAKLAR

- Acar, Ö. (2015). *Sıçanlarda Siklofosfamid Nedenli Hepatotoksisitede Oksidatif Stres ve Karaciğer Hasarına Karşı Selenyumun Koruyucu Etkisi* (Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi) Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Ahmed, R. F., Eldenshary, E. E. S., Nada, S. A., Assad, G. F., Arafa, N. M. S. and Farid, O. A. H. A. (2011). Pharmacological Study of the Possible Antidepressant Activity of Whey Protein Isolate in Mice. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5, (12), 649-2659.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2005). *Division of Toxicology and Environmental Medicine*, 107-02-08.
- Aksu, İ. Y. (2006). *Egzersizin Sıçan Beyninde Oksidan-Antioksidan Denge Üzerine Etkilerinin Araştırılması*. (Yayınlanmamış Doktora Tezi) Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Akkuş, İ. (1995). Serbest Radikaller. *Serbest Radikaller ve Fizyoterapik Etkileri*. Mimoza Basım, Konya, 4- 113.
- Antioxidant Activity and Hepatoprotective Effects of Whey Protein and Spirulina in Rats. *Nutrition*. (2011). 27, (5), 582-9.
- Arumugam, N., J. Thanislass, K. Raganath, S., Devaraj, N. and Devaraj, H. (1999). Acrolein-induced Toxicity-Defective Mitochondrial Function as a Possible Mechanism. *Environmental Contamination and Toxicology*, 36, 4, 373-6.
- Ashok, B. T. and Ali, R. (1999). The Aging Paradox: Free Radical Theory of Aging. Department of Biochemistry, Medical Collage, Aligarh Muslim Universty, 34, 3, 293-303.
- Athira, S. Mann, B. Sharma, R. and Kumar, R. (2013). Ameliorative Potential of Whey Protein Hydrolysate Against Paracetamol Induced Oxidative Stress. *Jornal of Dairy Science*. 96, (3), 1431-1437.
- Aydin, B., Şekeroğlu, Z. ve Şekeroğlu, V. (2018 a). Acrolein Induced Oxidative Stress and Genotoxicity in Rats: Protective Effects of Whey Protein and Conjugated Linoleic Acid. *Drug and Chemical Toxicology*, 41, 2, 225-231.
- Aydin, B., Şekeroğlu, Z. ve Şekeroğlu, V. (2018 b). Effects of Whey Protein and Conjugated Lineoleic Acid on Acrolein-Induced Cardiac Oxidative Stress. Mitochondrial Dysfunction and Dyslipidemia in Rats. *Biomedicine ve Pharmacotherapy*, 107, 901- 907.
- Bayford, C. (2010). Whey Protein: A Functional Food. *The Nutrition Practitioner*, Nutritional Therapy.

- Başak, M. ve Akan, D. (2015). Karaciğerin ve Safra Yollarının Radyolojik Anatomisi. Türk Radyoloji Derneği, *Türk Radyoloji Seminerleri*, 3, 336-48.
- Beckman, J. S. and Koppenol, W. H. (1996). Nitric Oxide, Superoxide, and Peroxynitrite: The Good, The Bad and Ugly. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 271, 1424-1437.
- Biswal, S., Acquaoh-Mensah, G., Datta, K., Wu, X. and Kehrer, J. P. (2002). Inhibition of Cell Proliferation and AP-1 Activity Acrolein in Human A549 Lung Adeno Carcinoma Cells Due to Thiol İmbalance and Covalent Modifications. *Chemical Research in Toxicology*, 15, 180-186.
- Blumenthal, R. D., Lew, W., Reising, A., Soyne, D., Osorio, L., Ying, Z., Goldenberg, D. M. (2000). Antioxidant Vitamins Reduce Normal Tissue Toxicity İnduced by Radio immuno therapy. *International Journal of Cancer*, 86, (2), 276-280.
- Boveris, A. and Chance, B. (1973). The Mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide. General Properties and Effect of Hyperbaric Oxygen. *Biochemical Journal*, 134, 707-16.
- Bounons, G., Gervais, F., Amer, V., Batist, G. and Gold, P. (1989). The İnfluence of Dietary Whey Protein on Tissue Glutathione and the Diseases of Aging. *Clinical and Investigative Medicine*, 12. 6-343-349, Printed in Canada.
- Burtis, C. A. and Ashwood E. R. (2005). *Klinik Kimyada Temel İlkeler*. (Çevirmen D. Aslan). Ankara: Palme yayıncılık, 352-356 , 747-756.
- Cardozo-Pelaez, F., Brooks, P. J., Stedeford, T., Song, S. and Sanchez- Ramos, J. (2000). DNA Damage Repair and Antioxidant Systems in Brain Regions: Acorrelative Study. *Free Radical Biology and Medicine*, 28, 779-785.
- Castellani R., Hirai K., Aliev G., Drew K. L., Nunomura A., Takeda A., Cash A. D., Obrenovich M. E., Perry G. and Smith M. A. (2002). Role of Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience Research*, 70, 357-360.
- Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J. E., Diehl, A.M., Brunt, E. M., Cusi, K., Charlton, M. and Sanyal, A. J. (2012). The Diagnosis and Management of Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guideline by the American Association for the Studyof LiverDiseases. *American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. Hepatology*, 55, 2005-2023.
- Chavin, K. D., Yang, S., Lin, H. Z., Chatham, J., Chacko, V. P., Hoek, J. B., Walajtys-Rode, E., Rashid, A., Chen, C.H., Huang, C. C., Wu, T. C., Lane, M. D. and Diehl, A. M. (1999). Obesity İnduces Expression of Uncoupling Protein-2 in Hepatocytes and Promotes Liver ATP Depletion. *Journal of Biological Chemmistry*, 274, 5692-5700.

- Chranthi, R., Gayathri, M. and Jalajakshi P.R. (2019). Ameliorating Effect of Whey Preparation on Chemobrain Modulation  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPases and Oxidative Stress-In Chemotherapy Induced Rat Model for Brain Toxicity. *Journal Of Clinical and Diagnostic Research*, 13, 1, BC5-BC9.
- Comporti, M. (1989). Comporti Three Models of Free Radical-induced Cell Injury. *Chemical Biology Interactive*, 72, 1-56.
- Coşkun, A. (2011). Hücrenin Enerji Santrali Mitokondri, *Bilim ve Teknik Dergisi* Nisan.
- Cherubini, A., Ruggiero, C., Polidori, M. C. and Mecocci, C. (2005). Potential Markers of Oxidative Stress in Stroke. *Free Radical Biology and Medicine*, 39, 841-852.
- Crouch, P. J., Cimdins, K., Duce, J. A. Bush, A. I. and Trounce, I. A. (2007). Mitochondria in Aging and Alzheimer' s Disease. *Proceedings of the First Edmonton Aging Symposium*, 10, 3. Edmonton, Alberta, Canada.
- Çakatay, U. ve Kayalı, R. (2006). Serbest Radikal Biyokimyasının Tarihsel Süreçteki Gelişimi. *Cerrah Paşa Tıp Dergisi*, 37, 162-167.
- Dairy Council of California, (2013). Whey Protein Nutritional Powerhouse. *Dairy Council of California*, Healthy Eating Made Easy, California.
- Degli Esposti, D., Hamelin, J., Bosselut, N., Saffroy, R., Sebah, M., Pommier, A., Martel, C. and Lemoine, A. (2012). Mitochondrial Roles and Cytoprotection in Chronic Liver Injury, *Biochemistry Research International*, 2012, 387-626, 16.
- Dietrich, A., Achim, F., Mathias, H. Sylvia, J., Jörg, S., Takashi, O., Takahisa, S., Noboru, S. and Helmut, S. (2012). Acrolein and Methacrolein, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim: Wiley, 8, 19,2.
- Dilek, O.N., (2003). Serbest Radikaller ve Cerrahi. *Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Araştırma Derneği III.Ulusal Kongresi*. Afyon, 23-30 Mart 2003, 6.
- Dimke, D., Ventrella, M. and Wilcox, S. (2014). The Effects of Whey Supplementation and Natural Diet on Protein Synthesis and Muscle Hypertrophy.
- Ekmekci, Ö., Karasoy, H. ve Yüceyar, N. (2012). Mitokondriyal Bozukluğu Olan Hastalarda Klinik ve Histopatolojik İnceleme. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji, İzmir, Türkiye, *Journal of Neurological Sciences*, 810-818.
- El-Demerdash, F. M., Yousef, M. I., Kedwany, F. S. and Baghdadi, H. H., (2004). Cadmium-Induced Changes in Lipid Peroxidation, Blood Hematology, Biochemical Parameters and Semen Quality of Male Rats: Protective Role of Vitamin E and Beta-carotene. *Food Chemistry Toxicology*, 42, (10), 1563-71.
- Erdal, N., Altunkaynak, Y., Altunkaynak, E., Öztürk, M., Mutluay, B., Köksal, A. ve Baybaş, S., (2005). Hastalarda Oksidatif Stresin Göstergesi Olarak Lipid Peroksidasyonunun İncelenmesi. *Düşünen Adam*, 18, (3), 129-135.

- Ergül, A. A. (2003). Mitokondri. *Güncel Gastro Enteroloji* Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü, Ankara.
- Esterbauer, H. and Chessman, K. H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, 186, 407-21.
- Fatania, H., Nassar, K. E. and Sidhan, V. (1993). Purification And Partial Characterisation of NADP<sup>+</sup> Linked Isocitrate Dehydrogenase From Rat Liver Cytosol. *FEBS Letters*, 320, (1), 57-60.
- Fawcett, M. D., Don W. (1986). A Text Book of Histology, Eleventh Edition, Saunders Company, 535-542.
- Feng, Z., Liu, Z., Li, X., Jia, H., Sun, L., Tian, C., Jia, L. and Liu, J. (2010). Alpha-Tocopherol is an Effective Phaseli Enzyme İnducer: Protective Effects on Acrolein-İnduced Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 21, 12, 1222-1231.
- Flohe, L. and Gunzler, W. A. (1984). Assays of Glutathione Peroxidase. *Methods Enzymology*, 105, 114–121.
- Freeman, B. A. and Crapo, J. D. (1982). Biology of Disease: Free Radicals and Tissue İnjury. *Laboratory İnvestigation*, 47 (5), 412-26.
- Fernandez-Checa, J. C. and Kaplowitz N., (2005). Hepatic Mitochondrial Glutathione: Transport and Role İn Disease And Toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacolog*, 204, 263-273.
- Gad, A. S., Khadrawy, Y. A., El-Nekeety, A. A. , Mohamed, S. R., Hassan, N. S., Abdel-Wahhab, M. A. (2011). Antioxidant Activity and Hapato Protective Effects of Whey Protein and Spirulina in Rats Nutrition. *Basic Nutritional İnvestigation*, 27(5), 582-9.
- Garg, G., Singh, S. A., Sing, K. A. and Rizvi, S. I. (2018). Whey Protein Concentrate Supplementation Protects Erythrocyte Membrane From Aging-İnduced Alterations in Rats. *Journal of Food Biochemistry*, 42, 6.
- Gelpi, J. L., Dordal, A., Montserrat, J., Mazo, A. and Cortes, A. (1992). Kinetic Studies of the Regulation of Mitochondrial Malate Dehydrogenase by Citrate, *Biochemical Journal*, 283, (1), 289-97.
- Gelişgen, R., (2006). Elektron Transport Zinciri ve Oksidatif Fosforilasyon. İstanbul Üniversitesi (Slayt, Sunum), Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri.
- Geng, C., Xu, H., Zhang, Y., Gao, Y., Li, M., Liu, X., Gao, M., Wang, X., Liu, X., Fang, F. and Chang, Y. (2017). Retinoicaci Dameliornates High-Fatdiet-İnduced Liver Steatosis Through Sirt. *Science China Life Sciences*. 60, 1234-1241.
- Güngör, H. ve Türker P. F. Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı ve Tıbbi Beslenme. Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, *Güncel Gastroenteroloji*, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara, 20, 3.



- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (1986). Oxygen Free Radicals and Iron in Relation to Biology and Medicine: Some Problems and Concepts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 246- 501-514.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Fifth Edition.
- Hamad, E. M., Taha, S. H., Dawood, A. G. A, Sitohy, M. Z. and Hamid, A. H. (2011). Protective Effect of Whey Proteins Nonalcoholic Fatty Liver in Rats. *Lipids in Health and Disease*, 10, 57.
- Han, S. J., Choi, H. S., Kim, J. I. and Park, K. M., (2017). IDH<sub>2</sub> Deficiency Increases the Liver Susceptibility to is Chemiareperfusion Injury Via Increased Mitochondrial Oxidative Injury. *Redox Biology*, 14, 142–153.
- Hassanein, T. and Frederick, T. (2004). Mitochondrial Dysfunction in Liver Disease and Organ Transplantation. *Mitochondrion*, 4, (5-6), 609-20.
- Helaine, B. J., Valdemiro, C. S., Dias, N. F. G. P., Borges, P. and Tanikava, C. (2001). Impact of Different Dietary Protein on Ratgrowth, Blood Serum Lipids and Protein and Liver Cholesterol. *Nutrition Research*, 21, 905-915.
- Janssen, A. J., Trijbels, F. J., Sengers, R. C., Smeitink, J. A., Van den Hevel, L. P., Wintjes, L. T., Stoltenberg-Hogenkamp, B. J. and Rodenburg, R. J. (2007). Spectrophotometric Assay for Complex I of the Respiratory Chain in Tissue Samples and Cultured Fibroblasts. *Clinical Chemistry*, 53, (4), 729-34.
- Jean, C., Rome, S., Mathé, V., Huneau, J. F., Aattouri, N., Fromentin, G., Achagiotis, C. L. and Tomé, D. (2001). Metabolicevi Dence for Adaptationto a High Protein Diet in Rats. *The Journal of Nutrition*, 131, (1), 91–98.
- Jialal I. and Grundy, S. M., (1993). Effect of Combined Supplementation With Alpha-Tocopherol, Ascorbate, and Beta Carotene on Low-density Lipoprotein Oxidation. *Circulation*, 88, 6, 2780-2786.
- Jo, S. H., Son, M. K., Koh, H. J., Lee, S. M., Song, I. H., Kim, Y. O., Lee, Y. S., Jeong K. S., Kim. W. B., Park, J. W., Song, B. J. and Huh, T. H. (2001). Control of Mitochondrial Redox Balance and Cellular Defense Against Stoxidative Damage by Mitochondrial NADP<sup>+</sup> Dependent Isocitrato Dehydrogenase. *Journal Biological Chemistry*, 276, 16168-16176.
- Johnson, D. and Lardy, H. (1967). Isolation of Liver or Kidney Mitochondria. *Methods Enzymol*, 10, 94-96.
- Jotti, A., Maiorino, M., Paracchini, L., Piccinini, F. and Ursini, F., (1994). Protective Effect of Dietary Selenium Supplementation on Delayed Cardiotoxicity of Adriamycin in Rat: is PHGPX But not GPX Involved. *Free Radical Biology and Medicine*, 16, (2), 283-288.

- Junqueira, L. C. and Carneiro, J., (2006). *Temel Histoloji*. Y. Aytekin, S. Solakoğlu (Çeviri Editörü) Nobel Matbaacılık, İstanbul, .512.
- Karabulut, H., ve Gülay, M. Ş. (2016). Antioksidanlar. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi *Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1 (1), 65-76.
- Kent, K. D., Harper, W. J. and Bomser, J. A. (2003). Effect of Whey Protein İsolate on İntracellular Glutathione and Oxidant-İnduced cell Death in Human Prostate Epithelial Cells. *Toxicology in Vitro*, 17, 27-33.
- Kerasiotti, E., Stagos, D., Tsatsakis, A., Aristides. M., Spandidos, D. A., Taitzoglou, I. and Vouretas, D. (2018). Effects of Sheep/Goat Whey Protein Dietary Supplementation on the Redoks Status of Rats. *Moleküler Medicine Reports* 17, 4, 5774-5781.
- Kimbal, S. R. and Jefferson, L. S., (2002). Control of Protein Synthesis by Amino Acid Availability. *Currunt Opinion Clinical Nutrition ve Metabolic Care*, 5, (1), 63-67.
- Koç F. ve Sarıca Y. (2003). *Mitokondri Biyokimyası*. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı, Adana, Arşiv; 12 (ek sayı), 1.
- Köşkeroğlu, İ. Ş., (2000). *Oral Mukozada Oluşturulmuş Yumuşak Doku Defektinin İyileşmesi ve Oksidatif Stres Üzerine E Vitamini ve Selenyumun Etkisinin Deneysel Olarak Araştırılması*, Yayınlanmamış Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Kumar, V., Cotran, R. S. and Robbins, S., (1999). Basic Pathology, W. D. Saunders Company, Çeviri: Çevikbaş, U. 2000. *Temel Patoloji*, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti. 4-24.
- Ladas, E. J., Jacobson, J. S., Kennedy, D. D., Teel, K., Fleischauer, A., Kelly, K. M., (2004). Antioxidants and Cancer Therapy a Systematic Review. *Journal of Clinical Oncology*, 22, (3), 517-528.
- Lee, J. H., Yang, E. S. and Park, J. W., (2003). Inactivation of NADP<sup>+</sup>-Dependent İsocitrate Dehydrogenase by Peroxynitrite. Implications for Cytotoxicity and Alcohol-induced Liver İnjury. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 51360-51371.
- Lena Sibulesky, M. D. (2013). Normal Liver Anatomy, An Official Learning Resource of American Association for the Study of Liver Diseases. *Clinical Liver Disease*, 2, 1.
- Lenaz, G., Bovina, C., Aurelio, M., Fato, R., Formiggini, G., Genova, M.L., Giuliano, G., Pich, M. M., Paolucci, U., Castelli, G. P. and Ventura, B. (2008). Role of Mitochondria in Oxidative Stress and Aging. *Dipartimento di Biochimica*, Università di Bologna, Via Irnerio 48, 40126, Bologna, Italy.
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climet, I., Lent, A. G., Ahn, B. W., Shaltiel, S. and Stadtman, E. R. (1990). Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Pproteins. *Methods Enzymol*, 186, 464-78.

- Liu, Z., Sun, L., Zhu, L., Jia, X., Lu, X., Jia, H., Wang, Y., Weber, P., Lon, J. and Liu, J. (2007). Hydroxytyrosol Protects Retinal Pigment Epithelial Cells From Acrolein-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction. *Journal Neurochemistry*, 103, (6), 2690-2700.
- Lledias, F., Rangel, P. and Hansberg, W., (1998). Oxidation of Catalase by Singlet Oxygen. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 10630-10637.
- Lodish, H., Berk. A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., Ploegh, H. and Matsudaira, P. (2008/2011). *Moleküler Hücre Biyolojisi*, M. Özmen, ve Ö. Yeşilada, (Çeviri Editörleri). Altıncı Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık, 480-481-482-485-487- 488.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., (1951). Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193,165-175.
- Lucas, D. T., Aryal, P., Szweda, L. I., Koch, W. J. and Leinwand, L. A. (2003). Alterations in Mitochondrial Function in a Mouse Model of Hypertrophic Cardiomyopathy. *American Journal Physiol Heart Circ Physiol*, 284, (2), 575-583.
- Luo, J. and Shi, R., (2004). Acrolein Induces Oxidative Stress in Brain Mitochondria. *Neurochemistry International*, 46, 243-252.
- Madamanchi, N. R., Donahue, J. I., Cramer, C. I., Alscher, R. G. and Pedersen, K. (1984). Differential response of Cu, Zn-superoxidedismutases in Two Peacultivcars During a Shorttermex Posuretosulphurdioxide. *Plant Biology*, 26, 95-103.
- Mater, Y., Hücreler Enerjiyi Nasıl Elde Eder. *MBG in Biyoloji I*.
- Moreno-Sánchez, R., Marín-Hernández, Á., Gallardo-Pérez, J. C., Vázquez, C., Rodríguez-Enríquez, S. and Saavedra, E. (2018). Control of the NADPH Supply and GSH Recycling for Oxidative Stress Management in Hepatoma and Liver Mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics*, 5-2728, (18), 30219-6.
- Mohammad, M. K., Avila, D., Zhang., J., Barve, S., Arteel, G., McClain, C. and Joshi-Barve, S. (2012). Acrolein Cytotoxicity in Hepatocytes Involves Endoplasmic Reticulum Stress, Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 265, 1, 73-82, 15.
- Marshall, K. (2004). Therapeutic Applications of Whey Protein. *Alternative Medicine Review*, 9, (2), 36-156.
- Mantena, S. K., King, A. L., Andringa, K. K., Ecclestdon, H. B. and Bailey, S. M., (2008). Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Alcohol and Obesity-Induced Fatty liver Diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 44 (7), 1259-1272.

- Moghe, A., Ghane, S., Lamoreav, B. Mohammad, M., Barve, S., McClain, C. and Borve-Joshi, S. (2015). Molecular Mechanisms of Acrolein Toxicity: Relevance to Human Disease. 143, 242-255.
- Morgan, G. E., Mikhail, J. R. M. S. and Michael, J. M., (2002). *Clinical Anesthesiology*, 708-722.
- Moron, M. S., Depierre, J. W. and Mannervik, B. (1979). Levels of Glutathione Reductase and Glutathione-S-Transferase Activities in Rat Lung and Liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, 582, (1), 67-78.
- Mushlin, P. S. and Gelman, S. (2001). Anesthesia and the liver. *Clinical Anesthesia Philadelphia* : Williams, Wilkens, 1067-1101.
- Muhtaroglu S. (2009). *Mitokondri*. Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, J. M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M. J. and Parajo, J. C. (2001). Natural Antioxidants From Residual Sources, Food Chemistry, 72, 145-171.
- Naclerio, F., Alkhatib, A. and Jimenez, A. (2013). Effectiveness of Whey Protein Supplement in Resistance Trained Individuals. *Journal of Sports Medicine ve Doping Studies*, 3, 3, 2161-0673.
- Nassir, F. and Ibdah, J. A. (2014). Role of Mitochondria in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 15, 15, (5), 8713-8742.
- Nelson, D. L. and Cox, M. M. (2005). *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*. N. Kılıç, N. (Çevirmen). Üçüncü Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık: 527-528-530-667-668-670-671.
- Ng, V. L. and Balistreri, W. (2004) Manifestations of Liver Diseases. *Nelson Textbook of Pediatrics*. R. E. Behrman, R. M. Kliegman, H. B. Jenson (Editör). 1308-1314, Saunders Co, Philadelphia.
- Öğüt E. ve Atay S. (2012). Yaşlılık ve Oksidatif Stres, *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 68-74.
- Özkan, A. ve Fışkın, K. (2004) Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez ve Antioksidant Enzimler. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*, 14, 52-60.
- Peng, X., Kong, B., Yu, H. and Diao, X. (2013). Protective Effect of Whey Protein Hydrolysates Against Oxidative Stress in D-galactose-induced Ageing Rats. *International Dairy Journal*, 34, 80, 85.
- Pessayre, D., Mansouri, A. ve Fromenty, B. (2002). Nonalcoholic Steatosis and Steatohepatitis. V. Mitochondrial Dysfunction in Steatohepatitis. *American Journal Physiol Gastrointestinal Liver Physiol*, 282, 193-199.

- Perez-Carreras, M., Del Hoyo, P., Martin, M. A., Rubio, J. C., Martin, A., Castellano, G., Colina, F., Arenas, J. and Solis-Herruzo, J. A. (2003). Defective Hepatic Mitochondrial Respiratory Chain in Patients With Nonalcoholic Steato Hepatitis. *Hepatology*, 38, (4), 999–1007.
- Pannen, H. J. (2000). Hepatic Blood Flow During Anesthesia and Surgery. *ESA Refresher Courses Germany*.
- Reiter, R. J. (1997). Antioxidant Aactions of Melatonin. *Advences Pharmacology*, 38, 103-117.
- Rikans, L. E. and Hornbrook, K. R. (1997). Lipid Peroxidation, Antioxidant Protection and Aging. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Bais of Disease*, 1362, 116-127.
- Ruszkiewicz J. and Albrecht J. (2014), Changes in the Mitochondrial Antioxidant Systems in Neurodegenerative Diseases and Acute Brain Disorders, Department of Neurotoxicology. Mossakowski Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, *Neurochemistry International*, 02-106 Warsaw, Poland.
- Saatçi, E. (2008). Oksidatif Fosforilasyon, BİY 315. 2008-2009 Güz Yarı Dönemi, (sunum) Erciyes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü.
- Stevens, J. F., and Maier, C. S., (2008). Acrolein. Sources, Metabolism, and Biomolecular Interactions Relevant to Human Health and Disease. *Molecular Nutrition ve Food Research*, 52, 7-25.
- Sun, L., Luo, C., Long, J., Wei, D. and Liu, J. (2006). Acrolein is a Mitochondrial Toxin: Effects on Respiratory Function and Enzyme Activities in İsolated Rat Liver Mitochondria. *Mitochondrion* 6, (3), 136-42.
- Schoneich, C. (1999). Reactive Oxygen Species and Biological Aging: a Mechanistic Approach. *Experimental Gerontology*, 34, 19-34.
- Smith, B. P. (1996). Large Animal İnternal Medicine: Diseases of Horses, Cattle, Sheep, and Goats. *2nd edication Mosby Year Book*, 2040.
- Söker, S. (2013). *Hücre Yapısı, Organelleri ve İnküzyonları* (Slayt Sunum).
- Spinazzi, M., Casarin, A., Pertegato, V., Salviati, L. and Angelini, C. (2013). Assessment of Mitochondrial Respiratory Chain Enzymatic Activities on Tissues and Cultured Cells, *Nature Protocols-Journals*, 7, 1235-1246.
- Steinberg, F. M. and Chait, A. (1998). Antioxidant Vitamin Supplementation and Lipid Peroxidation in Smokers. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 68, 319-327.
- Sözmen, E.Y. (2002). Yaşlanma Biyokimyası. Onat, T., Emerk, K., Sözmen E.Y (Editör) *İnsan Biyokimyası*, Palme Yayıncılık, Ankara, 665-674.

- Şekeroğlu Z. ve Şekeroğlu V., (2009). Oksidatif Mitokondrial Hasar ve Yaşlanmadaki Önemi, Ordu Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ordu, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 69-74.
- Şahan Fırat, S., Canacankatan, N., Korkmaz, B., Yıldırım, H., Tamer, L., Sarı, A. N. ve Tunçtan, B. (2008). Endotoksemik Sıçanların Karaciğerinde Artan Oksidatif Stres Üzerinde İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz İnhibisyonunun Etkisi, *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimi Dergisi* 1, (3), 28-35.
- Tabakoğlu, E. ve Durgut, R., (2013). Veteriner Hekimlikte Oksidatif Stres ve Bazı Önemli Hastalıklarda Oksidatif Stresin Etkileri, *Derleme, Avkae Dergisi*, 3, (1), 69-75.
- Tamer, L., Polat, G. ve Eskandari, G., (2000). Serbest Radikaller. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 1, 52-58.
- Tretter, L. And Adam-Vizi, V. (2005). Alpha-ketoglutarat Dehydrogenase: a Target and Generator of Oxidative Stres. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 360, (1464), 2335-45.
- Trounce, I. A., Kim, Y. L., Jun, A. S. and Wallace, D. C., (1996). Assessment of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Patients Muscle Biopsies, lymphoblasts, and Transmitochondrial Cell Lines. *Methods Enzymol*, 264, 484-509.
- Tuokko, S. (2012). *Acrolein*, Literature Seminar Pihko Group Jyvaskll and Yliopisto University of Jyvaskyla, Jyvaskyla, Finland.
- Urso, M. L. and Clarkson, P. M. (2003). Oxidative Stress, Exercise, and Antioxidant Supplementation, *Toxicology*, 189, 41-54.
- Vedemiale, G. Grattagliano, I. Caraceni, P., Caraccio, G., Domenicali, M., Dall'Agata, M., Travisani, F., Guerrieri, F., Bernanri, M. and Altomare, E. (2001-April) Mitochondrial Oxidative Injury and Energy Metabolism Altarration in Rat Fatty Liver Effect of the Nutritional Status. *Hepatology*, 33, (4), 808-15.
- Yamaguchi, M. Yoshida, K. and Uchida, M. (2009). Novel Functions of Bovine Milk Derived a-Lactalbumin; Anti-nociceptive and Anti-inflammatory Actevity Caused by Inhibiting Cyclooxygenase-2 and Phospholipase A2. *Biological and Pharmeceutical Bulletin*, 32, (3), 366-371.
- Yazar, H. (2015). *Glikoliz ve Heksozların Yıkımı*, Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabildalı. Sakarya.
- Yu, B. P., (2001). Approaches to Anti-aging İntervention: the Promises and the Uncertainties, *Mechanisms of Ageing and Development* 111, 2, 3, 73-87.
- Young, I. S. and Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in Health and Disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54, 176-186.

- Zebrowska-Gamdzyk, M., Maciejczyk, M., Zalevska, A., Guzinska-Ustymowicz, K., Tokajuk, A. And Car, H. (2018). Whey Protein Concentrate WPC-80 Intensifies Glycoconjugate Catabolism and Induces Oxidative Stress in the Liver of Rats. *Nutrients*, 10, 9, 1178.
- Zengin, G. (2015). *Türkiyede Yayılış Gösteren Bazı Asphodeline RCHB. (Liliaceae) Taksonlarının Antioksidan Özelliklerinin incelenmesi (Yayınlanmış Doktora Tezi). Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.*
- Zeytinoğlu, H. (2000). Mitokondriyal DNA; Hastalıklarda ve Yaşlanma Mekanizmasındaki rolü. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 1, 21-32.
- Zollner, H., (1973). Inhibition of Some Mitochondrial Functions by Acrolein and Methylvinylketone. *Biochemical Pharmacology*. 22, 1171-1178.
- Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial Diseases in Man and Mouse, 283, (5407) 1482-1488.
- Wang, H. T., Lin, J. H., Yang, C. H., Haung, C. H., Weng, C. W., Lin, A. M. Y., Lo, Y. L., Chen, W. S. and Tang, M. S. (2017). Acrolein Induces mtDNA Damages, Mitochondrial Fission and Mitophagy in Human Lung Cells. *Oncotarget*, 8, 41, 70406-70421.
- Winterbourn, C. C. and Kettle, A. J., (2003). Radical-radical Reactions of Superoxide: a Potential Route to Toxicity, *Biochemical Biophysical Reseach Communications*, 305, 729-736.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : Ali OĞUZ  
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti  
Doğum tarihi ve yeri : 01.02.1985- Kilis  
Medeni hali : Evli  
e-mail : alioguz2700@hotmail.com.

<b>Eğitim Derece</b>	<b>Eğitim Birimi</b>	<b>Mezuniyet Tarihi</b>
Yüksek lisans	Amasya Üniversitesi	2019
Lisans	Ondokuzmayıs Üniversitesi (Samsun)	2008
Lise	Ondokuzmayıs Lisesi (Gaziantep)	2003

### Bilimsel Faaliyetler

1-Oğuz, A, Aydın, B. (2017, Ekim). Akrolein Verilen Ratlarda Whey Proteinin Rat Karaciğeri Mitokondrial Oksidatif Stres ve Solunum Enzimleri Üzerine Etkisi, *6. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*, Çukurova Üniversitesi, Adana, Türkiye.