

T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

AKUT VE KRONİK LÖSEMİLİ HASTALARDA ERİTROSİT İÇİ  
SÜPEROKSİT DİSMUTAZ, GLUTATYON PEROKSİDAZ VE  
KATALAZ AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. İsmail Çetin Öztürk

Danışman : Prof. Dr. Engin M. Gözükara

MALATYA, 1996

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
GENEL KÜTÜPHANESİ

## İÇİNDEKİLER

1) GİRİŞ VE AMAÇ : .....	1
2) GENEL BİLGİLER : .....	2
3) MATERYAL VE METODLAR : .....	42
4) BULGULAR : .....	53
5) TARTIŞMA VE SONUÇ : .....	68
6) ÖZET - SUMMARY : .....	80
7) KAYNAKLAR : .....	82



Tüm aerobik organizmalar serbest radikallerin yaptığı hasarı önlemeye yardım eden bileşiklere sahiptir. Bunlar arasında başlıca vitamin E gibi antioksidanlar ve süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-PX yada GPX) gibi serbest radikal yok edici antioksidan enzimler sayılabilir.(9,10)

Kanser gelişimi ile serbest radikaller arası ilişkiyi çözmek için çeşitli teoriler ileri sürülmüştür. Bunlardan başlıcaları ; "radikal hasarı teorisi" ve "radikal diferensiyasyon teorisi"dir. Heriki teoriyi de destekleyen bulgular mevcuttur. Antioksidan enzim aktivitelerinin bilinmesi antikanser ilaçlarla yapılan tedavinin ayarlanmasında prognostik öneme sahip olabilir.(11)

Değişik organ kanserlerinde yapılan ölçümlerde antioksidan enzim aktiviteleri düşük bulunmuştur.Ancak lösemi tiplerinde yapılan az sayıdaki çalışmada blastik hücre içi ve eritrosit içi serbest radikal yok edici antioksidan enzim aktiviteleri yönünden değişik sonuçlar bulunmuştur.(11,12,13)

Bu konuda bir katkıda bulunmak amacıyla yaptığımız çalışmada değişik lösemi tiplerindeki hastalarda eritrosit içi SOD, CAT ve GPX enzimlerinin aktivitelerini ölçerek kontrol grubuna göre ve tipler arası antioksidan enzim aktiviteleri yönünden anlamlı bir fark olup olmadığı araştırılacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### KANSER OLUŞUM TEORİLERİ

#### A-Radikal Hasarı Teorisi :

Tümör hücrelerinde süperoksit üretiminin normal, Mn-SOD üretiminin azalmış olmasına dayanılarak bir kanser modeli önerilmiştir.Bu modele göre transformasyon, ya nükleer DNA`da bir mutasyon ile, ya DNA ekspresyonunda mutasyon dışı değişiklik ile yada yeniden programlama şeklinde değişiklik ile oluşur. Bu değişiklik sonucu SOD üretimi azalır. Dolayısı ile normalde süperoksit üretimi arttıkça artması gereken SOD artmadığı için bağıl olarak yüksek süperoksit düzeyi oluşur. Serbest radikaller(SR)`in bağıl yüksekliği alt hücre organellerini hasarlandırır.Bu değişiklikler kanser hücresinin, hücrenin bölünme potansiyeli kaybı ve diferensiyasyon yeteneğinin azalması gibi fenotipik özelliklerinin pekçoğundan sorumludur.Oksijen serbest radikalleri (OSR)`nin mutasyon oluşturan ajanlar olduğuna dair pekçok kanıt vardır.(14)

Aynı zamanda kanser hücresinin oksijene duyarlılığını etkileyen değişiklikler oluşur. Kanser hücresi ya oksijen tarafından hücre proliferasyonunun inhibisyonuna duyarlı değildir yada oksijenin yaptığı hücre ölümüne duyarlı değildir. (11)

Kanser oluşumu için SOD ve CAT-GPX gerektiren 2 basamaklı başka bir model önerilmiş. Bu modele göre Kanser hücresinin oluşumu için 2 değişiklik gerekir. Biri "immortalite kazanma ve diferensiyasyon kaybı", diğeri "hücre proliferasyon kontrolü kaybı" dır. Bunlardan ilki Mn-SOD düşüklüğüne bağlı, ikincisi ise CAT ve GPX düşüklüğüne bağlıdır. Bu teorinin adı radikal hasar teorisi dır. Çünkü radikal hasarı hücrelerin tam diferensiyasyonunu önler. Pekçok radikal yokedici, tümör hücrelerinin diferensiyasyonuna neden olur. Bu nedenle SOD kanser tedavisinde kullanılmıştır. (11,15)

#### **B-Radikal diferensiyasyon (farklılaşma) teorisi :**

Tümör hücrelerinde süperoksit ve hidrojen peroksit üretimi azalmıştır. Tümörlerde düşük oksidatif enzim aktiviteleri, hücresel düzeyde azalmış bir oksidatif çevre oluşturur ve neoplastik hücrelerin hızlı hücre çoğalması için daha uygun bir durum sağlar. Normal hücrelerdeki oksidatif enzimlerin daha yüksek aktiviteleri, hücresel düzeyde daha fazla oksidatif çevre sağlar. Böylece hücresel düzeyde yaşlanmaya, normal hücrenin çoğalma yeteneğinde azalmaya yol açar. (11)

Kanser oluşumu için hücresel düzeyde gerekli olan iki koşul önceki teoride olduğu gibi bu teori için de geçerlidir. Bir önceki teoride "immortalite kazanma ve diferensiyasyon yeteneği kaybı" nın yüksek miktarda süperoksite bağlı hücre hasarı ile oluşturulduğu ileri sürülmüştür. Bununla birlikte eğer tümör hücreleri tarafından süperoksit üretilmiyor ise bu teori yanlıştır. Bu durumda bir tümör hücresi az miktarda süperoksit ve hidrojen peroksit ürettiği için diferensiyasyon yeteneğinin azaldığı hipotezi ileri sürülebilir. Düşük OSR üretim kapasitesi nedeniyle tümör hücresinin immortal olması, bölünme sonrası irreversible olarak diferensiyasyon olamaması anlamına gelir. Diferensiyasyon eksikliği nedeniyle tümör hücresi bölünme kapasitesini hiç yitirmez. Bu modele göre normal hücre farklılaşması DNA`da OSR tarafından oluşturulan irreversible değişiklikler ile indükleneyecektir. (11)

Bir hücre farklılaşma programına girdiği sürece gen ekspresyonunun farklı düzenleyicileri, zincirleme olarak uzaklaştırılacak, savunmasız DNA, OSR tarafından kimyasal modifikasyona maruz kalacak aksi takdirde DNA` da bu irreversible değişim olmayacak ve farklılaşma engellenecektir. (11)

Bu teoriye göre OSR üretimine yol açan pekçok antikanser ilacın kısmen yada tamamen tümör hücrelerini diferensiyeye ettiği söylenebilir. Aktinomisin D, mitomisin, adriamisin, daunomisin`in insan myeloid lösemi hücrelerini diferensiyeye ettiği gösterilmiştir. (11,16)

#### OKSİJEN TOKSİTESİ VE LİPİD PEROKSİDASYONUNA DUYARLIK

Bir kanser teorisi tümör hücrelerinin çok belirgin iki özelliğini daha açıklamalıdır. Biri "oksijen toksitesine direnç", diğeri "lipid peroksidasyonuna direnç"tir. Her iki özellik de radikal diferensiyasyon teorisi ile daha çok bağdaşır. (11)

**OKSİJEN TOKSİTESİ :** Oksijen normal hücrenin çoğalmasını inhibe eder fakat transforme hücrenin çoğalmasını engellemez. Tümör hücreleri genelde antioksidan enzimler yönünden fakir olduğu için oksijen toksitesine karşı bu direnci açıklamak oldukça zordur. Eğer kanser hücrelerinin yalnızca çok az OSR ürettiği farz edilirse bu sorun çözülmüş olur. Tümör hücresinde oksijen toksitesinin az olması için bu hücrelerin OSR`e karşı daha dirençli olması gerekir ki bunun radikal hasar teorisi ile bağdaşması zordur. (11,17,18)

**LİPİD PEROKSİDASYONUNA DUYARLIK :** Tümör hücreleri lipid peroksidasyonuna daha az duyarlıdır. Yapılan çalışmalarda peroksidasyona maruz kalan biyolojik membranlarda, peroksidasyona dirençli hücre homojenatlarının eklenmesi ile lipid peroksidasyonu önlenmiştir. Peroksidasyona dirençli olan hızlı büyüyen tümörlerde peroksidatif aktivite, büyüme hızı ile ters orantılı idi. Bu bulguya göre, tümör hücreleri hücre bölünmesini durdurmada gerekli olan peroksidatif üretimlerinden yüksek bölünme kapasitesine sahipti. (11,19) Ayrıca tümör hücresi mikrozomal membranlarının lipid içeriği ve akışkanlığı araştırıldığında, bu parametrelerin büyüme hızı ile ilişkili olarak değiştiği saptandı. Lipid/protein oranı ve yağ asitlerinin doymamışlık derecesi sıçan karaciğer tümör mikrozomlarında normalden düşük bulunmuştur. (20) Yani tümör hücreleri anormal membran yapısına sahiptir. Doymamış yağ asitleri peroksidasyona daha duyarlıdır.

Bu membranlardaki doymamış yağ asidi oranı düşük olduğundan peroksidatif aktivite düşüktür. Tümör hücrelerinin lipid peroksidasyonuna duyarlılığının az olması radikal diferensiyasyon teorisi ile uyumludur. Yani peroksidatif aktivite az olduğu için OSR üretilemez, böylece farklılaşma engellenir. Hücre immortalite kazanır. (11,20)

Eğer tümör hücrelerinde aşırı OSR üretilirse, antioksidan enzimler genelde düşük düzeyde olduğundan vitamin E gibi nonenzimatik antioksidanların kullanılması gerekir. Eğer hücredeki tüm antioksidanlar tükenmiş ise hücre lipid peroksidasyonuna daha duyarlı hale gelir. (21)

Kanser oluşumunun iki aşamalı olduğu düşünülür. Bunlardan ilki "başlama"(initiation), ikincisi "ilerleme"(promotion) evresidir. Başlama evresinde bir fiziki, kimyasal yada biyolojik ajan hücre DNA'sının moleküler yapısında irreversible bir değişime neden olur. Bu değişim hücre farklılaşması ve çoğalmayı düzenleyen genlerin ifadesinin değiştirildiği ilerleme evresi tarafından izlenir. Başlatıcı ajanlardan farklı olarak ilerletici ajanlar ekseri genetik materyal ile doğrudan reaksiyona girmez fakat dolaylı mekanizmalar ile gen ifadesini değiştirir. Bazı maddeler her iki evreyi mümkün kılarak neoplazm oluşumuna sebep olan komplet karsinojenlerdir. Bunlardan başlıcaları polisiklik hidrokarbonlar, onkojenik RNA ve DNA virüsleri, iyonizan ve UV radyasyondur. (21)

OSR karsinogenezin ilerleme evresinde rol oynar. (22) Hiperbarik oksijen, süperoksit ve belli organik peroksitler, tümör promoter'larıdır. Bazen zayıf komplet karsinojen de olabilir. (21) Tersine pekçok antioksidanlar, antipromoter ve antikarsinojendir. Bir tümör promoter olan Forbol Miristat Asetat'ın (PMA) kromozom kırıcı (klastojenik) etkisi, DNA'yı doğrudan hasarlandıran yada hücredeki bir komponenti aktive eden OSR'in üretimi ile oluşur. (23) Polisiklik hidrokarbonların karsinojenik aktivitesi onların OSR oluşturma kabiliyeti ile bağlantılıdır. (21,23)

Benzo(a)piren (BaP) ve oksitlenmiş BaP radikalleri sitokrom P-450 aktivitesi ile yada peroksidaz-hidrojen peroksit aktivitesi ile oluşturulabilir ve tümör oluşumuna yol açan ilk basamak gibi DNA'ya BaP bağlanması gösterilmiştir. (24,25)

Fagositten elde edilen oksijen radikallerinin bakterilerde mutasyon yaptığı, kültüre edilen memeli hücrelerinde ise sitogenetik değişiklikler yaptığının keşfedilmesi kanser patogenezinde iltihap ve fagositlerin rolünü göstermede delil oluşturur.(26) Bilindiği gibi kronik iltihap kanserle bağlantılıdır.(21,26)

İyonizan radyasyonun hücre öldürücü etkisi, birincil olarak değişik iyonlara ve iyonizan radyasyon ile suyun etkileşiminden oluşan kısa ömürlü reaktif serbest radikallere bağlıdır.(9,21)

OSR`in kanserogeneizde rol oynaması dışında kanser tedavisinde de rol oynadıkları saptanmıştır. İyi oksijenlenen hücreler irradyasyona hipoksik hücrelerden 2-3 kez daha duyarlıdır. Maalesef tümör hücreleri hipoksiktir. Yani radyasyon tedavisi ile kolayca öldürülemez.Sağlam hücreler daha kolay etkilenir. İrradyasyon üstünde oksijenin etkisini açıklamaya 2 mekanizma önerilmiştir. Biri "hidroperoksi radikalleri gibi hasar veren türlerin oluşumu" diğeri "organik peroksi radikalleri oluşturmak için hedef biyomoleküller içinde oluşmuş OSR ile oksijenin reaksiyonu" dur.(21)

Kanser hücrelerini öldürmede irradyasyon ile oluşturulan serbest radikallerin kullanımı dışında, kanser kemoterapisinde de serbest radikallerin önemli role sahip olduğu bulundu. Antikanser ilaçların sitotoksik etkisinde OSR`in rolü olduğuna en iyi delil glikopeptid antibiyotik bleomisininden elde edildi. Bleomisin DNA`ya bağlanır.Fe(II) ve oksijen mevcudiyetinde Fenton tipi reaksiyonlar başlar. Sonuçta alkoksil (RO·) ve hidroksil(OH·) radikalleri oluşturarak DNA`yı parçalar.(21,27,28)

Kinon grubu antitümör ajanların özellikle de bu gruptaki antrasiklin cinsi ilaçların terapötik ve toksik etkilerinin oluşumunda ve bunlara karşı direnç gelişiminde serbest radikallerin rolü olabileceğini gösteren çalışmalar yapılmıştır. Bu konuda yapılan çalışmaların ilkinde adriamisin ve daunorubisinin toksitesinde OSR`in rolü araştırıldı.Etidium bromid floresan ölçümü kullanılarak yapılan çalışmada bu ilaçlar sodyum borohidrit (NaBH<sub>4</sub>) tarafından redüklendiği zaman sıkıca kapanmış sarküler DNA`daki çentiğe bağlandı. Yıkım oksijen bağımlı idi ve SOD,CAT,sodyum benzoat tarafından inhibe edildi.Bu inhibisyonlara dayanılarak sırası ile O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH· radikallerinin bu yıkımda rol oynadığı saptandı. Diğer bir çalışmada adriamisin, sığır kalbinde izole edilen submitokondrial partiküllerde süperoksit(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)oluşumunu uyardı.Oluşan süperoksit, sitokrom c

redüksiyonu, epinefrinin adrenokroma otooksidasyonu gibi işlemlerle saptandı. Tüm bu işlemler SOD` a duyarlıydı. (11,29,30)

Bu ilaçların yapılarındaki kinon grubunun redoks döngüsüne katıldığı ve OSR üretiminde rol oynadığı saptandı. NADPH ve saflaştırılmış P-450 redüktaz ile bu ilaçların bol miktarda bulunduğu bir ortamda katalazın kısmen inhibe edebildiği bir oksijen tüketimi oluştu. Bu döngü esnasında ilaveten sülfid oksidasyonu başlatılabilir ve bu oksidasyon süperoksit oluştuğunu gösteren bir olay olarak SOD tarafından kısmen önlenir. Ayrıca CAT ile inhibisyon da yine hidrojen peroksit oluştuğuna bir kanıttır. Sıçan karaciğer mikrozomları da lipid peroksidasyonunun eşlik ettiği bu redoks döngüsünü katalizleyebilir. (31)

#### MOLEKÜLER OKSİJENİN KİMYASI :

Dioksijen denen moleküler oksijenin kimyası ele alındığında elementin pekçok bileşikle reaksiyona girmesinde bağlı isteksizlik söz konusudur. Bu özellik temelde nadiren termodinamiktir. Yavaş reaksiyon hızı daha çok ya kuvvetli O-O bağı ya dioksijenin "ground state" denen kararlı durumu yada her ikisi ile ilişkilidir. İyi bilindiği gibi dioksijen, onun bir triplet olarak tanımlanmasına yol açan 2 eşlenmemiş elektronu nedeni ile paramagnetiktir. Yani molekül bir manyetik alanda yerleştirildiği zaman 3 durum gösterir. Orbital açısal momentumu kararlı durum ile bağlantılı değildir. Böylece molekül  $^3\Sigma_g^-$  şeklinde gösterilir. Pekçok molekül singlet olarak tanımlanmış kararlı durumları ile diamagnetiktir. (32)

Eğer kararlı durumdaki dioksijen ile bir reaksiyon meydana gelirse, reaksiyon esnasında bazı düzeylerde spin değişimi olacaktır. Bu olay, kullanılan tanımların sınırlamaları içinde yasaklanmıştır. Böyle bir reaksiyon imkansızdır. Dioksijenin hızla reaksiyona girmesi için reaksiyondan önce ya bu spin sınırlaması kaldırılmalı ya O-O bağı kısmen zayıflatılmalı yada her ikisi eşzamanlı olmalıdır. Dioksijenin uyarılmış durumdaki singlet formlarına çevrimi ya fotokimyasal yada termal olarak mümkündür. Her ikisi de O-O bağına zayıflatır ve spin sınırlamasını kaldırır. Dioksijenin redüksiyonu da O-O bağına zayıflatır ve reaksiyonlarının spin sınırlaması ile bağlantılı kinetik bir engelle maruz kalmadığı oksijen türevleri oluşturur. Tabiidir ki dioksijen ile reaksiyona giren türler ayrıca eşlenmemiş elektron

içerirse yada salınım durumlarını değiştirebilirse o zaman spin sınırlaması kalkar. Bu olay kuvvetli O-O bağı ile ilişkili sorunu önlemez. Aslında gerçekten böyle durumlarda başlangıç ürünleri O-O bağının sağlam olduğu dioksijen içerecektir. Dioksijen kimyasının büyük kısmının paramagnetik türler, elektron veren türler, ışık yada bu 3 faktörün değişik kombinasyonları ile ilgili olması gerekir. (32)

Moleküler oksijen iki dış orbitalinin herbirinde aynı yönde salınan ortaklanmamış (eşlenmemiş) bir elektron içerir. Bu şekli ile bir diradikaldir. Moleküler oksijenin diradikal olarak sahip olması beklenen reaktivite bu ortaklanmamış elektronların paralel salınım yönleri nedeni ile azaltılır. Çünkü bu düzenlenme, karşıt yönlerde salınan normal konfigürasyondaki elektron çiftlerine sahip olan nonradikal bir molekülden, moleküler oksijenin aynı zamanda 2 elektronu uzaklaştırma yeteneğini azaltır. Halbuki oksijenin bu özelliği onun diğer serbest radikaller ile kolayca reaksiyona girmesini sağlar. İki molekül arasında bir oksidatif reaksiyonun gerçekleşmesi için elektron salınımları karşıt yönlerde olmalıdır. Moleküler oksijenin oksitleme yeteneğindeki bu sınırlanma bir elektron kazandığı anda ortadan kalkar. (21,32)

Moleküler oksijenin reaktivitesi OSR'e redüklenmeye ilaveten başka şekilde de artırılabilir. Bu olay moleküler oksijenin 2 dış orbitalinde paralel salınmakta olan elektronlardan birinin salınım yönünü tersine çeviren bazı reaksiyonların seyri esnasında meydana gelir. Bu şekilde kuantum mekaniği ile ilgili salınım sınırlamalarının kaldırılması yolu ile yüksek derecede reaktif olan singlet oksijen ( $^1O_2$ ) üretilir. Pekçok oksidaz ve oksijenaz enziminin aktif merkezindeki transisyon metalleri moleküler oksijene tek elektron transferini kolaylaştırma yeteneğine sahiptir. (21,33)

Moleküler oksijenin tek değerli redüksiyonu, iyonizan radyasyon yada mitokondrial ve mikrozomal elektron transport zincirleri otooksidasyon reaksiyonları gibi diğer kaynaklardan yeterince enerjili elektronlara maruz kaldığı zaman da başlatılabilir. Solunum zincirindeki moleküler oksijen, suya indirgeninceye dek, ardışık olarak tek değerli redüksiyona uğrar.

Bu esnada radikal cinsi kısmen indirgenmiş oksijen türevi ara ürünler oluşur.OSR dediğimiz bu ara ürünler, ortaklanmamış elektronları nedeniyle diğer tüm radikaller gibi ileri derecede reaksiyona girme eğilimi taşır yani aşırı derecede reaktiftir. (38)

### SERBEST RADİKAL NEDİR ?

Bir atom yada molekül içi elektronlar, belli kısıtlamalar altında herbirinin 2 elektron içerebildiği, orbitaller denen kuantum mekaniklerinin ihtimali fonksiyonları ve enerji ile tanımlanan uzaysal hacimli elemanları işgal eder. Pekçok kimyasal bileşik, bu orbitaller içinde 2 elektron içerir ve bu elektronlar karşıt yönlerde salınır.Normal kimyasal kovalent bağ, yine karşıt yönlerde salınan bir çift elektron içerir.Bağın herbir komponenti elektronların birini başışlar.Bir serbest radikal ise bunun tersine dış orbitalinde bir yada daha çok eşlenmemiş elektron içeren bir atom yada moleküldür.Bu geniş tanım transisyon metal iyonları ve H atomunu da içerir. Nitrik oksit (NO) ve Nitrojen dioksit (NO<sub>2</sub>) gibi bazı inorganik bileşikler dış orbitallerinde eşlenmemiş elektron (é) içerir, bu tanıma göre serbest radikaldir.Dış orbital içinde eşlenmemiş é bulunması R· şeklinde temsil edilir.Bir bileşik ya ilave bir é kazanarak (Ör: O<sub>2</sub> + é ---> O<sub>2</sub><sup>-</sup>) yada bir é kaybederek (Ör: AH<sub>2</sub>--->AH· + é) serbest radikal haline gelir.Kimyasal reaksiyonların çoğunda molekülleri oluşturan atomlar arası kovalent bağlar parçalanır ve yeni moleküler düzenlenmelere izin veren yeni bağ oluşumları ile çeşitli ara ürün yada son ürünler oluşturulur. Moleküler bağ parçalanması homolitik ve heterolitik olarak iki şekilde olur.(1,34)

Bir kovalent bağın homolitik parçalanmasında, bağ simetrik olarak ikiye bölünür ve bağı oluşturan herbir moleküler komponent tek é alır.Sonuçta ortaklanmamış é taşıyan, serbest radikal yapısında atom yada moleküller oluşur. ( A-B --->A· + B· )  
Bu parçalanmaya serbest radikal parçalanma da denir. Nonpolar çözeltilerde gaz fazında meydana gelir.Yüksek ısı, güneş ışığı ve peroksitler tarafından katalizlenir. (34,65)

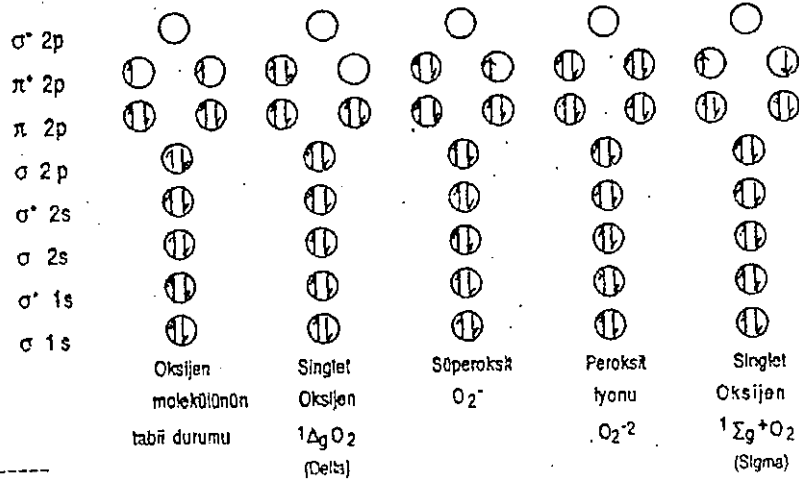
Bir kovalent bağ heterolitik olarak parçalanırsa asimetrik olarak bölünür. Böylece bağı oluşturan 2 komponentin biri, her iki é 'u da alır ve (-) yüklü iyon haline gelir.Diğer komponent ise bir é kaybederek (+) yüklü iyon haline geçer. Bu şekildeki

parçalanmaya iyonik parçalanma da denir. Polar çözeltilerde meydana gelir. (  $A-B \rightarrow A^+ + B^-$  ) Burada  $A^+$  elektrofil yani  $\epsilon$  seven, asidik komponenttir. Üstünde oktet boşluğu olan atom yada moleküller elektrofiledir.  $B^-$  ise nükleofil yani proton seven, bazik komponenttir. Üstünde ortaklanmamış  $\epsilon$  çifti olan atom yada moleküller nükleofildir. (1,34,35)

Serbest radikaller, kovalent bağlı normal bir molekülün homolitik bölünerek herbir parçasında ortak  $\epsilon$  lardan birinin kalması neticesi oluşmak dışında, normal bir molekülden tek  $\epsilon$  kaybı ile yada normal bir moleküle tek  $\epsilon$  eklenmesi ile de oluşabilir. Serbest radikaller elektirikî yönden (+) yüklü, (-) yüklü yada nötral olabilir. (34,35)

Biyolojik sistemlerde H, C, S, N, O türevi olan serbest radikaller ve tek  $\epsilon$  alışverişi yapabilen transisyon metal iyonları ( Cu, Fe, Mn, Ti, Co, Cr, Ni, Mo, Cd v.b ) serbest radikal reaksiyonlarında rol oynar. Bunlar içinde en önemlisi ise "oksijen türevi serbest radikaller" (OSR) dir.

OSR in girdikleri reaksiyonlarda anahtar role sahip olan maddeler : dioksijen( $O_2$ ), süperoksit anyon radikali ( $O_2^-$ ), hidroksil radikali ( $OH\cdot$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), singlet oksijen ( $^1O_2$ ) ve transisyon metal iyonlarıdır.



Şekil 2.1

Kararlı durumda bulunan ve bulunmayan  $O_2$  moleküllerinin elektron konfigürasyonu

## SÜPEROKSİT ANYON RADİKALİNİN KİMYASAL ÖZELLİKLERİ :

Moleküler oksijenin bir e alıp indirgenmesi ile süperoksit anyon radikali ( $O_2\cdot$  yada  $O_2^-$ ) oluşur. Olay şu şekilde formüle edilir  $O_2 + e \rightarrow O_2^-$  Süperoksit, organik çözücülerde kuvvetli bir baz ve nükleofildir. Örneğin karbontetraklorür ( $CCl_4$ ) gibi reaktif olmayan klorlu hidrokarbonlardan Cl çıkarabilir. (2) Sulu solüsyon içinde aşırı hidratedir ve Nitroblue tetrazolium (NBT) yada sitokrom c (cyt c) gibi moleküllere redüktan ajan ve adrenalin, askorbik asit gibi moleküllere zayıf oksidan ajan şeklinde davranarak, organik çözücülerdeki şekline göre çok daha az reaktiftir. Sulu solüsyonlardaki süperoksitin orta derecede kimyasal reaktivitesine rağmen, kimyasal yada enzimatik yolla süperoksit üreten sulu biyolojik sistemlerde önemli derecede biyolojik hasar yaptığı gözlenmiştir. Süperoksit anyonu üstündeki ortaklanmamış fazla e' u vererek tekrar moleküler oksijene dönebileceği gibi bunun tersine bir e daha alarak  $2 H^+$  varlığında Hidrojen peroksit dönebilir. ( $O_2^- + e + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2$ )

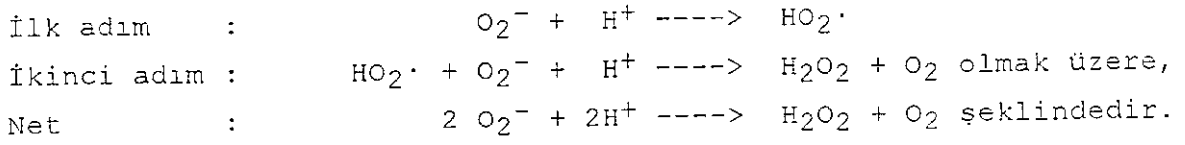
Yani hem redüktan (indirgeyici) hem de oksidan (yükseltgeyici) olabilir. Süperoksit radikali düşük pH' da proton alarak katyon şekline dönebilir.  $O_2^- + H^+ \rightarrow HO_2\cdot$  (düşük pH' da) (2)

Süperoksitin katyon şekline hidroperoksi yada perhidroksi radikali denir. Süperoksit nötral ve yüksek pH' larda ise anyon radikali şeklinde bulunur. Bu yüzden biyolojik sistemlerde genelde anyon radikali halindedir. Eğer süperoksit radikalinin anyon ve katyon hali birbiri ile reaksiyona girerse, proton varlığında moleküler oksijen ve hidrojen peroksit oluşur. Olayı formüle edersek ( $O_2^- + HO_2\cdot + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ ) formülün daha ileri açılımı ( $\cdot O-O: + H-O-O\cdot + H^+ \rightarrow \cdot O-O\cdot + H-O-O-H$ ) şeklinde yazılabilir.

Bu dismutasyon ya spontan yada SOD enzim katalizi ile gerçekleşir. Perhidroksi katyon radikalinin iyonizasyon pK' sı 4.8 'dir. Yani pH= 4.8' de süperoksitin anyon ve katyon şekilleri eşit miktarda bulunur. Bu nedenle spontan dismutasyon en çok bu pH' da gerçekleşir. Spontan dismutasyonun hız sabiti,  $1 \times 10^{-5} M^{-1} s^{-1}$  dir.

$HO_2\cdot \rightleftharpoons O_2^- + H^+$  (pH = 4.8'de anyon ve katyon eşit miktarda)

SOD aracılı dismutasyon hücre içinde iki adımda oluşur. SOD aracılı dismutasyonda hız sabiti  $1 \times 10^{-9} M^{-1} s^{-1}$  dir. (1,2,32,38)



#### SİNGLET OKSİJENİN KİMYASAL ÖZELLİKLERİ :

Moleküler oksijenin 2 dış orbitalindeki paralel salınmakta olan 2 é`dan birinde kuantum mekaniği ile ilgili salınım sınırlamalarının kalkması sonucu singlet oksijen ( $^1\text{O}_2$ ) oluşur.(1)

Singlet oksijenin 2 tipi vardır. Biri çok kısa ömürlü olan "sigma singlet oksijen", diğeri ise biyolojik olarak daha uzun ömürlü olan "delta singlet oksijen" dir. Sigma tipinde iki dış orbitalin herbirinde karşıt salınım yönlerine sahip birer elektron bulunur. Delta tipinde ise dış iki elektron aynı orbitali işgal eder ve karşıt salınım yönlerine sahiptir.(1,2,36)

Singlet oksijen oluşumuna neden olan bazı mekanizmalar :

Dioksijen üstünde pigment aracılı ışık aktivitesi, Fe katalizli Haber-Weiss reaksiyonu, süperoksitin spontan dismutasyonu, fagositlerin antimikrobal aktivitesinin parçası olarak hidrojen peroksit tarafından halidlerin oksidasyonudur.(1,2,37)

Serbest radikal tanımına göre delta singlet oksijen bir radikal değildir.Çünkü ortaklanmamış é içermez. Eğer singlet oksijen de OSR gibi biyolojik sistemler içinde salınırsa membran poliansature yağ asitlerini de içeren pekçok molekülü hızla oksitleme yeteneğindedir. Sigma singlet oksijen kısa ömürlüdür. Genelde herhangi bir molekülle reaksiyona girmeden delta singlet oksijene dönüşür. Işık, ışığı absorbe eden bir pigment ve moleküler oksijen bir araya geldiğinde singlet oksijen oluştuğundan bahsettik bu olayın mekanizması şu şekildedir.(1,37) Pigment ışığı absorbe ederek daha yüksek elektronik eksitasyon durumuna geçer ve üstündeki enerjiyi moleküler oksijene aktararak onun dış iki orbitalinde paralel salınan é`lardan birinin salınım yönünü değiştirir. Singlet oksijen oluşumu muhtemelen biyolojik sistemler içinde ışığa ençok maruz kalan bölümlerde meydana gelir. Örnek olarak gözün lensi ve bitkilerde bulunan kloroplast verilebilir.(2,36,39)

Bazı hastalıklarda aşırı miktarda singlet oksijen oluşumuna neden olabilir.Örneğin doğuştan porfrin metabolizması bozukluğu olan porfriada deride biriken porfrin pigmenti ışığa maruz kalarak singlet oksijen oluşumuna ve buna bağlı cilt

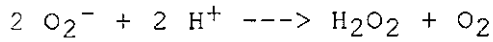
erupsiyonları ile nedbeleşmeye neden olur. Ayrıca oluşturduğu fluoressan ürünlerin tümör dokuları tarafından tutulduğu bilinen hematoporfirin derivesi ile yapılan enjeksiyon tedavisi sonrası oluşan fluoressan ürünlerin belli dalga boyunda yaydığı ışık sayesinde yine moleküler oksijen uyarılarak oluşturulan singlet oksijen ve hidroksil radikallerinin tümör hücrelerini tahrip ettiği düşünülür. Bu uygulama deri ve akciğer kanserinin tedavisinde sıklıkla kullanılır. (40)

Fotosensitizasyon reaksiyonlarının tıptaki diğer uygulanımı psöriasis gibi cilt hastalıklarının tedavisinde 320-400 nm dalga boylu UV ışık ile psöralen denen bitkilerce üretilen ve singlet oksijen oluşumunda fotosensitizer pigment görevi yapan birtakım bileşiklerin beraberce kullanılması (PUVA) sonucu oluşan singlet oksijenin hastalığın tedavisinde rol oynamasıdır. Yine tetrasiklin, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar (ör: benoksaprofen) ve kozmetikler fotosensitizasyon reaksiyonu ile deriye hasar verebilir. (2, 41, 42, 43)

Singlet oksijenin DNA hasarı ve mutasyon yaptığı Salmonella typhimurium ve memeli SV-40 tabanlı mekik vektöründe yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. (44, 45, 46, 47)

#### HİDROJEN PEROKSİTİN KİMYASAL ÖZELLİKLERİ :

Süperoksit üreten bir sistemin "nonenzimatik" yada "SOD katalizli" dismutasyon ile hidrojen peroksit üretmesi beklenir.



Bazı oksidaz enzimleri doğrudan hidrojen peroksit üretir. Örnek olarak 2-hidroksiasit oksidaz, urat oksidaz, glukoz oksidaz enzimleri verilebilir. (1, 48)

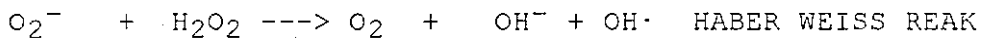
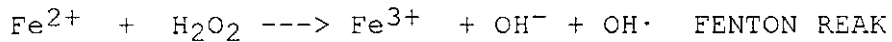
Glukoz + O<sub>2</sub>  $\xrightarrow{\text{Glukoz Oksidaz}}$  D-Glukono Delta lakton + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Biyolojik sistemlerde de O<sub>2</sub><sup>-</sup> üretildiği ve bunun SOD tarafından dismutate edildiği bilindiğine göre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşumu beklenmesi gayet doğaldır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimi bakterilerde, spermatozoada, fagositik hücrelerde, mitokondride, mikrozoamlarda, kloroplastta saptanmıştır. (49, 50) İnsan gözünün lensi ve insanın dışarı attığı soluk havasında hidrojen peroksit saptanmıştır. Soluk havasındaki kaynağı oral bakteri florasından çok akciğer makrofajları olduğu düşünülmüştür. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ortaklanmamış é'a sahip olmadığı için bir radikal değildir. Sınırlı reaktiviteye sahiptir fakat yüksüz bir molekül olduğu için biyolojik membranları kolayca geçebilir. Hal-

buki süperoksit bir anyon kanalı olmadıkça çok yavaş geçebilir. Böyle bir anyon kanalının ise tek bilinen örneği, eritrosit membranı içindedir. Bu sayede  $H_2O_2$ , süperoksitin geçemediği membranlarla korunan bölgelere geçip hasar yapabilir. Bazı bakteri ve hayvan hücreleri mikromolar konsantrasyonda  $H_2O_2$  ile hasarlanırken diğer bir kısım bakteri ve fotosentetik algler büyük miktarda hidrojen peroksiti kendileri üretip ortama salar. Eğer hücreler süperoksit üreten sistemlere maruz kalırsa ve hasara karşı korunma eklenen SOD ile olmayıp katalaz sayesinde oldu ise bu mutlaka hasarın doğrudan hidrojen peroksit tarafından yapıldığı anlamına gelmez. Hücrelerin dışında üretilen süperoksit kolayca hücre içine giremez halbuki  $H_2O_2$  girebilir ve hücre içinde  $OH\cdot$ ,  $HO_2\cdot$  gibi daha reaktif radikal türlerine dönüşebilir. Benzer şekilde hücre içinde üretilen  $H_2O_2$  hücre dışına katalaz eklenmesi ile uzaklaştırılabilir. Enzim difüzyon dengesini bozar ve hidrojen peroksitin plazma membranından hücreyi terketmesine sebep olur. (2,49,50)

#### HİDROKSİL RADİKALİNİN KİMYASAL ÖZELLİKLERİ :

Serbest  $OH\cdot$  radikali için ilk kanıt 1924` de WW. Watson tarafından  $H_2-O_2$  alevinin absorpsiyon spektrumunda gözlemlendi. Daha sonraki çalışmalarda hidroksilin diğer spektral çizgileri gaz fazı, pirolize buhar ve su buharı yada  $H_2/O_2$  karışımlarının elektrik deşarjları içinde gözlemlendi. Bu gözlemlerin bir sonucu olarak Bonhoeffer ve Haber  $OH\cdot$  ve H atomlarının  $H_2-O_2$  yanmasının zincir reaksiyonu içindeki zincir taşıyıcıları olduğunu önerdi. Sulu ortamdaki hidroksil radikalinin katalaz tarafından hidrojen peroksitin dekompozisyon mekanizmasında bir rol oynadığı ilk kez Haber ve Willstatter tarafından ortaya atıldı. Sonraları Haber ve Weiss,  $OH\cdot$  `in Fenton reaksiyonunda bir ara ürün olduğunu öne sürdü. (51)



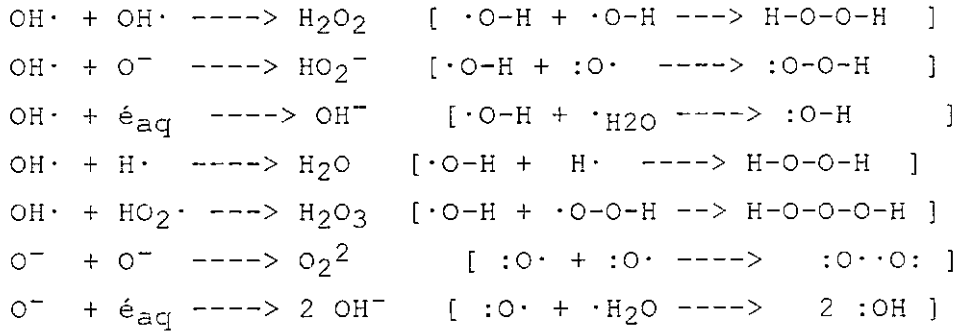
O zamandan beri  $OH\cdot$  `in sulu solüsyonlarda pekçok reaksiyona katıldığı , kimyasal, fotokimyasal, elektrokimyasal ve radyolitik reaksiyonlarda oluşturulduğu bilinir. Daha sonraları hidroksil radikalinin biyolojik sistemlerde de oluşturulduğu ve fizyolojik işlemlerde aktif bir aracı olarak rol oynadığı gösterildi. (51)

Kısa yarıömrü ve yüksek reaktivitesi nedeniyle doğrudan saptanması çok zordur. Hidroksil radikalının difüzyon kontrollü hız sabitlerine yakın hızlarda pekçok organik bileşikle etkileştiği ve  $6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  'lik bir k değerine sahip olduğu saptandı. Bu nedenle saf sistemlerde bile bu radikal çok kısa bir yarı ömre ve çok düşük bir konsantrasyona sahip olacağından saptamak çok zordur. Pulse radiolysis ve flash photolysis gibi yüksek şiddetli kısa akım metodları  $\text{OH}\cdot$  üretmeye kullanıldığı zaman  $10^{-5} - 10^{-3} \text{ M}$  gibi yüksek konsantrasyonda üretmek mümkündür.  $\text{OH}\cdot$  çok zayıf bir asittir. Alkali formda  $\text{O}^-$  vererek disosiyeye olur. Bu olayı formüle edersek  $\text{OH}\cdot \rightarrow \text{O}^- + \text{H}^+$  Yukarıdaki formülün açılımı  $\cdot\text{O}-\text{H} \rightarrow \cdot\text{O}: + \text{H}^+$  şeklinde olur. Bu radikalın  $\text{pK}'$  sı pratikte bir  $\text{OH}\cdot$  dimeri olan  $\text{H}_2\text{O}_2$  nin  $\text{pK}'$  sınının aynı olarak 11.85 bulunmuştur.  $\text{OH}\cdot$  ve  $\text{O}^-$  nin absorpsiyon pikleri 240 nm dedir.  $\text{OH}\cdot$  in absorpsiyonu,  $\text{O}^-$  nin  $\sim 2$  katıdır.

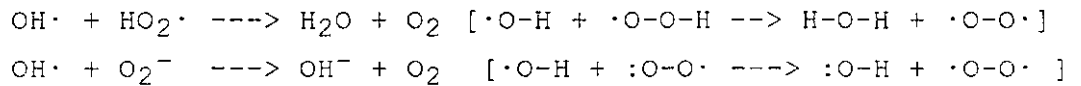
$\text{OH}\cdot$  en kuvvetli oksidan ajanlardan biridir.  $25^\circ\text{C}$ 'de standart elektrot potansiyeli  $E^0 = 1.83 \text{ V}$  olarak bulunmuştur. Bu radikal çok reaktif olduğundan birçok reaksiyona girer. Bu reaksiyonlar başlıca 5 grupta toplanır. (2, 9, 36, 51)

#### 1) Radikal-Radikal reaksiyonları :

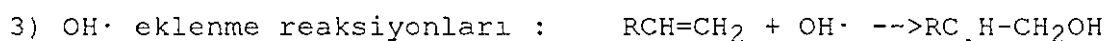
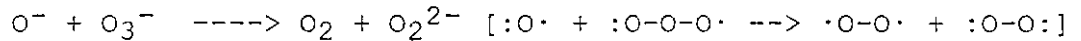
##### a) Rekombinasyon reaksiyonları



##### b) Dismutasyon reaksiyonları



##### c) Atom ve yük nakli reaksiyonları



4) Elektron nakil reaksiyonları :  $\text{OH}\cdot + \text{S} \rightarrow \text{OH}^- + \text{S}^+$

5) Karma reaksiyonlar :

#### BİYOLOJİK SİSTEMLERDE SERBEST RADİKAL ÜRETEN MEKANİZMALAR :

Biyolojik sistemlerde serbest radikaller (SR) normal metabolizma esnasında üretilmesi dışında iyonizan radyasyon, ilaç metabolizması, toksik maddeler gibi dış etkilerle de üretilebilir. Genel olarak biyolojik sistemlerde SR üreten mekanizmalar endojen ve eksojen olarak ikiye ayrılabilir.

#### SERBEST RADİKALLERİN ENDOJEN ÜRETİM KAYNAKLARI:

Normal metabolizmanın işleyişi esnasında SR ara ürün olarak oluşabilir. Oksidasyon-Redüksiyon reaksiyonlarında sürekli sabit olarak SR üretilir. Birtakım enzim sistemleri moleküler oksijenin süperoksite tek değerli redüksiyonunu katalizler. Bunlar arasında ksantin oksidaz, aldehit oksidaz, dihidroorotik dehidrogenaz, flavin dehidrogenaz ve peroksidazlar sayılabilir. Ayrıca nonenzimatik e transferi, katakolamin, flavin, redükte ferridoksin gerektiren otooksidasyon reaksiyonları, arakidonik asit metabolizması, iltihap hücresi yüzeyindeki NADPH Oksidaz sistemi tarafından solunum patlaması (respiratory burst) esnasında SR üretilir. (1,35,48,49,50,52,53)

Mitokondrial ve mikrozomal e transport zinciri, otooksidasyon reaksiyonları ve redoks reaksiyonları biyolojik sistemlerde SR'in başlıca üretim kaynaklarıdır.

#### MİTOKONDRIAL ELEKTRON TRANSPORT ZİNCİRİ

Mitokondrial solunum zinciri, mitokondri iç membranının yapısını oluşturan bir seri redoks katalisti içerir. Bunlar piridin nükleotidler, flavoproteinler, demir sülfür proteinler, ubikinon ve sitokromlardır. (54,58,59,64) Bu solunum zinciri taşıyıcıları -320 mV` dan +380 mV` a kadar değişen redoks potansiyellerine uygun olarak düzenlenmiştir. Bu nedenle termodinamik zemin üstünde tüm bu solunum zinciri taşıyıcılarının redükte formları moleküler oksijen tarafından okside hale dönüştürülür. Diğer bir deyişle bu taşıyıcılar üstlerinde bulunan e` ları sonuçta moleküler oksijene aktararak kendileri okside olurken, moleküler oksijeni suya redükler.  $[\text{O}_2-\text{H}_2\text{O}]$  bir redoks çiftidir ve standart redoks potansiyeli  $E_0 = 820 \text{ mV}$  tur. (54,64)

Mitokondrial é transport zincirinde NADH, FADH<sub>2</sub> den alınan é'ların taşınımı sırasında taşıyıcı moleküllerin indirgenmesi sonucu SR yapısında ürünler oluşmaktadır. Jensen 1966` da ilk defa mitokondride H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretildiğini saptadı.(56) Loschen 1974 te yıkanmış mitokondrial membranlarda süperoksit üretimini ilk defa saptadı.(57,64) Aslında mitokondride üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nin çoğu, mitokondride önceden üretilmiş süperoksitin dismutasyonu sonucu oluşur. Yani mitokondride üretilen O<sub>2</sub><sup>-</sup> , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nin prekürsörüdür.

Tümör hücrelerinde süperoksit üretimi konusunda ilk çalışma 1975` te Dionishi tarafından tümör hücre mitokondrilerinden elde edilen submitokondrial partiküllerde epinefrin ölçüm metodu ile süperoksitin tayini şeklinde yapılmıştır. Bu çalışmada antimisin ve süksinat mevcudiyetinde her iki tümör ve normal doku mitokondrilerinin süperoksit ürettiği bulunmuştur. Tayin adrenokrom oluşumu ölçülerek yapılmış ve SOD adrenokrom oluşumunu önlemiştir.Bu çalışmada ayrıca az SOD içeren normal dokudan alınan submitokondrial partiküllerin, çok SOD içeren sağlam normal doku mitokondrisine göre daha az H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşturduğu ayrıca az SOD içeren sağlam tümör mitokondrisinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşturmadığı sadece O<sub>2</sub><sup>-</sup> oluşturduğu saptandı.(11,60)

Sıçan kalbinde yapılan çalışmalarda, mitokondrial solunum zincirinde NADH dehidrogenaz basamağı ve Ubikinon-sitokrom c sitokrom b-566 bölgesinin süperoksitin başlıca üretildiği yerler olduğu saptandı. Solunum zinciri normal çalıştığı sürece mitokondri içi süperoksit ve hidrojen peroksit konsantrasyonu çok düşüktür.(50,61)

#### MİKROZOMAL MEMBRAN ELEKTRON TRANSPORT ZİNCİRİ

Plazma membranından türeyen kapanmış membran vezikülleri, endoplazmik retikulum, golgi kompleksi ve endozomları içine alan mikrozomal membran sistemi içinde ;

1)NADPH- Sitokrom P-450 redüktaz- sitokrom P-450 ve  
2)NADH- Sitokrom b<sub>5</sub> redüktaz - sitokrom b<sub>5</sub> komplekslerini içeren iki çeşit é transport zinciri bulunmaktadır. Bu sistemler karaciğerde safra asidi sentezi, D vitamini metabolizması, ilaçların ve ksenobiyotiklerin metabolize edilmesinde görev alır.(59,62)

Nonpolar - hidrofobik özellikler taşıyan normal metabolizma ara ürünleri hidroksilasyon işlemi ile hidroksillenerek polar-hidrofilik özellik kazanır. İlaçlar ve ksenobiyotikler de yine

birçoğu lipofilik (hidrofobik) bileşikler olduğundan, kolayca biyolojik membranlardan hücre yada hücre organeli içine geçer ve ancak daha hidrofilik bileşiklere oksidasyondan sonra atılabilir.

Hidroksilasyondan sonra sülfat yada glukuronat gibi polar rezidüler bağlanabilir yada hidroksilasyon işlemi N-dealkilasyon yada O-dealkilasyon ile sonuçlanabilir.(62)

Hidroksilasyon işleminde "monooksijenazlar" yada "mixed function oksidase" denen hidroksilaz enzimleri rol alır. Bu enzimlerin görevi  $RH + O_2 + AH_2 \xrightarrow{\text{hidroksilaz}} ROH + H_2O + A$  reaksiyonundan anlaşılacağı üzere substrata bir oksijen atomu sokarak onu hidroksillemek ve diğer oksijen atomunu suya redüklemektir. Ayrıca karaciğer mikrozomlarında doymuş yağ asitlerini doymamış hale çeviren ve Hem grubu içeren monooksijenazlar olan desatüraz enzim sistemleri vardır. Burada koredükten NADH ve ara é taşıyıcılar bir flavoprotein ve sitokrom b<sub>5</sub> denen bir sitokromdur. Elektron transport sistemlerinin işleyişi sırasında yalnız oksijen türevi serbest radikaller oluşurken, ksenobiyotiklerin metabolize edilmesi sırasında çok toksik olan karbon merkezli radikaller de oluşmaktadır.(62)

Sitokrom P-450 mikrozomal enzim sistemlerinin çeşitliliği ve çokluğu birçok hidrofobik bileşiğin hidroksilasyon ve detoksifikasyonuna yardımcı olurken bu arada ksenobiyotikleri oksitleme kapasitesi sitotoksik ve mitojenik olabilen daha zararlı türevlerin oluşumuna yol açabilmektedir. Örneğin polisiklik aromatik hidrokarbonlar, nitrozaminler ve aromatik aminler metabolize edilerek daha toksik olan karsinojenik formlara çevrilmektedir. Örneğin Benzo(a)piren (BaP) denen bileşik belirli noktalardan hidroksile edildiğinde detoksifiye edilip sülfat konjugasyonu ile atılırken eğer hidroksilasyon farklı noktalarda gerçekleşirse DNA`ya kovalent bağlanıp gen ekspresyonunu değiştiren toksik epoksit türevleri oluşabilmektedir.(62) Mikrozomal sitokrom P-450, peroksizomlarda bulunan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretim kaynağıdır. Ayrıca sitokrom b<sub>5</sub> ve flavin içeren oksidaz enzimlerinin aktivitesi ile oksijen radikallerinin oluştuğu saptanmıştır. Sıçan karaciğer mikrozomlarında NADPH bağımlı enzimatik lipid peroksidasyonu esnasında oksijen radikallerinin oluşumu spin trapping yöntemi ile ölçülmüştür.(63)

### OTOOKSİDASYON REAKSİYONLARI

Nonenzimatik e transferinin gerekleŖtiđi otooksidasyon reaksiyonları ile de moleküler oksijenin tek değerli redüksiyonu meydana gelir. Transisyon metal iyonları, redükte ferridoksinler, adrenelin v.b katekolaminler, tetrahidrobiopterin ( $BH_4$ ), glutatyon, sistein gibi tioller, flavin koenzimleri, kinon türevleri (hidrokinon +  $O_2 \rightarrow$  Semikinon $\cdot$  +  $O_2^-$  +  $H^+$ ), askorbat, antibiyotikler gibi küçük moleküller vücutta moleküler oksijenle redoks reaksiyonlarına girerek serbest radikal oluşturur. (1,2,9,21)

### OKSİDASYON YAPAN ENZİMLERİN KATILDIĞI REAKSİYONLAR :

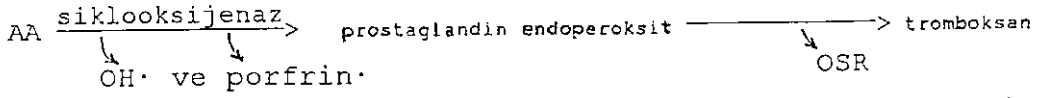
Vücutta serbest radikal oluşumunun önemli bir kaynağı olarak, birtakım enzim sistemleri moleküler oksijenin süperoksit anyon radikaline tek değerli redüksiyonunu katalizler. Bunlar arasında ksantin oksidaz, aldehit oksidaz, dihidroorotik dehidrogenaz, peroksidazlar, triptofan dioksijenaz sayılabilir. Ayrıca serbest radikaller, özellikle de süperoksit anyon radikali, makrofaj, monosit, eozinofil, nötrofilleri içeren iltihap hücrelerinin sitoplazmik membranlarında bulunan "NADPH oksidaz sistemi" tarafından üretilir. (1,33,48,49,50,52,53)

Fagositik hücreler aktive olduğu zaman aniden büyük miktarda oksijen kullanarak onu süperoksit anyonuna çevirir. Bu işleme "respiratory burst" (solunum patlaması) denir ve NADPH oksidaza bağımlıdır. Bu oksidaz sistemi fagositlerin sitotoksik etkisinden sorumlu faktörlerden biridir. Peroksizomlar denen belirli hücre organellerinde bulunan bazı oksidazlar tarafından, moleküler oksijenin divalan redüksiyonu ise  $H_2O_2$  üretir. Bu oksidazlara örnek olarak D-aminoasit oksidaz, glikolat oksidaz, yağ asidi açıl Ko A oksidaz, L-alfa hidroksiasit oksidaz, urat oksidaz gibi enzimler verilebilir. (1,2,21,50)

Hidroksil radikalinin aşırı reaktivitesinden beklenebileceği gibi onu substrat olarak kullanan enzim sistemleri yoktur. Ancak bu radikaller Fenton reaksiyonundaki gibi hidrojen peroksitin ferröz ve kuprik iyonları ile temas ettiği her durumda nonenzimatik olarak oluşturulur.  $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH\cdot + OH^-$

Bu radikal ayrıca demir katalizli Haber-Weiss reaksiyonu ile de oluşturulur.  $O_2^- + H_2O_2 \xrightarrow{\text{Fe tuzu}} O_2 + OH\cdot + OH^-$

Ayrıca arakidonik (AA) metabolizması esnasında enzimatik oksidasyon ile OSR ara ürün olarak oluşur. (35,66)



OSR fosfolipaz aktivasyonu ile prostaglandin ve tromboksan B<sub>2</sub> sentezini sağlar. Eğer ortama radikal scavengerler konursa Tx B<sub>2</sub> sentezi önlenir. (21)

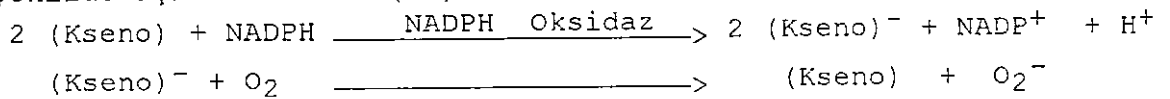
#### OKSİJEN SERBEST RADİKALİ OLUŞTURAN EKSOJEN NEDENLER

##### A) KSENOBİYOTİKLER :

Bu grupta pekçok kimyasal madde bulunur. Bunlar vücutta toksik yada karsinojenik olan reaktif radikallere dönüşür. Bu radikaller OSR ve ksenobiyotiklerin kendi radikalleridir. Bu metabolik aktivasyonun büyük kısmı sitokrom P-450 monooksijenazlar sayesinde olmakla birlikte pekçok diğer enzim ve hücre sel komponentlerin de bu aktivasyonda görev aldığı saptanmıştır. Örneğin prostaglandin sentetaz, aromatik aminler ve nitrofuranlar tarafından oluşturulan mesane kanseri indüksiyonunda ve fenasetin ile asetaminofenin yaptığı nefrotoksite görevlidir. Hidroperoksit bağımlı biyoaktivasyon, polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) yaptığı mesane kanserinde görevlidir. (67)

Ksenobiyotiklerin metabolik aktivasyonu ayrıca polimorf nüveli lökositlerin (PNL) oksidatif patlaması esnasında oluşabilir. Bu olayda büyük miktarda OSR oluşumunda pekçok lizozomal ve peroksidatif enzim salınır. (67)

Ksenobiyotikler enzim katalizli reaksiyonlar ile moleküler oksijene bir yada iki e aktarır. Bu gruba giren pekçok toksik bileşikler arasında kinon, dipiridil, nitro ve azo grubu içerenler vardır. Ksenobiyotiklerin OSR oluşturma mekanizması şu şekilde açıklanabilir. (68)



Süperoksit anyonu reaktif oksijen türlerinin metabolik üretiminde bir prekürsördür. Süperoksit oluştuktan sonra ondan diğer OSR' i (HO<sub>2</sub>·, OH·, RO<sub>2</sub>·, RO·, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) daha önce belirtilen reaksiyonlar ile oluşturulabilir. (68)

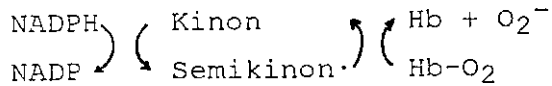
## 1) KINON TÜREVLERİ :

Bu grupta karsinojen olan bazı polisiklik aromatik hidrokarbonlar özellikle BaP, 6 metil BaP(1,24,25,76,77) ile antikarsinojen olan

- a) Benzantrakinon grubu (Adriamisin, daunomisin, karminomisin, rubidazon, nogalomisin, steffimisin, aklasinomisin A )
- b) N-Heterosiklik kinonlar (Mitomisin c, streptonigrin)
- c) Naftokinon grubu (lapakon) ilaçlar yer alır.(11,70,77,78)

Oldukça aktif olan bu antikanser ilaçlar, mikrozomlar ile etkileşir ve serbest radikal taşıyıcıları olarak görev yapar.(11) Sıçan ve farelerin değişik dokularından elde edilen mikrozomlarda bu ilaçlar ile yapılan birçok çalışmada bunların NADPH` tan moleküler oksijene e akışını artırdığı "mikrozomal oksijen tüketim hızı" ve "NADPH oksidasyon hızı " teknikleri ile ölçülmüştür.(11,31,69,70) Ayrıca oluşturdukları serbest radikaller "elektron spin rezonans (ESR)" tekniği ile saptanmıştır. (71)

Yine bu ilaçlar eritrositler ile muamele edildiğinde oksi-hemoglobin yokluğunda belirgin şekilde bozulmuş olan heksoz monofosfat şantı aktivitesini uyardı. Bu bileşikler tarafından hidrojen peroksit üretildiğine ait deliller redükte glutatyonun (GSH) oksidasyonu , <sup>14</sup>C-Format oksidasyonu ve CAT- Aminotriazol teknikleri ile saptandı. Bu deneyler kinon grubu ilaçların OSR üretmeye oksiHb ile etkileştiğini gösterir.(11,72)



Kinon türevlerinin oluşturduğu radikal hasarı CAT, SOD, Vit E gibi bazı antioksidanların kullanımı ile önlenabilir.(21,31)

Kinon grubu ilaçların antikanser etkisi dışında kardiyotoksik etkisinden de serbest radikal oluşturucu ve lipid peroksidasyonu yapıcı etkilerinin sorumlu olduğu anlaşılmıştır.Bu maddeler semikinon radikali oluşturmak üzere kalp mitokondrisinin flavoenzimleri tarafından enzimatik redüksiyona girer. Oksijen mevcudiyetinde semikinon radikalının redoks siklusu süperoksit ve hidrojen peroksit oluşumu ile sonuçlanır.(11)

## 2) ELEKTRON TRANSPORT ZİNCİRİNİ İNHİBE EDEN MADDELER

Normalde fizyolojik şartlarda mikrozomal ve mitokondrial é nakil sistemlerinde az miktarda OSR oluşabilir. Bu sistemler de-ğişik basamaklarda inhibe edilirse büyük miktarda OSR oluşmaktadır. Bu inhibitörler Pierisidin A, Amobarbital, Rotenon, Dimerkaprol, Hidroksikinolin N-oksit, Antimisin A, Karbonmonoksit (CO), Siyanid (CN), Karboksın, 2-Tenoil trifloroaseton (TTFA) ve Oligomisin gibi maddelerdir. (58,59,61,62,73)

## 3) FENTON REAKSİYONU OLUŞTURARAK ETKİ EDEN MADDELER

Umezawa tarafından streptomyces verticillus`tan izole edilerek kanser kemoterapisinde kullanılan glikopeptid yapılı bir antibiyotik olan bleomisin, hücre üstünde mitoz inhibisyonu, DNA sentezi inhibisyonu ve DNA zincir kırığı yapıcı etkilere sahiptir.(28) Bleomisinin bu etkileri, tek başına da DNA`ya zarar verebilen 2-Merkaptoetanol (ME), ditiyotreitol, askorbat, hidrojen peroksit gibi redükten ajanların mevcudiyetinde belirgin derecede artar. (11,28)

Süperoksit radikali ve Fe(II)`nin de bleomisin tarafından DNA yıkımında redükten ajan şeklinde etki edebildikleri gösterilmiştir. Talisomisin de bleomisin ile aynı etkilere sahiptir. Bu tür maddeler Fe(II), Cu(I), Co(II) iyonları ve organik hidroperoksitler yada hidrojen peroksit mevcudiyetinde hidroksil(OH·) ve alkoksil(RO·) radikalleri üretirler.Lipid peroksidasyonuna neden olurlar. Bazı çalışmalarda spin trapping tekniği ile OH· dışında O<sub>2</sub><sup>-</sup> ürettikleri de saptanmıştır.(11,74)

Talisomisin ve bleomisinin bu etkileri, özellikle de DNA yıkıcı etkileri SOD,CAT ve izopropil alkol gibi diğer serbest radikal yokedicilerle önlenmiştir.(11)

## 4) DİĞER MADDELER

a) Ara metabolitleri sayesinde moleküler oksijene tek é naklederek OSR oluşumuna neden olan Nitroaromatik ilaçlar

b) Hidrojen peroksit üretiminde görevli enzimleri içeren peroksizomların hücre içi miktarını artırarak aşırı hidrojen peroksit üretimine neden olan ve peroksizom proliferatörü denen di(2-etilheksil) fitalat, Aflatoksin B<sub>1</sub>, Asbest, Nafenopin, Klofibrat gibi kimyasal yapıları birbirinden çok farklı olan maddeler (22,75)

c) Yine kimyasal yapıları çok değişik olan karbon tetraklorür ( $CCl_4$ ), Parakuat (metil violojen), Azo bileşikleri, Fenil hidrazin gibi maddeler metabolizmaları sırasında OSR oluşturarak kanserogeneizde rol alır. (21,24,65)

Karbontetraklorür yağ çözücü bir solvent olarak endüstride kullanılır. Hatta zararlı etkileri saptanıncaya dek kuru temizleyicilerde leke çıkarmak amacıyla kullanılıyordu. Bu madde deriden emilir ve insan dahil tüm türlerde hepatotoksiktir. Hepatotoksite derecesi yağlanmadan siroz ve kansere dek kullanılan doz ve canlı türüne göre değişebilir. Bu hepatotoksite karaciğer mikrozomal "mixed function oxidase" sisteminin sitokrom P-450 tarafından ( $CCl_3\cdot$ ) radikali oluşturmak amacıyla redüktif dehalojenasyonu söz konusudur. Bu türevler muhtemelen hücrenel makromoleküllere bağlanmada gereklidir.  $CCl_3\cdot$  radikali triklorometil peroksil radikali ( $CCl_3O_2\cdot$ ) oluşturmak amacıyla moleküler oksijenle reaksiyona girer.

$CCl_3\cdot + O_2 \rightarrow CCl_3O_2\cdot$  Oluşan triklorometil peroksil radikali ise poliansature yağ asitleri ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu başlatır. Sonuçta oluşan lipid peroksidasyonunun aldehit ürünlerinin karaciğer toksitesinden sorumlu olduğu kabul edilmektedir. (21)

Bir bitki zehiri olan parakuat yanlılıkla alındığında insan vücudunda akciğer, karaciğer ve böbrek toksitesi yapar. Parakuat piridinil katyonunun redoks döngüsüne girmesi sonucu aşırı miktarda oluşturulan süperoksit radikali ve bu radikalin Fe mevcudiyetinde ortamda bulunan hidrojen peroksit ile reaksiyona girmesinden oluşturulan aşırı reaktif hidroksil radikali lipid peroksidasyonunu başlatarak bu toksiteden sorumludur. (21)

#### B) RADYASYON :

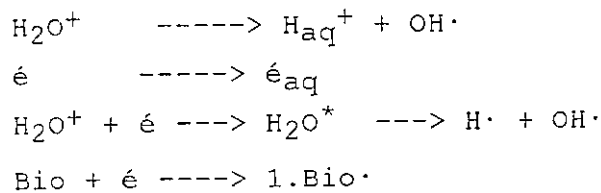
Biyolojik sistemlerde radyasyon hasarı geniş ölçüde araştırılmıştır. Her çeşit radyasyon (iyonizan - noniyonizan) biyolojik hasar yapabilir. Alfa, beta, gama radyasyon, X-ışını yayılımı ve UV radyasyona bağlı hasarlarda reaktif oksijen türlerinin oluşumunun önemli rol oynadığı saptanmıştır. (9,79)

İrradyasyondan sonra birincil olarak ilk 1-2 mikrosaniye içinde  $H\cdot$ ,  $OH\cdot$ ,  $e_{aq}^-$  ve biyolojik radikal ( $Bio\cdot$ ) hasarı, daha sonra ikincil olarak ilk birkaç mikrosaniye ile birkaç saat arası peroksi radikali ( $RO_2\cdot$ ) ve ikincil biyoradikallere bağlı hasar, bundan sonra birincil ve ikincil radikaller ile etkileşimden

oluşan birçok organik - biyokimyasal radikal moleküllerine bağlı hasar oluşur. Bu arada DNA, RNA, yapısal proteinler ve enzimler gibi birçok makromoleküller etkilenir. İlk iki yılda metabolik bozukluklar gibi akut, iki yıldan sonra ise neoplazi gibi geç patolojik etkiler meydana gelir. (79)

Biyolojik sistemler radyasyon hasarına karşı sülfidril (SH) grubu içeren sistein gibi bileşikler ile DNA tamir enzimleri ve antioksidan enzimler gibi koruyucu komponentlere sahiptir. İyonizan radyasyonun hücre öldürücü etkisi, hücre içeriğinin büyük kısmını oluşturan suyun radyolizinden kaynaklanan serbest radikallere bağlıdır. Suyun radyolizi ile  $\text{OH}\cdot$  ve  $\text{e}_{\text{aq}}^-$  oluşur. Hidrate elektron ( $\text{e}_{\text{aq}}^-$ ) nükleofilik eklenme ile radikal anyonu oluşturur.  $\text{R} + \text{e}_{\text{aq}}^- \rightarrow \text{R}\cdot$  Radikal anyonunun moleküler oksijenle reaksiyonu organik peroksil radikali üretimine yol açar.  $\text{R}\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{RO}_2\cdot$  Radyasyondan en büyük zararı gören makromolekül DNA'dır. Hidroksil radikali, DNA komponentleri ile  $\text{e}_{\text{aq}}^-$  'dan 4 kere daha hızlı reaksiyona girer. DNA'nın her iki baz ve şeker kısımları etkilenir. (21,79)

Pulse radyolizis örneğindeki gibi sulu solüsyonlardan yüksek enerjili radyasyon ( 60-100 eV/atom ) geçirerek oluşturulan radyolizde tüm enerji dağılımı  $10^{-14}$  sn 'de meydana gelir. Enerji ; 1- İyonizasyon  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}^+ + \text{e}^-$   
2- Eksitasyon  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}^*$  ( $\text{e}^-$ 'un enj düzeyi değişmiş) için kullanılır. Oluşan ürünler ( $\text{H}_2\text{O}^+$ ,  $\text{e}^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}^*$ ),  $10^{-12}$  sn içinde aşırı reaktif olan "birincil radikal türlerine" çevrilir. Bunlar  $\text{e}_{\text{aq}}^-$ ,  $\text{H}\cdot$ ,  $\text{OH}\cdot$ , 1.Bio $\cdot$  'dir.



Daha sonra "ikincil radikal türleri" oluşturulur. Oluşan bu yeni türler  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{RO}_2\cdot$ , 2.Bio $\cdot$  'lerdir. (80)

### C) ULTRASOUND :

Su içeren ve içermeyen solüsyonlarda ultrasound dalgaları tarafından kavitasyon denen olay sayesinde serbest radikal üretildiği, oluşan  $\text{OH}\cdot$  radikali ve  $\text{H}\cdot$  atomlarının "spin trapping" tekniği ve "ESR" teknikleri ile saptandığı bildirilmiştir. (81)

## ANTIÖKSİDANLAR

Başlıca endojen ve eksojen diye ikiye ayrılır.

### A) ENDOJEN ANTIÖKSİDANLAR :

Enzim yapısında olan ve olmayan antioksidanlar olarak iki gruptur.

1) Enzim yapısında olanlar : Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi, Glutatyon S transferazlar, Hidroperoksidaz, Glutatyon redükraz gibi enzimlerdir. (1,2,9,10,35,142)

2) Enzim yapısında olmayanlar : Bunlar da suda çözünen ve yağda çözünenler olarak ikiye ayrılır.

a) Suda çözünenler: Kan plazması yada hücre sitozolünde bulunan glutatyon, sistein, metiyonin, ergotiyonin (22,82), urat, melatonin, biliverdin, bilirübin (9,83), ferritin, transferrin, seruloplazmin, laktoferrin, albumin (9), östrojen hormonu özellikle de katekol östrojenler (84,87), askorbik asit (22,143)

b) Yağda çözünenler : alfa-Tokoferol, retinolün ön maddesi olan beta-karoten (22), plazmalogenler (86)

### B) EKSOJEN ANTIÖKSİDANLAR

a) NADPH oksidaz inhibitörleri:  $Ca^{2+}$  kanal blokörleri(85), lokal anestetikler, nonsteroid antiinflamatuvar ajanlar, adenozin , difenil iyodonyum, cetiedil (35,147)

b) Ksantin oksidaz inhibitörleri : Allopurinol, oksipurinol, pterin aldehit, tungsten(145)

c) GSH-PX aktivitesini artıranlar : N-Asetil sistein (NAC), ebselen (35)

d) Rekombinant SOD (144,149)

e) Diğer nonenzimatik antioksidanlar : Trolox-C (E vit analogu), Dimetilsülfoksit (DMSO), mannitol, desferroksamin gibi demir bağlayıcılar(145), nötrofil adezyon inhibitörleri, sitokinler interferon, interlökin-I (11,35) ve kan kolesterolünü düşürmeye kullanılan lipid peroksidasyonunun güçlü bir zincir kırıcı inhibitörü olan probukol.(2)

### BİYOLOJİK SİSTEMLERDE RADİKAL HASARI GÖRÜLEN BİYOMOLEKÜLLER

Serbest radikaller aşırı reaktiviteleri nedeniyle canlılarda bulunan hemen her çeşit biyomoleküllere hasar verir. Bunlar arasında nükleik asitler, lipidler, proteinler, serbest amino asitler, lipoproteinler, karbonhidratlar ve bunlardan türeyen kompleks biyomoleküller sayılabilir. (2,9,22,36)

Serbest radikallerin reaktivitesi değişir. Bazıları bağıl olarak stabildir. Ama birçoğu aşırı reaktif ve anstabildir. Serbest radikaller çok kısa ömürlüdür. OSR`in en reaktif olanı 37 °C` de  $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  `lik bimoleküler hız sabiti ile etanolü oksitleyen  $\text{OH}\cdot$  radikalidir.  $\text{OH}\cdot + \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} \text{ ---> } \text{H}_2\text{O} + \text{CH}_3\text{CHOH}$

Reaktiviteleri nedeniyle pekçok serbest radikal  $10^{-4} - 10^{-9} \text{ M}$  arası düşük konsantrasyonda bulunur ve oluştuğu bölgeden uzaklaşmaz. Hücre içinde hidroksil radikalinin hareketi için ortalama yarıçap 30 Angströmdür. Sadece birkaç mikrosaniyelik bir yarı ömre sahiptir. Böylece mitokondride yada mikrozoamlarda oluşan bir serbest radikalın hücrenin diğer bölümlerini (ör:çekirdek içi DNA`yı) doğrudan etkilemesi olanak dışıdır. Serbest radikaller hem oksidan hem de redükthan ajan olarak davranabilir. Bir serbest radikal radikal olmayan bir bileşikle reaksiyona girdiği zaman, başka serbest radikaller oluşturabilir. Bu olay binlerce reaksiyon uzunluğunda olan zincir reaksiyonlarını başlatır. Yani serbest radikal oluşumunun indüklenmesini mümkün kılar. (1)

Başlangıçta oluşan ilk serbest radikal sadece bölgesel etkiler üretmesine rağmen, ondan oluşan ikincil radikaller ve bu radikallerin girdiği zincirleme reaksiyonların yıkım ürünleri, ilk serbest radikalın oluşturulduğu bölgenin çok uzağında biyolojik hasar yapıcı etkilere sahip olabilir. (1,36)

İki serbest radikal birbiri ile reaksiyona girdiği zaman bir stabil (kararlı) molekül oluşturulabilir. Bu olay serbest radikal indüklü zincirleme reaksiyonların sonlanmasını açıklamaya yardım eder. Süperoksit radikali çok reaktif bir tür olmadığı halde potansiyel olarak toksiktir. Çünkü eğer süperoksit hidrojen peroksite dismute edilirse yada hidrojen peroksitle birlikte transisyon metal iyonları varlığında hidroksil radikali oluşturursa ciddi biyolojik hasar oluşturur. (1,65,89)

Hidrojen peroksit molekülünün kendisi hücrelere doğrudan toksik olmadığı halde biyolojik membranlardan kolayca geçebildiği (ör: hücre membranı, mitokondri membranı, çekirdek membranı, mikrozomal membranlar vb) ve metal iyonları süperoksit anyonu gibi redükthan madde varlığında kolayca hidroksil radikaline dönüşebildiği için dolaylı yoldan potansiyel olarak toksik kabul edilir. Hidroksil radikali ise hangi biyolojik molekül ile yakınlık içinde ise onunla reaksiyona girecektir. Örneğin lipid peroksidasyonunu başlatacak, DNA zincirlerini kıracak, enzimlerin

sülfidril (SH) gruplarını okside ederek enzim inaktivasyonuna yol açabilecek yada polisakkarit depolimerizasyonu yapabilecektir.

#### DNA` DA MEYDANA GELEN SERBEST RADİKAL HASARI

Serbest radikaller DNA` da çeşitli mekanizmalar ile hasar yapar. Özellikle  $Ca^{2+}$  a bağımlı endonükleaz aktivasyonu ile (88)yada DNA` nın baz ve şeker komponentleri ile doğrudan reaksiyona girerek DNA hasarına yol açar.(21) Oluşan en önemli 3 reaksiyon tipi;

- 1) Tek zincir kırıkları
- 2) Çift zincir kırıkları
- 3) Baz hasarıdır.(21,23)

Ayrıca tek baz baz değişimleri, baz silinmeleri, baz eklenmeleri, çerçeve kaymaları yada gen içi birçok bölgede kompleks düzenlenmeler şeklinde mutajenik, karsinojenik DNA hasarlanmalarına sebep olduğu bilinmektedir.(14)

OSR tarafından gen ifadesinin değiştirilmesi ile sonuçlanan epigenetik bir mekanizma son zamanlarda önerilmiştir. (21)

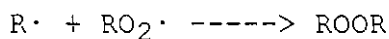
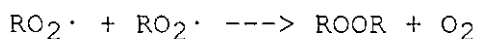
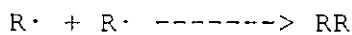
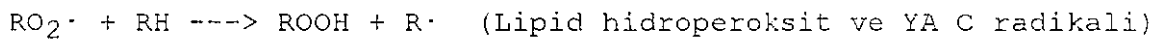
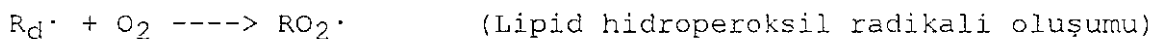
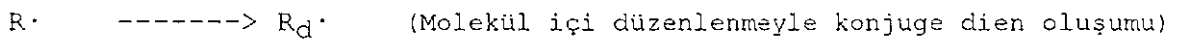
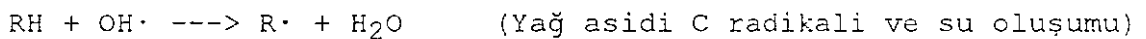
Polisentetaz (ADP riboz sentetaz) enzimi sentezinin OSR tarafından uyarılabildiği gibi DNA kırıkları ile de uyarıldığı bilinir.(21,89) OSR tarafından oluşturulan oksidatif stres aynı zamanda enzim için bir substrat olarak davranan  $NAD^+$  nin aşırı üretimine yol açar. Artmış ADP-Riboz sentetaz enzim aktivitesi ile artmış  $NAD^+$  kombinasyonu , kromozomal materyalin artmış poli-ADP ribozilasyonu ve sonuçta gen ifadesinin değiştirilmesi ile sonuçlanır. Bu sırada protoonkogen aktivasyonu olabileceği düşünülmektedir.(22,89)

Hidrojen peroksit biyolojik membranlardan kolayca geçebildiği için eğer DNA` ya ulaşırsa ortamdaki metal iyonları ile etkileşerek Fenton reaksiyonu başlatıp, hidroksil radikalleri oluşturarak DNA`ya hasar verebilir.(2,49,50)

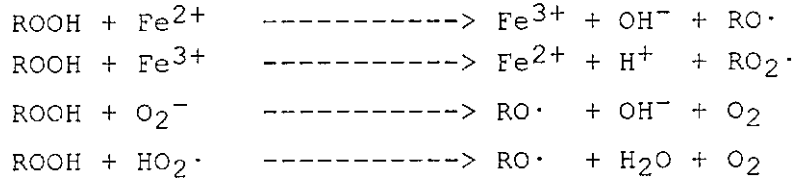
Serbest radikallerin oluşturdukları DNA hasarı çeşitli yöntemler ile saptanabilir. Bu yöntemler arasında DNA baz dizisi tayini gibi komplike moleküler biyolojik yöntemler olabildiği gibi daha basit olan ve serbest radikaller tarafından oksitlenen DNA bazlarının, DNA tamir enzimleri tarafından DNA yapısından çıkarılarak, idrarla atılması esnasında idrarda tayinine dayanan metodlar da kullanılabilir.(9,14)

### OKSİJEN SERBEST RADİKALLERİN YAPTIĞI LİPİD PEROKSİDASYONU :

Hücrel membranların fosfolipid yapıda olduğunu hatırlayacak olursak, özellikle bu yapıda bulunan poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu hücrel membranları ciddi şekilde hasarlandırır. Bu nedenle membran akışkanlığı azalır, membran salınım fonksiyonları bozulur, membran geçirgenliği ve transmembran iyonik gradient bozulur. (21) Bu otooksidasyon reaksiyonu  $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{HO}_2\cdot$  radikalleri ve muhtemelen singlet oksijen tarafından başlatılabilir. Fakat daha az reaktif olan süperoksit yada hidrojen peroksit moleküllerinin kendisi tarafından direkt olarak başlatılmaz. Lipid peroksidasyon zinciri reaksiyonlarının ilk aşaması olan başlangıç (initiation) evresinde, serbest radikaller yağ asitlerinin (RH) C zincirinin metilen gruplarının birinden bir H atomu uzaklaştırır. Böylece poliansatüre yağ asitlerinin bir C radikali ( $\text{R}\cdot$ ) oluşur ve zincirleme peroksidasyon reaksiyonları başlar. Yayılma (propagasyon) evresinde daha sonra hızla, bir lipid hidroperoksil radikali ( $\text{RO}_2\cdot$ ) oluşturmak amacı ile moleküler oksijen ile reaksiyona girecek olan "konjuge dien" ( $\text{R}_d\cdot$ ) oluşturulur. Dien konjugasyonu denen olay başlangıçta oluşan C radikalini stabilize etmek için molekül içi yeniden düzenlenme ile çift bağların normal diziliminin bozularak birer C aralıklarla yeniden çifte bağ oluşmasıdır. Oluşan konjuge dien moleküler oksijen ile reaksiyona girerek lipid hidroperoksil radikali ( $\text{RO}_2\cdot$ ) oluşturur. Bu son oluşan radikal de çok reaktif olduğundan, komşu poliansatüre yağ asitleri ile reaksiyona girip lipid hidroperoksit ( $\text{ROOH}$ ) ve yağ asidi (YA) C radikali ( $\text{R}\cdot$ ) oluşturarak lipid peroksidasyon zincirini sürdürür. Bu zincir ancak, iki serbest radikalın birbiri ile reaksiyona girerek, radikal yapısında olmayan stabil bir ürün oluşması ile yada radikal yok edici (scavenger) denen antioksidan maddelerin etkisi ile sonlanır. (1,36,65)



Lipid hidroperoksit (ROOH), süperoksit anyon radikali ( $O_2^-$ ) perhidroksi radikali ( $HO_2\cdot$ ) yada transisyon metal iyonları ile temas edene dek stabil bir bileşiktir. Ancak metal iyonları varlığında, diğer zincir reaksiyonlarını başlatıp sürdüren, alkoksi radikali ( $RO\cdot$ ) ve peroksi radikali ( $RO_2\cdot$ ) gibi başka radikaller üretir. (36)



Böyle bir lipid peroksidasyon reaksiyonunun son ürünleri aldehitler, hidrokarbon gazlar ve malondialdehit (MDA) içeren değişik kimyasal rezidülerdir. Bu yıkım ürünleri zincir reaksiyon bölgesinden uzaklara difüze olabilir ve hücre ödemine, damar geçirgenliğinin bozulmasına sebep olabilir. İltihabi olayları ve kemotaksisi etkileyebilir. Fosfolipaz aktivitesini değiştirebilir. Arakidonik asitin, değişik endoperoksitlerin ve prostaglandinlerin oluşumunu ve salınımını indükler. (1,9) Dien konjugasyon ürünleri UV spektrumda absorbans ölçümü ile (2) lipid peroksidasyon ürünleri özellikle MDA, tiyobarbitürik asit (TBA) li asit ortamda ısıtıldığı zaman oluşan renk reaksiyonu ile ölçülür. (2,65,90)

Serbest radikaller tarafından oluşturulan lipid peroksidasyonunun ; diabetes mellitus (3,91,146), hipertansiyon, ateroskleroz, yaşlanma, kanser (89), her tür dokunun postişkemik reperfüzyon hasarı (6,96), ksenobiyotik toksitesi (8,72,77,95,148), kollagen doku hastalıkları (94), senil demans, çeşitli beyin hastalıkları, senil katarakt (90,93,96), vitiligo ve çeşitli cilt hastalıkları (92) gibi daha birçok doku ve organı ilgilendiren patolojilerde rol oynadığı saptanmıştır. (22,24,72,93,97)

Lipid peroksidasyonunun önlenmesinde yağda çözünen bir vitamin olan vit E ile yapılan deneyler anlamlı sonuçlar vermiştir. (21,98)

### OKSİJEN SERBEST RADİKALLERİNİN YAPTIĞI PROTEİN HASARI

Serbest radikaller proteinlerin ve onların yapısındaki bazı aminoasitlerin, özellikle sistein, metiyonin, fenilalanin, tirozin triptofan ve histidin aminoasitlerinin hasarına neden olur. (99)

Serbest radikal aracılı enzim harabiyeti lizozim ve ATPase`- ların fotoinaktivasyonu ile gösterilmiştir. (Muhtemelen triptofanın hasarlanmasına bağlı) (100)

Histidin oksidasyonunun ise lipoamid ve alkol dehidrogenaz aktivitesinin kaybından sorumlu olduğu bulunmuştur. (100)

Ayrıca enzimlerin SH içeren metionin ve sistein aminoasitlerinin yapılarındaki sülfidril gruplarının oksidasyonu ile enzim inaktivasyonları saptanmıştır. (1,9)

Proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında da serbest radikal hasarına bağlı değişiklikler saptanmıştır. (101) Proteinlerdeki aminoasitlerin oksidasyonu ile oluşan 5 OH triptofan, N-Formil kinürenin, bitirozin gibi oksidasyon ürünlerinin fluoresan özellik gösterdikleri saptanmıştır. (9,99)

Amfizem, respiratuar distress sendromu, kollagen doku hastalıkları, katarakt gibi hastalıklarda, ilgili doku örneklerinde serbest radikal hasarına bağlı protein yıkım ürünleri saptanmıştır. (9)

### SERBEST RADİKALLERİN YAPTIĞI KARBONHİDRAT HASARI

Serbest radikaller, karbonhidratlar üstünde özellikle polisakkarit depolimerizasyonu ve monosakkarit otooksidasyonu yolu ile etki gösterir. (1,102)

Diabetes mellitusta katarakt ve mikroanjiopati gelişiminin altında yatan mekanizmalardan biri olarak serbest radikal hasarı saptanmıştır. Redükten bir madde olan glukozun, kanda yükselerek otooksidasyona uğraması sonucu, gözün lens dokusu ve tüm organların bağ doku proteinlerinde çapraz bağlanmalara neden olarak, protein agregasyonu ile bazal membran kalınlaşması neticesi gözde katarakt ve mikroanjiopati oluşturdukları düşünülmektedir. (9,102) Bu olay glukoz dışında diğer redükten monosakkaritler için de geçerlidir.

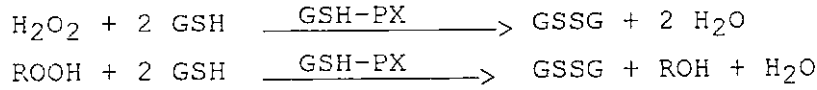
Ayrıca OSR`in eklem sıvısı viskozitesini sağlayan hyalüronik asit gibi proteoglikanların depolimerizasyonuna ve kırıldık dokuların parçalanmasına neden olduğu ve bu olayın romatoid artrit gelişimindeki etkenlerden biri olduğu bilinmektedir. (9)

### SERBEST RADİKAL HASARINDAN KORUNMADA GÖREVLİ MEKANİZMALAR

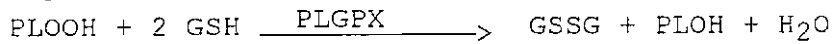
Her çeşit biyomolekül ile reaksiyona girip , hasar yapabilen serbest radikaller, fizyolojik dengeyi bozmakta ve patolojik durumların oluşmasına yol açmaktadır. Bu nedenle canlı organizmalar, aşırı reaktif olan bu türlere karşı korunmada görevli bazı "antioksidan mekanizmalar" a sahiptir. Bu savunma mekanizmaları daha önce antioksidanlar bahsinde değinildiği gibi, enzim yapısında olanlar ve olmayanlar şeklinde 2 ye ayrılır. Biz yaptığımız çalışmada, insanlarda bulunan en önemli üç antioksidan enzim olan "Glutasyon Peroksidaz", "Süperoksit Dismutaz" ve "Katalaz" enzimlerinin eritrosit içi aktivitelerini araştırdığımız için burada bu üç enzimle ilgili ayrıntılı bilgiler sunulacaktır.

#### GLUTATYON PEROKSİDAZ (GSH : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> OKSİDOREDÜKTAZ, EC 1.11.1.9)

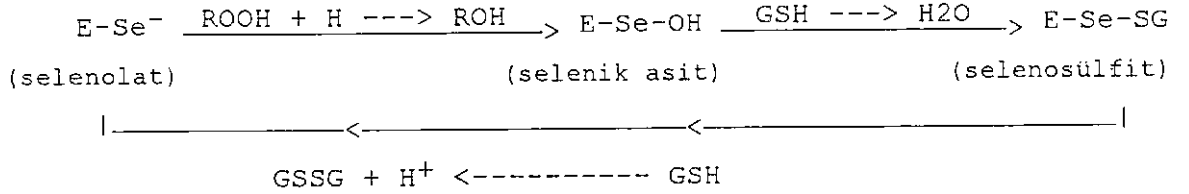
1957`de Mills tarafından keşfedilen ve hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu bir enzim olan Glutasyon Peroksidaz (GSH-PX) molekül ağırlığı 84000 olan, 4 selenyum (Se) atomu içeren, hem ve diğer prostetik grupları içermeyen, tetramerik yapıda, sitozolik bir enzimdir. (103,104,107) Bu enzim şu reaksiyonları katalizler.



"Fosfolipid hidroperoksit Glutasyon peroksidaz" (PHGPX), memelilerde saptanan ikinci selenoenzimdir. Bu enzimin SDS-PAGE de saptanan molekül ağırlığı ~ 20000 olup, aktif bölgesinde 1 Se atomu içeren, monomerik yapıda, soluble olan, sitozolik bir enzimdir. PHGPX ilk kez antiperoksidan aktivitesi izlenerek saflaştırılmış ve isimlendirilmiştir, bu nedenle orjinalde peroksidasyonu inhibe eden protein (PIP) adı verilmiştir. Bu enzim pekçok dokuda saptanmış olup yukarıdaki iki reaksiyona ilaveten membran yapısındaki fosfolipid hidroperoksitleri (PLOOH) alkollere indirger. Bu sayede vitamin E ile birlikte membran lipidlerini peroksidasyon hasarından korur. (105)



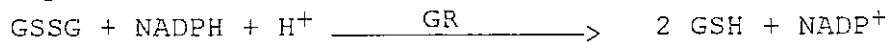
GSH-PX` in selenolat şekli (E-Se<sup>-</sup>), peroksit substratı--> alkole redüklerken, kendisi okside selenik aside (E-Se-OH) dönüşür. Bu aşamada GSH reaksiyona katılarak selenosülfit (E-Se-SG) oluşumuna yol açar. İkinci GSH, selenosülfite bağlanarak GSSG oluşumunu sağlarken, enzimin aktif şekli olan redükte durumdaki selenolat (E-Se<sup>-</sup>) açığa çıkar. (35,103,104)



Enzimimin redükte formu siyanide dirençli iken, okside formu siyanide duyarlıdır yani siyanidle inaktive edilir. Siyanid (CN<sup>-</sup>) GSH-PX`dan Se çıkararak enzimi inaktive eder. (103,104)

Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (G6PD) ve NADPH`ın genetik eksiklikleri, etkilenen eritrositleri peroksit hasarına duyarlı hale getirir. Buna karşın katalazın genetik eksikliğinde eritrositler peroksit hasarına duyarlı değildir. Bu bulgular insan eritrositlerinde hidrojen peroksitin uzaklaştırılmasında NADPH/GSH/GSH-PX yolunun geçerli olduğunu düşündürmüştür. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda memelilerdeki katalazın GSH-PX gibi NADPH bağımlı olduğu bulunmuştur. Her iki CAT ve GSH-PX fonksiyon için NADPH bağımlı olduğundan bu bulgu insan eritrositlerinde hidrojen peroksit detoksifikasyonunda her iki mekanizmanın rolü olduğu ihtimalini artırır. Nitekim yapılan bir çalışmada normal ve akatalazemik eritrositler kullanılmış ve G6PD enzimi eksik olan eritrositlerde hemoliz yapan miktardaki hidrojen peroksit varlığında bu hidrojen peroksitin destrüksiyonunun yarısının katalaz tarafından oluşturulduğu saptanmıştır. Bu sonuca göre katalaz ve glutatyon peroksidaz insan eritrositlerinde hidrojen peroksit detoksifikasyonunda eşit öneme sahiptir. (106)

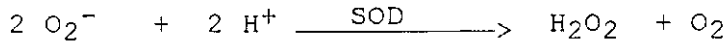
GSH-PX aktivitesi sonucu oluşan okside glutatyon (GSSG), glutatyon redüktaz (GR) enzimi tarafından tekrar GSH`a çevrilir.



Fagositlerde bulunan GSH-PX diğer antioksidanlarla birlikte respiratory burst denen solunum patlaması sırasında oluşan serbest radikallerin yaptığı peroksidasyon hasarından hücreyi korur.

**SÜPEROKSİT DİSMUTAZ: (SÜPEROKSİT OKSİDOREDÜKTAZ, EC 1.15.1.1)**

Süperoksit Dismutaz (SOD) enzimi, tüm aerobik organizmalarda bulunan, zorunlu anaerobik organizmalarda pek bulunmayan, ilk kez 1969'da Mc Cord & Fridowich tarafından tanımlanan (109), süperoksit ( $O_2^-$ ) radikalinin hidrojen peroksit'e dismutasyonunu katalizleyen bir grup metalloenzimdir. (108,109,110,111,112)



$V_{max}$  çok yüksektir. [  $k_2 = 2 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ] ve sadece  $O_2^-$ 'in difüzyon hızı ile sınırlanır. (58) Başlıca üç tip dismutaz vardır.

1. Cu-Zn SOD
2. Mn SOD
3. Fe SOD

**1) Cu-Zn SOD :**

Fungus, bitki, hayvan, insan hücreleri gibi ökaryot hücrelerde sitozol, nükleer membran ve mitokondri intermembran boşluğunda bulunan dismutazdır. Prokaryotlarda çok ender bulunur. Dimer yapıda olup, herbirinin molekül ağırlığı (MW)= 15600-16500 civarında olan birbirine eş iki monomerik subünitten meydana gelir. Dolayısı ile dimerik molekülün MW= 31000-33000 civarındadır. Herbir subünitte bir zincir içi disülfid bağı, bir asetillenmiş terminal amino grubu ile bir Cu ve bir Zn atomu içeren bir aktif bölge bulunur. Siyanide duyarlıdır. (11,13,108,113)

SDS-PAGE` de dimerik yapıllı holoenzimin molekül ağırlığı saptanmış, ortama merkaptotanol (ME) eklendiğinde ise iki subünitin polipeptid zincirleri arası disülfid (S-S) bağının redüksiyonu sonucu herbiri birer sülfidril (SH) grubu içeren iki zincir birbirinden ayrılarak tek bir monomerik subünitin molekül ağırlığı saptanmıştır. (114)

Cu-Zn SOD`lar polipeptid zincirlerin aminoasit kompozisyonuna bakıldığında temelde iki ortak özellik gösterir. Birincisi tirozin ve triptofan içeriği çok düşüktür. (0-0.5 %) İkincisi ise glisin içeriği çok yüksektir. (değişik türlerde 13-17 %)

Yüksek glisin içeriği, polipeptid zincirinde araya giren keskin kıvrımlar sonucu, aşırı derecede "beta plakalı tabakalı yapı" oluşmasında etkindir. (58,114)

$Cu^{2+}$  iyonu, SOD enzim aktivitesi için şarttır.  $Zn^{2+}$  ise  $Cu^{2+}$  ile birlikte enzimin stabilitesinin sağlanmasında görevlidir.  $Cu^{2+}$ 'ın yerini alabilecek başka bir metal iyonu yoktur. Halbuki  $Zn^{2+}$  yerine  $Hg^{2+}$  ve  $Co^{2+}$  girebilir. (115)

Birçok ökaryot ve hatta prokaryotlarda değişik varyantları saptanmıştır. Bu grubun çoğunluğunu ökaryotik hücrelerde bulunan sitozolik dismutaz oluşturur.

*Photobacterium leiognathi*, *paracoccus denitrificans* gibi prokaryotlarda, *neurospora crassa*, *fuzarium oxysporum*, *saccharomyces cerevisia* gibi funguslarda, bezelye, buğday, ıspanak gibi bitkiler ile tüm hayvanlarda ve insanlarda bulunur. Bunların çoğu dimerik yapıdadır. Son zamanlarda insan ve birçok hayvanın kan plazmasında tetramer yapıda MW= 130.000 olan Cu-Zn SOD izomeri saptanmıştır. (109,114,116,117,118,119,120)

Eritrositlerde de bulunan enzim membran lipidlerini peroksidasyondan ve O<sub>2</sub> indüklü hemolizden, hemoglobini ise methemoglobine oksidasyondan korur. (121)

Cu-Zn SOD aktivitesi pH= 5.5- 10 arasında stabildir. Bu sınırlar içindeki pH değişiminden etkilenmez.

Cu-Zn SOD, insanda 21 No'lu kromozomda lokalizedir ve (21 q 22) kromozomal bölgesinde haritalanmıştır. (122) Aynı bölge trizomi 21 diye bilinen Down sendromundaki kritik kromozom bölgesidir. Öyleyse bu bölgede bulunan insan SOD1 geni (h SOD1) sendromun gelişiminde rol oynayabilir. (122)

## 2) Mn SOD :

Etki mekanizması Cu-Zn SOD ile aynı olmakla beraber molekül ağırlığı, subünit yapısı, metal içerikleri yönünden hem Cu-Zn SOD'a göre hem de kendi içinde çeşitlilik gösteren bir enzimler grubudur. Mn SOD aktivitesi alkali pH'da stabil değildir. pH=7.8 ile 10 arasında pH arttıkça aktivite azalır. Bu özelliği onun Cu-Zn SOD'dan ayrımında kullanılmıştır. Bir kısım enzim dimer yapıda bir kısım ise tetramer yapıdadır. Metal içeriği ise subüniti oluşturan polipeptid zincirinin bir molü başına 0.5-1 g. atomdur. Yani bir dimerin yapısında 0.5 ila 1 Mn atomu bulunur. Bu dismutazların polipeptid zinciri Cu-Zn SOD'lara göre daha büyüktür. Monomerik subünitin MW= 19000-23000 arası değişir. (114)

Ökaryotlardaki Mn SOD genelde tetramerik yapıda olup molekül ağırlığı MW= 75000- 90000 arası değişir ve ökaryotik hücrelerin mitokondrilerinde bulunur. Buna karşın prokaryotlardaki Mn SOD genelde dimerik yapıda olup MW= 36000-46000 arası değişir. (114)

Mn SOD ilk olarak Keele tarafından 1970`te E.Coli sitozolünden izole edildi.(123) NMR spektroskopisi ile 1974`te  $Mn^{3+}$  içerdiği saptandı.(124) Mn SOD siyanide dirençlidir. (13)

İnsanlarda Mn SOD geni 6 No`lu kromozomda bulunur.(122) Halbuki Cu-Zn SOD geninin 21 No`lu kromozomda bulunduğunu söylemiştik. Öyleyse her iki enzim proteini farklı genler tarafından ifade edildiğine göre (gene expression) farklı primer yapıya sahip olacaktır.İnsan Cu-Zn SOD ve Mn SOD enzimlerinin aminoasit dizilimleri ile bu dizilimlerin karşılaştırması ve konu ile ilgili diğer şekil ve tablolar aşağıda verilmiştir.

### 3) Fe SOD :

Bu grup dismutazların da etki mekanizması diğerleri ile aynı olduğu halde, monomerik subünitin polipeptid zincirindeki aminoasit dizilimleri ve sayıları Cu-Zn SOD`dan çok farklı olup Mn SOD`a benzer.(114,125) Bu nedenle bu enzimlerde de Mn SOD`daki gibi monomerik subünitin molekül ağırlığı MW= 19000-23000 arasındadır. Genellikle bakterilerde, mavi-yeşil alglerde ve bazı bitkilerde bulunur.(58) Ökaryotlarda çok ender bulunduğundan prokaryotlara özgül olduğu söylenebilir.(58,114)

Mn SOD gibi Fe SOD enzimleri de molekül ağırlığı, subünit yapısı (dimerik yada tetramerik olması açısından), ve içerdiği metal iyonunun miktarı yönünden çeşitlilik gösterir.(114)

Fe SOD enziminde bulunan demir,  $Fe^{3+}$  tür.(126) Bu enzim ilk kez E.Coli`den izole edilmiştir.(127) Hatta daha sonra yapılan çalışmalarda PAGE`deki mobilitelerine göre E.Coli`de daha önce saptanan 2 çeşit SOD`a ilaveten [Mn SOD (128)ve Fe SOD (127)] her iki enzimin arasında göç eden yeni bir Fe SOD izole edilmiştir. Bu yeni izole edilen Fe SOD`un arada göç etmesinin sebebi, sahip olduğu 2 subünitten birinin Mn SOD, diğerinin ise Fe SOD yapısında olması, yani bu yeni enzimin aslında bir hibrit enzim olması nedeniyledir.Dimerik yapılu bu enzimin MW= 37000 olup, bir enzim molekülü 0.8 atom  $Fe^{3+}$  ve çok az miktarda  $Mn^{3+}$  içerir.(129)

Gerek Mn SOD gerekse Fe SOD`ların aminoasit kompozisyonlarına bakıldığında Cu-Zn SOD`lara göre glisin içeriği daha az, tirozin ve triptofan içeriği daha fazla bulunmuştur.(114)

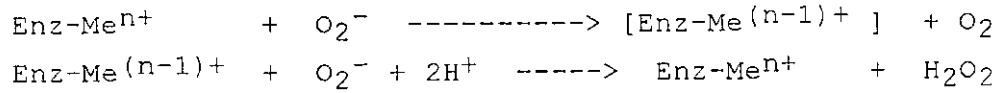
SOD enzimi,  $O_2$  toksitesine karşı savunma mekanizmasının bir komponenti olduğundan, bu enzimin zorunlu anaeroblarda

bulunmadığına inanılırdı. Fakat 1975 ve sonraki yıllarda yapılan çalışmalar, anaerob fotosentetik bakterilerde, sülfat indirgeyen bakterilerde, clostridia'da ve anaerob yeşil-mor renkli sülfür bakterileri olan chlorobium ve chromatium'da molekül ağırlığı, subünit yapısı, aminoasit kompozisyonu, absorpsiyon spektrumu ve  $O_2^-$  ile reaksiyon hızı açısından, aeroblarda bulunan Fe SOD'a çok benzeyen bir Fe SOD'un mevcudiyetini gösterdi.(125) Bu durumda hemen akla gelen soru, zorunlu anaerob organizmalarda,  $O_2$  toksitesine karşı savunmadan sorumlu bir enzim olan SOD'un neden bulunduğudır. Bu sorunun iki çeşit mantıklı açıklaması vardır.

1) Anaeroblar  $O_2$  siz ortamda yaşar ve ürerler. Ancak bu organizmalar  $O_2$  li ortama konursa üremeleri durur ama sınırlı bir süre yaşamaya devam ederler. İşte bu şartlarda otooksidasyonla üretilen süperoksit SOD tarafından yakalanır. Doğal olarak anaerob fotosentetik bakteriler ve diğer anaeroblar doğal çevre şartlarında hava ile temas edebilir. İşte bu durumda, yaşayabilmek için bir tolerans mekanizması gereklidir. Nitekim anaeroblarda,  $O_2$  toleransı ile SOD içeriği arasında korelasyon gösterilmiştir.(125)

2) Moleküler oksijenin ( $O_2$ ) yani havanın yokluğunda, süperoksitin tek muhtemel kaynağı, UV ışık ve X ışını gibi yüksek enerjili radyasyon tarafından suyun dekompozisyonudur. Bu anaerobik ( hava gerektirmeyen ) işlem tarafından oluşturulan süperoksit, anaeroblarda bulunan SOD tarafından yakalanmalıdır.

Dismutazların katalitik aktiviteleri  $Cu^{2+}$  ,  $Mn^{2+}$  ,  $Fe^{2+}$  içeriklerine bağlıdır. Böylece enzim katalizi ile metaller siklik redoks reaksiyonuna girer.(58)

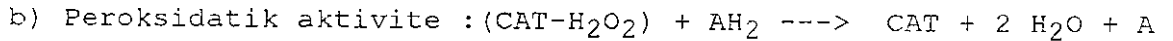
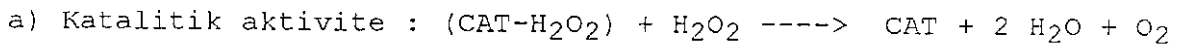
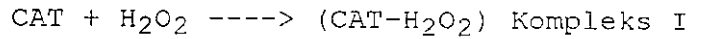


KATALAZ : (  $H_2O_2$  :  $H_2O_2$  OKSİDOREDÜKTAZ , EC 1.11.1.6 )

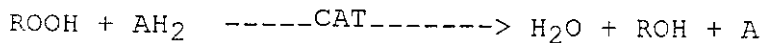
Hidrojen peroksiti, oksijen ve suya parçalayan bu enzimin etkisi ilk kez 1818'de Thenard tarafından hayvan dokularında saptanmıştır. 1901'de Loew bu etkinin özel bir enzim tarafından oluşturulduğunu belirlemiştir.

Katalaz , yapısında 4 adet Hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Peroksidaz aktivitesi dışında bu enzim, bir  $H_2O_2$  i é verici substrat, diğer  $H_2O_2$ ·i ise é alıcısı olarak kullanılabilir. Bu enzim tüm hayvan ve bitkilerde ayrıca bazı bakterilerde bulunur. 1923 te Warburg, enzim aktivitesinin siyanid ile önlendiğini ve bunun enzimin demir içermesi ile ilgisi olduğunu, 1930 yılında ise Hellström ve Zeile enzimin prostetik grubunun hematin olduğunu saptamıştır.

Katalaz enzimi, metil ve etil hidroperoksitler, formik asit, fenoller ile  $H_2O_2$  gibi küçük moleküllere etkilidir. Lipid hidroperoksitler gibi büyük moleküllere etki etmez. Bu enzimi ilk kez Dounce ve Sumner 1937'de kristalize şekilde saflaştırmıştır. Enzim- $H_2O_2$  kompleksi (kompleks I) oluştuktan sonra bu enzimin 2 çeşit aktivitesi vardır. (130,131)



Katalitik aktivite için 2  $H_2O_2$  molekülü reaksiyona girerken, peroksidatik aktivite için 1  $H_2O_2$  molekülü reaksiyona girer. Enzimin bu 2 çeşit aktivitesinden hangisini göstereceğini, bulunduğu hücrenin  $H_2O_2$  üretim hızı, yani hücre metabolizması belirler. Çünkü  $H_2O_2$  üretim hızı, dokulara ve hücrelere göre değişik düzeydedir. Katalazın  $H_2O_2$  dışında, metil yada etil hidroperoksitler, metanol, etanol, formik asit ve fenoller üstünde peroksidatik aktivite gösterdiğini söylemiştik. Bu olayı formüle edecek olursak;



Katalaz molekülü hayvanlarda tetramerik yapıda bulunur. Molekül yapısını oluşturan 4 subünitin herbirinin MW ~ 60000 olup, prostetik grup olarak bir  $Fe^{3+}$  bulunduran protoporfirin IX yani bir çeşit Hem içerir. Örneğin sığır karaciğer katalazının molekül ağırlığı MW= 248000 dir. Diğer türlerdeki katalaza çok benzer. Katalitik turnover hızı saniyede 44000  $H_2O_2$  molekülüdür. Sınırlı

difüze olur.(58) Katalaz, sitokrom sistemini içeren tüm aerobik hücrelerde bulunur. Anaerobik hücrelerden sadece radyasyona dirençli olan bakterilerde saptanmıştır. (132)

Hayvan dokularında selüler düzeyde özellikle eritrosit, karaciğer ve böbrek hücrelerinde, subselüler düzeyde ise karaciğer hücre organelleri peroksizomlar başta olmak üzere endoplazmik retikulum ve sitozolde enzim aktivitesi yüksektir. En düşük enzim aktivitesi bağ dokuda bulunmuştur. Kalp kası ve düz kas hücrelerinde peroksizomlarda, iskelet kasında ise endoplazmik retikulumda katalaz aktivitesi yüksektir.(133) Eritrositlerde, sitoplazmada ve hücre membranında enzim aktivitesi saptanmıştır.(134)

Katalaz ve glutatyon peroksidazın fonksiyonları birbirine çok benzediği halde, hücre içi dağılımları çok farklıdır.Katalaz başlıca peroksizomlarda, glutatyon peroksidaz ise sitozol ve mitokondrial matrikste en yüksek aktiviteyi gösterir. Eritrositlerde her iki enzimde sitozolde bulunur ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin yıkımında eşit derecede öneme sahiptir. (106)

#### ANTIOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİNİ ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ :

##### A) GLUTATYON PEROKSIDAZ AKTİVİTESİNİ ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

GSH-PX enziminin katalizlediği reaksiyonu hatırlayacak olursak  $H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GSH-PX} GSSG + 2 H_2O$  bu reaksiyona göre, enzim aktivitesini başlıca üç yöntemle ölçebiliriz.(135)

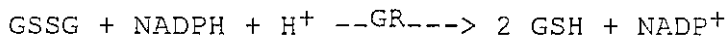
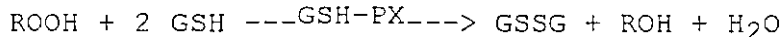
a) GSH tüketimini ölçen sabit zamanlı yöntem :

Prensip : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile GSH'ın reaksiyonu ortama kuvvetli asit eklenmesi ile belirli bir zamanda durdurulur ve GSH içeriği polarografi ile ölçülür.

b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tüketimini ölçen sabit zamanlı yöntem :

Prensip : Reaksiyon belli bir zamanda asitlendirme ile durdurulur.Metabolize olmayan GSH, Hg tuzları ile tutulur. Solüsyon nötralize edilir. Kalan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fluoressan boya scopoletin ile horse radish peroksidaz mevcudiyetinde reaksiyon verir.

c) GSSG oluşumunun sürekli izlenmesi yöntemi :



Prensip : Reaksiyon ürünü olarak oluşan GSSG, sabit bir GSH düzeyi oluşturacak şekilde yüksek glutatyon redüktaz (GR) aktivi-

tesisi ile sürekli olarak indirgenir. Bu arada NADPH`ın eş zamanlı oksitlenmesi, 340 nm dalga boyunda absorpsiyon azalması ile fotometrik olarak izlenir. Bizim, çalışmamızda kullandığımız yöntem de budur.

#### B) SÜPEROKSİT DİSMUTAZ AKTİVİTESİNİ ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ :

Süperoksit Dismutaz (SOD) enzimi, hatırlayacağımız üzere şu reaksiyonu katalizler:  $2 O_2^- + 2 H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$

Ortamdaki SOD aktivitesinin ölçüm yöntemleri, başlıca iki grupta incelenebilir. (138) Bu yöntemler :

##### a) SOD`un direkt ölçüm yöntemleri :

Prencip: Ayrıntılı tekniklerle doğrudan ortamdaki süperoksit miktarı izlenerek SOD aktivitesi hakkında fikir sahibi olunur. Direkt  $O_2^-$  miktarını ölçen bu yöntemlerde, kullanılan araçların ekonomik açıdan ucuz olmaması ve yüksek saflıkta numune ve karmaşık işlemler gerektirmesi nedeniyle bu tekniklerin pratikte uygulanımı zordur.

#### DİREKT $O_2^-$ ÖLÇÜMÜNE DAYANAN SOD AKTİVİTE ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

- Pulse radiolysis
- Rapid-freeze EPR
- Stopped-flow spektroskopisi
- Polarografik teknikler
- $^{19}F$  NMR spektroskopisi

##### b) SOD`un dolaylı ölçüm yöntemleri :

Prencip : SOD`un substratı olan süperoksit radikalinin oksidasyon yada redüksiyon reaksiyonlarına kolayca katılabilmesi yani reaktif olması özelliğinden yararlanarak, ilk önce bu radikalın reaksiyon ortamında bulunmasını sağlayan bir süperoksit kaynağı temin edilir. Daha sonra ise bu radikal ile oksidasyon yada redüksiyon reaksiyonuna girebilecek bir madde (indikatör) ortama konur. Dolayısı ile eğer ortamda SOD varsa, hem SOD enzimi hem de indikatör süperoksit radikali ile reaksiyona girmek için yarışır. Eğer ortamda SOD aktivitesi yüksek ise indikatör miktarı düşük, eğer SOD aktivitesi düşük ise indikatör miktarı yüksek bulunur.

İNDİREKT O<sub>2</sub><sup>-</sup> ÖLÇÜMÜNE DAYANAN SOD AKTİVİTE ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

O <sub>2</sub> <sup>-</sup> kaynakları	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> indikatörleri
Ksantin + Ksantin oksidaz	Sitokrom c redüksiyonu
O <sub>2</sub> nin elektrokimyasal redüksiyonu	NBT* redüksiyonu
Epinefrin otooksidasyonu	Tetranitrometan redüksiyonu
Pirogallol otooksidasyonu	Epinefrin otooksidasyonu
6-OH dopamin otooksidasyonu	Pirogallol otooksidasyonu
Fenazin metosülfat ile NADH oksidasyonu	6-OH dopamin otooksidasyonu
Potasyum süperoksit	2-etil-1-OH-2,5,5-trimetil-3-oksazolidin oksidasyonu
Flavinlerin fotoredüksiyonu	Luminolün kemilüminesansı
	OH-amonyum Kloridden Nitrit oluşumu
	INT* redüksiyonu

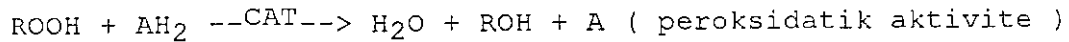
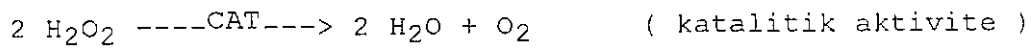
NBT\* : Nitroblue tetrazolium

INT\* : 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride

Bizim çalışmamızda kullandığımız "indirekt süperoksit ölçümüne dayanan SOD aktivite ölçüm yöntemi"nde süperoksit kaynağı olarak ksantin + ksantin oksidaz sistemi ile indikatör olarak INT\* kullanıldı.

**C) KATALAZ AKTİVİTESİ ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ :**

Katalaz enziminin rol aldığı reaksiyonları hatırlayacak olursak



Katalazın katalitik aktivitesini ölçmeye yönelik metodlar başlıca iki grupta incelenebilir. (136)

a) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dekompozisyonunu (yıkımını)ölçen yöntemler :

Prensip : UV spektrumda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, düşük dalga boyunda yüksek absorbans verir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin dekompozisyonu, 240 nm dalga boyunda absorbans azalması ile doğrudan izlenebilir. Birim zaman başına absorbans değişimi katalaz aktivitesinin bir ölçüsüdür. Ölçüm esnasında enzim inaktivasyonundan kaçınmak ve O<sub>2</sub> çıkışına bağlı küvette hava kabarcığı oluşumunu önlemek için genelde 30 saniyeden daha kısa ölçüm süresi ve bağıl olarak düşük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu kullanmak gerekir.

b)  $H_2O_2$  dekompozisyonu neticesi oluşan  $O_2$  ni ölçen yöntemler :  
 Prensiip : Reaksiyon sonucu açığa çıkan  $O_2$  'in miktarı,  $O_2$  elektrodu yada polarografi ile izlenebilir.

c) Katalazın peroksidatik aktivitesini ölçen yöntemler :  
 Prensiip : Katalazın peroksidatik aktivitesi, 1 molekül  $H_2O_2$  tüketerek metanol, etanol, formik asit yada fenoller gibi H donörlerinin oksidasyonuna neden olur. Oluşan oksidasyon ürünü üstünden peroksidatik aktivitenin ölçümü mümkündür. Nitekim etanolün,  $H_2O_2$  varlığında asetaldehit ve suya oksitlenmesi sonucu oluşan asetaldehit,  $NAD^+$  varlığında aldehit dehidrogenaz enzimi ile asetata oksitlenir, bu sırada  $NAD^+$  nin indirgenmesi ile oluşan  $NADH$  ' in 340 nm'deki absorbans değişimi saptanarak peroksidatik aktivite ölçülür. (137)

#### KATALAZ ENZİMİNİN AKTİVİTE ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

<u>YÖNTEM</u>	<u>REFERANS</u>	<u>MATERYAL</u>
1) $H_2O_2$ yıkımını ölçen yöntemler		
a) Titrimetrik Yöntemler		
i. İyodometrik	Bonnichsen.1947	Doku, kan
ii. Permanganometrik	Bonnichsen.	Doku, kan
b) Spektrofotometrik Yönt.		
i. Substrat: $H_2O_2$ E <sub>240</sub>	Bergmeyer. 1955	Doku
ii. Substrat: perborat E <sub>220</sub>	Cohen ve ark.1970 Thomson ve ark.1978	Doku Doku
c) Fotometrik Yönt.E(405-415)		
i. Vanadik asit	Warburg, Kripahl 1963	Doku
ii. Titanyum tetraklorid	Pilz & Johann 1965	Kan
d) Florometrik Yönt.		
i. Skopoletin	Perschke, Broda 1961	Sulu sol.
ii. Diasetildikloroflorosein	Keston & Brandt 1965	Sulu sol.
2) $O_2$ üretimini ölçen yöntemler		
a) $O_2$ elektrodu Yönt.	Ogata 1964	Kan
	Del Rio & ark.1977	Bitki
	Meerhof & Roos.1980	Kan
b) Polarografik Yönt.		
i. Katalaz ve SOD	Rigo & Rotilio 1977	Doku, kan
3) Peroksidatik akt.ölçüm Yönt.	Van Lente 1990	Kan

### 3. MATERYAL VE METODLAR :

#### HASTA VE KONTROL GRUPLARI :

Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji-Onkoloji servisine tedavi için yatırılan KLL'li 6, KML'li 6, ALL'li 7, AML'li 17 olmak üzere toplam 36 hastadan alınan kan örnekleri işlemlenmiştir. Hastaların tanısı periferik yayma, kemik iliği aspirasyon materyali mikroskopik tetkiki, histoşimik boyamalar v.b tetkikler ile konmuştur.

KLL'li 6 hastadan 4'ü erkek, 2'si kadın olup yaşları 42-56 arasındadır. Ort  $\pm$  Std = 49.83  $\pm$  5.24

KML'li 6 hastadan 3'ü erkek, 3'ü kadın olup yaşları 30-67 arasındadır. Ort  $\pm$  Std = 47.50  $\pm$  14.56

ALL'li 7 hastadan 3'ü erkek, 4'ü kadın olup yaşları 18-66 arasındadır. Ort  $\pm$  Std = 32.57  $\pm$  16.81

AML'li 17 hastadan 12'si erkek, 5'i kadın olup yaşları 29-66 arasındadır. Ort  $\pm$  Std = 41.18  $\pm$  10.94

Kontrol grubu, anamnez, klinik muayene ve yapılan laboratuvar tetkikleri sonucu sağlıklı olduğuna karar verilen kan grubu donörleri ve sağlıklı hastane personelinden seçilmiştir. Kontrol grubundaki 20 kişiden 9'u erkek, 11'i kadındır. Yaşları 19-50 arasındadır. Ort  $\pm$  Std = 35.80  $\pm$  9.00

#### KULLANILAN KİMYASAL MADDELER :

Bu çalışmada SOD aktivitesi ölçümünde kullanılan ksantin, ksantin oksidaz, EDTA ve CAPS buffer, SOD standardı, INT (p-iyodonitrotetrazolyum) ile GSH-PX aktivitesi ölçümünde kullanılan glutatyon (GSH), Kumenhidroperoksit (ROOH), NADPH, Glutatyon redüktaz ve dilüsyon ajanı (diluting agent) Randox firmasından, katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , Hidrojen peroksit 30% (w/v) ile Hb ölçümünde kullanılan  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , KCN,  $\text{NaHCO}_3$  Merck firmasından, Hb standardı Sigma firmasından, antikoagülan olarak kullanılan heparin Roche firmasından temin edilmiştir.

**KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER :**

LKB Biochrom marka Ultrospec Plus 4054 model UV/Visible spektrofotometre, Polyscience 910 model soğutma-ısıtma özelliği olan sirkülatör, Shimadzu marka Libror-AEG 320 model 0.0001 g'a duyarlı hassas terazi, Beckman GPR marka soğutmali santrifüj, Eppendorf marka 5415 C model mikro santrifüj, Janke-Kunkel IKA - Labortechnik marka Ikamag RH model ısıtıcılı rotor ve aynı marka VF 2 model vorteks, Gilson marka 10, 100 ve 1000 mL'lik otomatik mikropipetler, Hanna marka digital pH-meter. Software olarak istatistik analizlerde SPSS, tablolamada Quattro Pro kullanıldı.

**YAPILAN İŞLEMLER :****KAN ALINMASI :**

Hasta ve kontrol grubuna dahil kişilerin median venlerinden bir kullanımlık (disposable) enjektör ile alınan 5 ml'lik heparinize venöz kan örnekleri zaman geçirmeden derhal işlemlendi.

**ERİTROSİTLERİN ENZİM AKTİVİTE ÖLÇÜMÜNE HAZIRLANMASI :**

Alınan heparinize venöz kanlar, karıştırılarak homojen hale getirildikten sonra 1'er ml'si GSH-PX ölçümü için tam kan olarak 2 ml'lik kapaklı ependorf tüplerine kondu ve derhal -45 °C'de çalışan derin dondurucuya kaldırıldı. 500'er mikrolitresi eritrosit içi SOD ölçümüne hazırlamak için 5 ml'lik kapaklı polipropilen tüplere kondu. 1000 g'de 10 dk santrifüj edilip plazma ve buffy coat aspire edilip atıldı. Kalan eritrosit sedimenti PBS ( Phosphate Buffered Saline ) solüsyonu ile her yıkamadan sonra 1000 g'de 10 dk santrifüj edilip eritrosit sedimenti ayrılarak süpernatant atılmak suretiyle 4 kez yıkandı. Sonunda yıkanıp santrifüj edilen eritrositler soğuk distile su ile 2 ml'ye tamamlanıp vortekslenerek hipotonik lizise uğratıldı. 2 ml'lik stok hemolizat enzim aktivitesinin etkilenmemesi için derhal -45 °C'de çalışan derin dondurucuya kaldırıldı. Kalan tam kanın 500 mikrolitresi tam kanda Hb ölçümüne ayrıldı. Artan tam kan eritrosit içi katalaz aktitesinin ölçümü için 1000 g'de 10 dk santrifüj edilip plazma ve buffy coat tabakası uzaklaştırıldıktan sonra eritrosit sedimentinin 500 mikrolitresi 5 ml'lik kapaklı polipropilen tüplere kondu ve PBS solüsyonu ile 4 kez yıkandı. Her yıkamadan sonra 1000 g'de 10 dk santrifüj edilip süpernatant atılarak eritrosit sedimenti ayrıldı. Sonunda yıkanıp santrifüj edilen 500 mikrolitrelik eritrosit sedimenti

üstüne 2 ml soğuk distile su eklenip vortekslenerek hipotonik lizis yapıldı. Elde edilen 2.5 ml'lik stok hemolizat - 45 °C'de derin dondurucuya kaldırıldı. Analiz öncesi stok hemolizatta Hb ölçümü yapıldı.

#### HEMOGLOBİN ÖLÇÜMÜ :

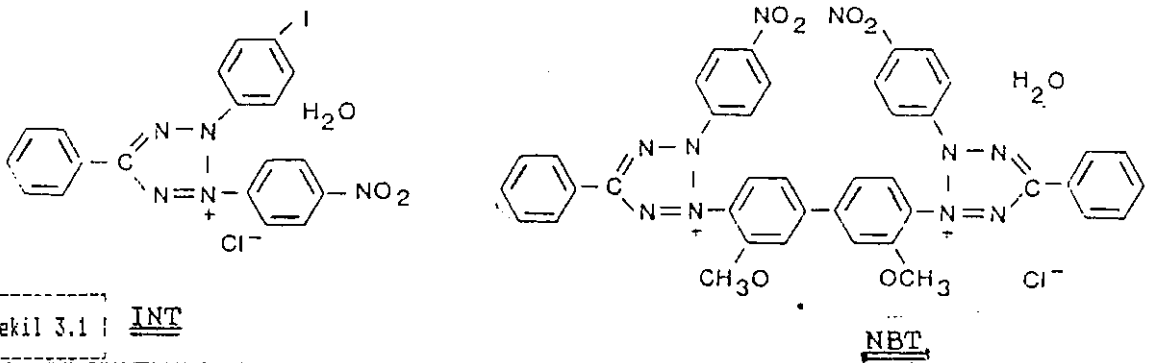
Ferrosiyanomethemoglobin metodu ile tam kan ve stok hemolizatlarda Hb ölçümü yapıldı. Bu ölçüm için hazırlanan Drabkin solüsyonunun içeriği; 0.20 g  $K_3Fe(CN)_6$  , 0.05 g KCN ve 1 g  $NaHCO_3$  distile suda çözülüp 1000 ml'ye tamamlanır. Deney tüpleri blank, standart, numune olarak işaretlenir. (141)

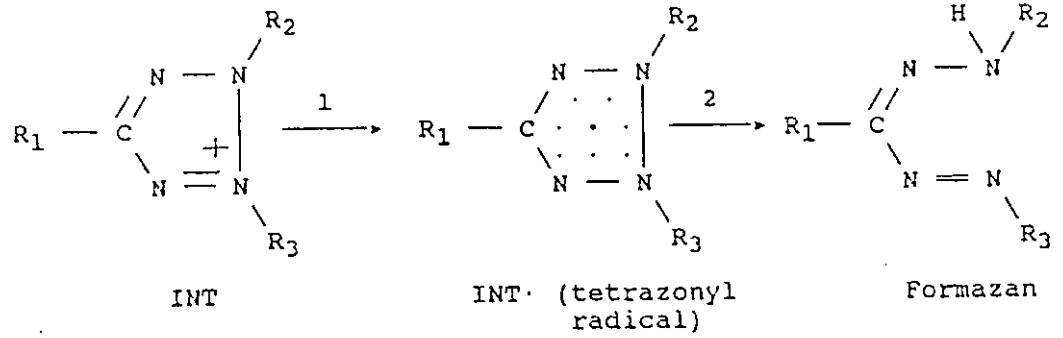
Tam kanda ölçüm için; Blank ve numune tüpleri içine 6 şar ml Drabkin solüsyonu, standart tüpüne 6 ml standart, numune tüplerinin herbirine ilaveten 20 mikrolitre homojenize tam kan örneği, stok hemolizatta ölçüm için; numune olarak 40 mikrolitre stok hemolizat kullanılır. Tüpler karıştırıldıktan sonra 5 dk beklenir. 540 nm de blank olarak Drabkin solüsyonuna karşı standart ve numuneler okunur.

#### SOD ENZİM AKTİVİTESİ ÖLÇÜM YÖNTEMİ :

Biz yaptığımız çalışmada eritrosit içi SOD enzim aktivitesini ölçmek amacıyla Podczasy ve Wei'nin tanımladığı, "süperoksit radikalleri tarafından INT redüksiyonu yöntemi" ni, süperoksit kaynağı olarak ( ksantin + ksantin oksidaz ) sistemini kullandık. (140) Burada INT (p-iyodonitrotetrazolium), süperoksit indikatörü olarak rol alır.

INT bir tetrazolium derivesi olan NBT (Nitroblue tetrazolium) ile yapısal olarak ilişkilidir. NBT deki fenil gruplarının biri üstünde bulunan metoksi grubu, INT'deki iyodinle yer değiştirir. Katyonik yapıdaki NBT renksiz INT ile karşılaştırıldığında sarı renklidir. Bu bileşikler arası yapısal benzerlikten dolayı INT redüksiyonunun kimyası NBT'ninkine oldukça benzer.





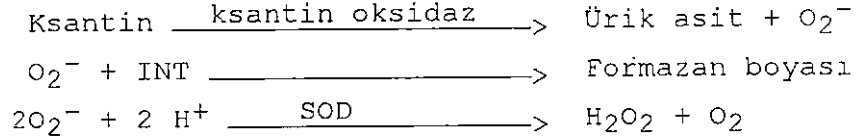
Şekil 3.2

$\text{R}_1 = \text{phenyl}, \text{R}_2 = \text{p-Iodophenyl}, \text{R}_3 = \text{p-Nitrophenyl}$

NBT'nin formazana redüksiyonu, NBT'ye 4 e un adım adım transferini gerektirir. Bir sabit monokatyonik ve iki radikal aracının oluşturulduğuna inanılır. Bununla birlikte redüktif işlemin daha kompleks olduğu görülür. Diğer yönden INT için reaksiyon molekül sadece bir tetrazolyum grubu içerdiğinden dolayı daha basittir. Bizim çalışmamızda INT redüksiyon yöntemini diğer SOD aktivite ölçüm yöntemlerine tercih etmemizin nedeni presizyonunun yüksek olmasıdır. Örneğin sitokrom redüksiyon yöntemi, süperoksit kaynağı olarak (ksantin + ksantin oksidaz) sistemi ile birlikte kullanıldığında zayıf presizyona sahiptir yada diğer bir örnek olarak NBT redüksiyonu sonucu oluşan suda çözünen sarı renkli bileşik redüksiyonla birlikte suda zayıf çözünen mono ve diformazanları oluşturur. Suda çözünürlüğü az olduğu için kantitatif ölçüm amacıyla kullanımı sınırlandırılmıştır. Kalitatif ölçüme daha uygundur. Halbuki INT redüksiyonu ile suda iyi çözünen, sabit ve görünür bölgede ayrı bir absorpsiyon pikine sahip olan ürünler oluşur. Böylece sulu sistemlerde uygun bir spektrofotometrik ölçüme izin verir. Bu nedenle INT tabanlı teknik, kantitatif ölçüme daha uygundur.

Yöntemin prensibi : Bu yöntem, süperoksit kaynağı olan bir enzimatik reaksiyon ile (ksantin + ksantin oksidaz) üretilen süperoksit radikallerinin, reaksiyon ortamındaki INT' yi redüklemesinin eritrosit içi SOD tarafından engellenmesi esasına dayanır. INT redüklenince, 505 nm de absorpsiyon maksimumu veren kırmızı-pembe renkli bir formazan boyası oluştu. Fakat reaksiyon ortamına eklenen hemolizat örneğinde bulunan SOD enziminin aktivitesi nispetinde üretilen süperoksit radikalleri

dismutasyona uğrayarak INT redüksiyonunu engelledi. Yani oluşturulan süperoksit için INT ile SOD arasında bir yarışma husule geldi. Ortamda SOD az ise,  $O_2^-$  tarafından INT redüksiyonu ve sonuçta oluşan formazan boyasının 505 nm deki absorbanısı fazla eğer ortamda SOD fazla ise, INT redüksiyonu dolayısı ile formazan boyasının 505 nm deki absorbanısı az idi. Olayı formüle edecek olursak ;



#### KULLANILAN REAKTİFLER :

- 1) Mixed Buffer : Distile su içinde CAPS\* (50 mmol/L) pH = 10.2 ve EDTA (0.94 mmol/L)
- 2) Mixed Substrat : Mixed buffer içinde ksantin (0.05 mmol/L) ve INT (0.025 mmol/L) konsantrasyonlarda hazırlandı.
- 3) Ksantin oksidaz : Distile su içinde (80 U/L) olacak şekilde hazırlandı.
- 4) SOD standartları : 5.32 U/L` lik stok SOD standardından sırası ile 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/24`lük dilüsyonlar yapıldı. Ayrıca 0 standart (blank) olarak fosfat buffer (0.01 M, pH = 7.0) kullanıldı.
- 5) Fosfat Buffer (0.01 M , pH = 7.0) : 3.58 g/L  $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$  ile 1.36 g/L  $KH_2PO_4$  distile su içinde hazırlandı.

-----  
CAPS\*: 3-[cyclohexylamino]-1-propane-sulfonic acid.

#### DENEYİN YAPILIŞI :

Derin dondurucudan 4 kez dilüe durumdaki donmuş stok hemolizatlar çıkarıldı. Musluk suyu altında çözüldü ve 15 dk bekleterek oda ısısına gelmesi sağlandı. Tüpler vortekslendikten sonra önceden numaralandırılmış 5 ml lik polipropilen tüplerde stok hemolizatlar 0.01 M fosfat buffer (pH = 7.0) ile 50 kez dilüe edilerek 4 x 50 = 200 kez dilüe hemolizatlar hazırlandı. Daha sonra önceden hazırlanan standartlar kullanılarak kalibrasyon grafiğini çizmek üzere deneysel işleme geçildi ve okuma küvetlerine pipetleme yapıldı.

	R.Blank	Standart	Numune
Dilüe Hemolizat	-	-	0.05 ml
Standart	-	0.05 ml	-
Fosfat buffer	0.05 ml	-	-
Mixed substrat	1.7 ml	1.7 ml	1.7 ml

Küvetler altüst edilerek iyice karıştırılır.

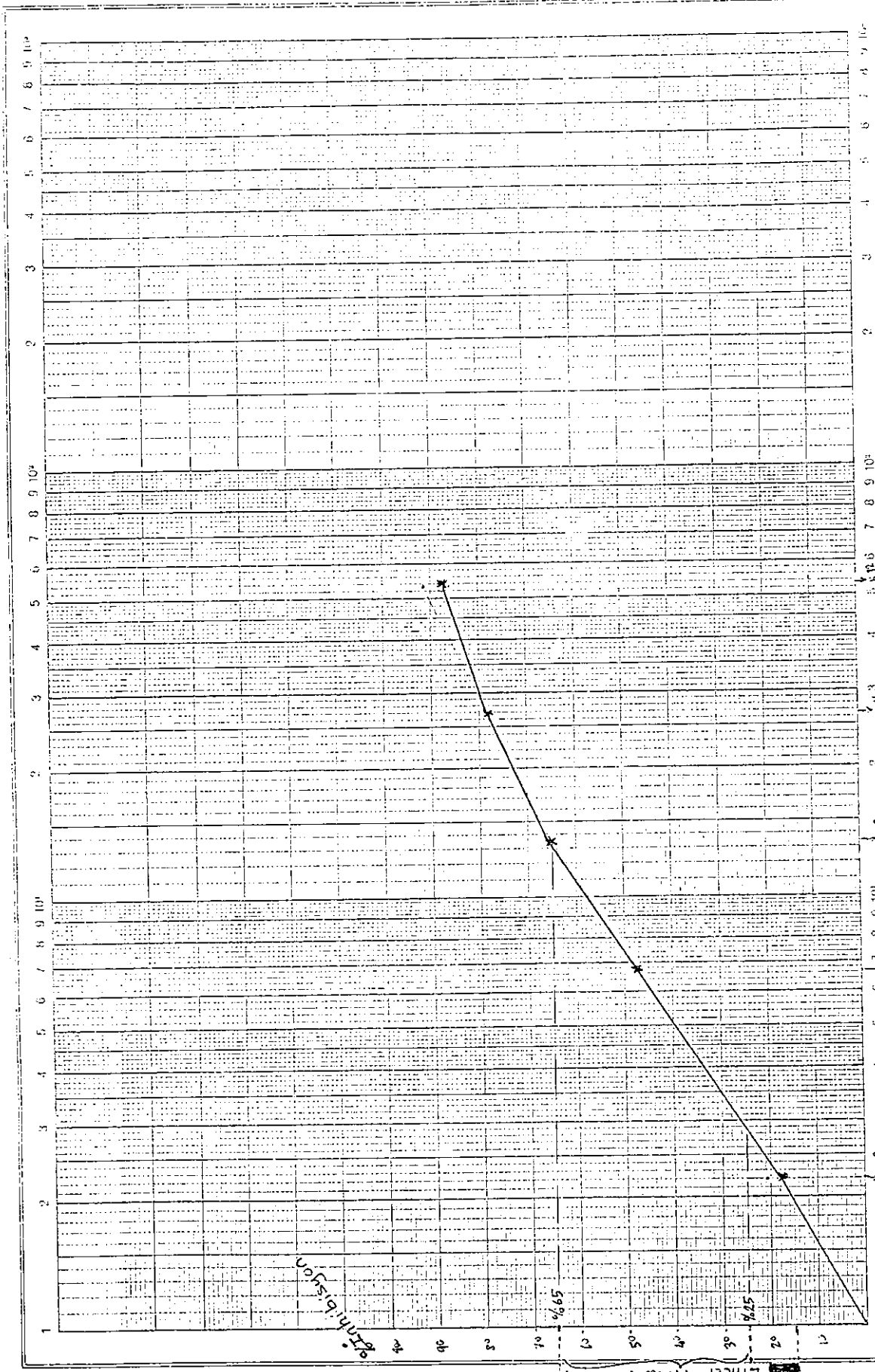
Ksantin oksidaz	0.25 ml	0.25 ml	0.25 ml
-----------------	---------	---------	---------

Karıştırıp, 30 saniye sonra 37 °C'de, 505 nm dalga boyunda, havaya karşı ilk okuma yapılır ve 3 dk süreyle okunarak dakikadaki absorbanans değişimi ( $\Delta A/dk$ ) bulunur. Sırası ile önce reaktif blank sonra standart küvetleri, en sonunda da numune küvetleri okunur. Reaktif blank küvetinde SOD olmadığı için ortamda oluşan  $O_2^-$  SOD tarafından inhibe edilmeyecektir. Dolayısı ile inhibisyon yüzdesi 0 olacak yani reaksiyon 100 % gerçekleşecektir.

Reaktif blank'in reaksiyon oranı = 100 % ( inhibe edilmeyen reak )  
Tüm standart ve dilüe hemolizatlardan dakika absorbanans değişimleri reaktif blank'in dakika absorbanans değişimine oranlanarak 100 % üstünden reaksiyon oranları bulunur. Bulunan oranların 100 % den farkı inhibisyon yüzdesini verir. Bunu formüle edecek olursak şöyle gösterebiliriz. Bu formül standart yerine numune için de aynen uygulanabilir.

$$\% \text{ inhibisyon} = 100 - \frac{(\Delta A_{std}/dk \times 100)}{(\Delta A_{blk}/dk)}$$

Herbir standardın inhibisyon yüzdeleri tek tek hesaplanarak SOD Ü/ml cinsinden standart konsantrasyonunun 10 tabanına göre logaritmasına karşı o konsantrasyona ait inhibisyon yüzdeleri grafiklenerek kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Daha sonra oluşturulan kalibrasyon grafiğinden yararlanarak, herbir numune için hesaplanan inhibisyon yüzdelere karşılık gelen SOD aktiviteleri Ü/ml cinsinden bulundu. Elde edilen SOD aktiviteleri 200 kez dilüe edilmiş hemolizatlara ait olduğundan, 1 ml tam kandaki SOD aktivitesini bulmak için dilüsyon faktörü olan 200



Konsentrasi (µM)

SOD Aktivitesini ölçümünde kullanılan kalibrasyon grafiği.

Yatay Eksen } 0-1000 µM  
 Logar. Dönelim } 0-10<sup>10</sup>

Aktivitas SOD

Lineer Grafik

5%

5%

5%

ile çarpıldı. En sonunda da g/ml cinsinden tam kan Hb değerine bölünerek g Hb başına düşen SOD üniti hesaplandı. Bunu formüle edecek olursak ;

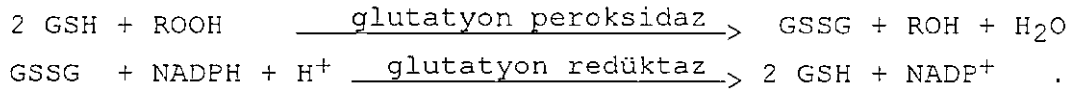
$$\text{SOD } \ddot{U}/\text{g Hb} = \frac{\text{SOD } \ddot{U}/\text{ ml}}{\text{Hb g/ml}}$$

Bu arada bazı numunelerde SOD aktivitesi çok yüksek yada çok düşük olduğundan, inhibisyon yüzdeleri 65 üstü yada 25 altına indiği için lineer aralık olan 25 % - 65 % arasına gelecek şekilde dilüsyon oranları değiştirilmiş, elde bulunan stok hemolizatlardan yeni dilüsyon hazırlanmış ve hesaplama aşamasında yeni dilüsyon faktörleri ile çarpım yapılmıştır.

#### GLUTATYON PEROKSİDAZ ENZİM AKTİVİTESİ ÖLÇÜM YÖNTEMİ :

Biz çalışmamızda eritrosit içi glutatyon peroksidaz (GSH-PX) enzimi aktivitesini ölçmek amacıyla Paglia ve Valentine'in tanımladığı(139), Prohaska (103) ve Kraus'un (104) katkıda bulunduğu yöntemi kullandık.

Yöntemin prensibi ; GSH-PX enzimi, kumenhidroperoksit (ROOH) mevcudiyetinde, redükte glutatyonun (GSH) oksidasyonunu katalizler. Reaksiyon ortamında NADPH ve glutatyon redüktaz enzimi bulunması durumunda bir önceki reaksiyonda oluşan okside glutatyon (GSSG) redükte forma çevrilirken, beraberinde redükte formdaki NADPH, okside forma (NADP<sup>+</sup>) dönüşür. NADPH'in 340 nm dalga boyunda oluşturduğu absorbanstaki azalma ölçülerek GSH-PX enziminin aktivitesi hakkında fikir sahibi olunur. Bu reaksiyonu formüle edecek olursak ;

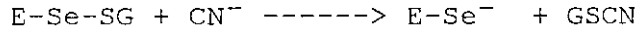


#### KULLANILAN REAKTİFLER :

- 1) Mixed Buffer : EDTA (4.3 mmol/L), fosfat buffer (0.05 mol/L) pH = 7.2 (distile su içinde)
- 2) Mixed Reagent : GSH (4 mmol/L), NADPH (0.28 mmol/L), glutatyon redüktaz (> 0.5 U/L) mixed buffer içinde hazırlandı.
- 3) Kumen hidroperoksit Solüsyonu (ROOH) : (0.18 mmol/L) distile su içinde hazırlandı.
- 4) Drabkin reaktifi : 0.20 g K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0.05 g KCN, 1 g NaHCO<sub>3</sub> 1000 ml distile su içinde çözülür.

## DENEYİN YAPILIŞI :

Derin dondurucuda saklanan heparinize tam kan örnekleri çıkarıldı. Musluk suyu altında çözüldükten sonra 15 dk süreyle oda ısısına gelinceye dek bekletildi. Vortekslenerek homojenize hale getirildikten sonra, tam kan örnekleri drabkin reaktifi ile dilüe edildi. Glutasyon peroksidaz dışında insan kanında bulunan ve yalancı yüksek sonuç verebilen diğer peroksidazların oluşturduğu pozitif interferansı önlemek için dilüsyon, siyanid ( $\text{CN}^-$ ) içeren drabkin reaktifi ile yapıldı. Bununla birlikte siyanidin, GSH-PX enzimini indirekt bir mekanizma ile dayanıksız okside formuna dönüştürerek inaktive edici etkisini önlemek için, lyofilize flakon halinde temin ettiğimiz ve belirli miktar distile su ile sulandırıldığında belli miktarda redükte glutasyon (GSH) ve bazı enzim stabilizanlarını içeren dilüsyon ajanı denen bir solüsyon, drabkin reaktifinden önce ortama eklenerek glutasyon peroksidazın aktif haldeki redükte formda kalarak fonksiyon görmesi sağlandı.



↓ (spontan oksidasyon)

Labil okside form (irreversible oksidasyon)

Bu amaçla 50 mikrolitre tam kan örneği üstüne 1 ml dilüsyon ajanı eklenerek 5 dk inkübe edildi ve daha sonra bunun üstüne 1 ml Drabkin solüsyonu eklenip iyice karıştırıldı. Bu işlem tüm örnekler için tekrarlandı. Böylece dilüe hemolizat örnekleri elde edildi. Ardından deneysel işleme geçilerek okuma kuvvetlerine sırası ile aşağıdaki pipetlemeler yapıldı.

	Numune	R.Blank
Dilüe örnek(hemolizat)	0.02 ml	-
Distile su	-	0.02 ml
Reaktif (mixed reagent)	1.00 ml	1.00 ml
Kümen hidroperoksit	0.04 ml	0.04 ml

Küvetler karıştırıldı ve 1 dk sonra 340 nm dalga boyunda, 37 °C de, havaya karşı reaktif blank'in ve numunelerin ilk absorbansı okunduktan itibaren 2 dk süreyle okuma yapılarak dakikadaki absorbans değişimi ( $\Delta A/\text{dk}$ ) bulundu. Bulunan değerler faktör

olarak 8412 ile çarpılarak U/L cinsinden blank ve numunelerdeki enzim aktiviteleri hesaplandı. Reaktif blank değeri numunelerinden çıkarılarak dilüe hemolizat örneklerinde U/L cinsinden GSH-PX aktivitesi hesaplandı. Bulunan değerler dilüsyon faktörü olan 41 ile çarpılarak tam kanda U/L cinsinden enzim aktivitesi bulundu. Tam kan enzim aktiviteleri, tam kan hemoglobin değerlerine bölünerek g Hb başına düşen enzim aktivitesi (U/g Hb) elde edildi. Bunları formüle edersek ;

$$U/L_{\text{blank}} = 8412 \times \Delta A_{\text{blk}} 340 \text{ nm/dk}$$

$$U/L_{\text{numune}} = 8412 \times \Delta A_{\text{num}} 340 \text{ nm/dk}$$

---

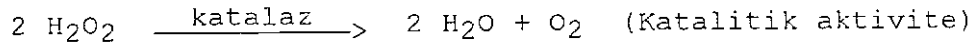

$$U/L(\text{hemolizat}) : \text{Blank çıkarıldı.}$$

$$U/L(\text{hemolizat}) \times 41 = U/L(\text{tam kan}) \Rightarrow \frac{U/L}{g \text{ Hb/L}} = U / g \text{ Hb}$$

#### KATALAZ ENZİM AKTİVİTESİ ÖLÇÜM YÖNTEMİ :

Yaptığımız çalışmada katalaz enzimi aktivitesini ölçmek için sırası ile Chance (1949), Beers (1952), Bergmeyer (1955), Lück (1963) tarafından geliştirilip (131), Aebi (1969,1976) tarafından modifiye edilen (136) yöntemi kullandık.

Yöntemin Prensipleri ; UV spektrumunda gittikçe azalan dalga boyu ile ters orantılı olarak gittikçe yükselen absorptans veren hidrojen peroksitin, katalaz enzim aktivitesi ile dekompozisyonu neticesi 240 nm de oluşturduğu birim zamandaki absorptans azalması katalaz aktivitesinin bir ölçüsüdür.



#### KULLANILAN REAKTİFLER

1) Fosfat Buffer (50 mM, pH = 7.0) : a) 6.81 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1000 ml distile suda çözülür b) 8.90 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$  1000 ml distile suda çözülür. a ve b solüsyonları a/b oranı 1/1.5 (v/v) olacak şekilde karıştırılır.

2)  $\text{H}_2\text{O}_2$  - Fosfat buffer solüsyonu (30 mM) : 0.34 ml 30 %'luk hidrojen peroksit, fosfat buffer ile 100 ml'ye tamamlanarak dilüe edilir.

## DENEYİN YAPILIŞI :

Daha önce hazırlanan 2.5 ml lik (1/5 dilüe) stok hemolizatlar, derin dondurucudan çıkarıldı. Musluk suyu altında çözüldükten sonra 15 dk süreyle oda ısısına gelmesi beklendi. Daha sonra fosfat buffer (pH = 7.0) ile 100 kez dilüe edilerek 1/500 'lük dilüe hemolizatlar hazırlanarak spektrofotometrik işleme geçildi ve okuma küvetlerine aşağıdaki pipetlemeler yapıldı.

	N.Blank	Numune
Fosfat buffer	1 ml	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -fosfat buffer sol.	-	1 ml
Dilüe hemolizat(numune)	2 ml	2 ml

Küvetler altüst ederek karıştırıldı ve 240 nm UV dalga boyunda, oda ısısında, 3 ml toplam hacimdeki küvetlerin okunmasına geçildi. Numuneler blank` a karşı okundu. Reaksiyon H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonunun eklenmesi ile başladı. Başlangıç absorbandsı ~0.500 civarında idi ve reaksiyon süresince H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dekompozisyonuna bağlı olarak gittikçe azaldı. Absorbansın 0.450 den 0.400` e düşene kadar geçen süre kronometre kullanılarak saniye cinsinden kaydedildi. Bu süre birkaç numune hariç genelde 30 saniyenin altında idi. Reaksiyonun lineeritesi açısından bu süre ~30 saniye civarında ve daha altında olacak şekilde konsantrasyon ayarlaması yapıldı ve tüm numuneler için bulunan süreler kaydedildikten sonra k hız sabitleri hesaplandı.

Bağıl olarak yüksek enzim konsantrasyonunda, düşük reaksiyon süresi ile katalaz aktivitesine bağlı olarak zamanla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonunun azalması 1.nci dereceden (first order) bir reaksiyona uyar.

$$k = \frac{1}{\Delta t} \cdot \ln \frac{S_1}{S_2} = \frac{2.3}{\Delta t} \log \frac{S_1}{S_2} \text{ olur.}$$

$\Delta t = t_2 - t_1$  = ölçülen reaksiyon süresi

$S_1$  ve  $S_2 = t_1$  ve  $t_2$  zamanlarındaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonlarıdır.

Konsantrasyon ile optik dansite (absorbans) arasındaki ilişki nedeniyle yukarıdaki formülde konsantrasyon yerine absorbansları koyarsak ;

$$k = \frac{2.3}{\Delta t} \log \frac{\text{Abs(ilk)}}{\text{Abs(son)}} = \frac{2.3}{\Delta t} \log \frac{0.450}{0.400} = \frac{2.3}{\Delta t} 0.05115 = \frac{0.1175}{\Delta t} \text{ [sn}^{-1}\text{]}$$

Yaptığımız çalışmada bulduğumuz süreleri ( $\Delta t$ ), formülde yerine koyarak  $k$  hız sabitlerini hesapladık. Daha sonra 500 kez dilüe hemolizatlar için hesapladığımız  $k$  değerlerini dilüsyon faktörü olan 500 ile çarpıp, dilüsyonsuz eritrosit sedimenti için geçerli olan numuneye ait gerçek  $k$  değerlerini bulduk. her numune için yukarıda Hb ölçümü bahsinde değindiğimiz yöntemle bulduğumuz Hb değerlerine bölerek g Hb başına  $k$  değerlerini (  $k/g$  Hb ) hesapladık.

$$k/ml = k.a$$

$$k/g \text{ Hb} = k/ml(1/b) = k.a/b = (2.3/\Delta t)(\log A_{ilk}/A_{son})(a/b)$$

-----  
a: Dilüsyon faktörü (bizim örneğimizde 500)

b: Eritrosit sedimentinin Hb içeriği (g Hb/ml)

## 4. BULGULAR :

## KONTROL VE HASTALARDA SAPTANAN ERİTROSİT İÇİ ENZİM AKTİVİTELERİ :

Söz konusu enzim aktiviteleri ve bu aktivitelerin hesaplanmasında gerekli ara basamaklar aşağıdaki tablolarda toplu halde gösterilmiştir.

KONTROL	ADI	CINS	YAS	SOD	SOD	DILUE	T.K SOD	T.KAN	T.KAN	SOD	GPX	GPX	GPX	CAT	CAT	CAT	CAT
				ABS D.	% INHIB	HEMGL	AKT.U/ml	Hb g/ml	U/g Hb	ABS/dk	U/L	U/g Hb	(s)	(k)	k/ml	k/g Hb	
1	S.D	E	40	0.011	0.5217	0.80	192.0	0.159	1207.55	0.047	16209.92	101.95	19.0	0.0062	3.09	73.76	
2	A.M	E	38	0.014	0.3913	0.48	115.2	0.153	752.94	0.051	17589.49	114.96	13.6	0.0086	4.32	104.24	
3	M.C	E	50	0.012	0.4783	0.64	153.6	0.162	948.15	0.048	16554.82	102.19	14.7	0.0080	4.00	112.52	
4	S.S	E	43	0.011	0.5217	0.80	192.0	0.152	1263.16	0.045	15520.14	102.11	14.8	0.0079	3.97	108.34	
5	H.B	E	42	0.012	0.4783	0.64	153.6	0.144	1066.67	0.047	16209.92	112.57	12.9	0.0091	4.55	119.60	
6	H.O	K	24	0.011	0.5217	0.80	192.0	0.131	1465.65	0.056	19313.95	147.43	18.2	0.0065	3.23	76.13	
7	S.A	K	21	0.010	0.5652	0.92	220.8	0.154	1433.77	0.055	18969.06	123.18	17.2	0.0068	3.42	81.48	
8	C.S	E	47	0.011	0.5217	0.80	192.0	0.177	1084.75	0.056	19313.95	109.12	19.3	0.0061	3.04	71.52	
9	C.A	K	35	0.010	0.5652	0.92	220.8	0.170	1298.82	0.061	21038.41	123.76	18.1	0.0065	3.25	74.31	
10	F.O	K	30	0.013	0.4348	0.58	139.2	0.115	1210.43	0.048	16554.82	143.95	17.6	0.0067	3.34	88.03	
11	N.K	K	46	0.008	0.6522	1.30	312.0	0.164	1902.44	0.040	13795.68	84.12	15.6	0.0075	3.77	87.18	
12	A.B	K	31	0.013	0.4348	0.56	134.4	0.176	763.64	0.060	20693.52	117.58	15.3	0.0077	3.84	87.59	
13	R.T	K	45	0.008	0.6522	1.30	312.0	0.137	2277.37	0.056	19313.95	140.98	15.1	0.0078	3.89	113.63	
14	R.C	K	40	0.012	0.4783	0.64	153.6	0.172	893.02	0.049	16899.71	98.25	17.3	0.0068	3.40	84.23	
15	G.S	E	23	0.012	0.4783	0.64	153.6	0.145	1059.31	0.055	18969.06	130.82	17.4	0.0068	3.38	90.00	
16	N.B	E	28	0.013	0.4348	0.58	139.2	0.155	898.06	0.049	16899.71	109.03	15.9	0.0074	3.69	92.29	
17	B.B	E	19	0.010	0.5652	0.92	220.8	0.162	1362.96	0.053	18279.28	112.84	16.7	0.0070	3.52	90.57	
18	H.L	K	34	0.011	0.5217	0.80	192.0	0.138	1391.30	0.052	17934.38	129.96	14.5	0.0081	4.05	97.14	
19	K.D	K	38	0.012	0.4783	0.64	153.6	0.153	1003.92	0.054	18624.17	121.73	18.1	0.0065	3.25	88.57	
20	T.F	K	41	0.009	0.6087	1.10	264.0	0.147	1795.92	0.047	16209.92	110.27	16.3	0.0072	3.60	88.66	
	DRT		35.8						1253.99			116.84				91.50	
	S. %CV		25.7						31.06			13.89				15.17	
	S. STD		9.2						389.44			16.23				13.88	
	S. VAR		84.4						151667			263.40				192.79	
	POP. %CV		25.0						30.27			13.54				14.79	
	POP. STD		9.0						379.58			15.82				13.53	
	POP. VAR		80.2						144083			250.24				183.14	
	ST. HATA		2.1						87.08			3.63				3.11	
	MIN		19.0						752.94			84.12				71.52	
	MAK		50.0						2277.37			147.43				119.60	

Tablo 4.1



KONTROL GRUBUNDA SAPTANAN ERİTROSİT İÇİ GSH-PX, SOD, KATALAZ AKTİVİTELERİ :

Kontrol grubunda bulunan sağlıklı 20 kişiden alınan kan örneklerinde saptanan enzim aktiviteleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Yapılan deskriptif istatistik analiz sonucu kontrol grubunun eritrosit içi SOD aktivitelerinin 752.94 ile 2277.37 Ü/g Hb arasında değiştiği, ortalama  $\pm$  Std değerinin 1253.98  $\pm$  379.60 olduğu, GSH-PX aktivitelerinin 84.12 ile 147.43 Ü/g Hb arasında değiştiği ortalama  $\pm$  Std değerinin 116.84  $\pm$  15.82 olduğu, katalaz aktivitelerinin ise 71.52 ile 119.60 k/g Hb arasında değiştiği ve ortalama  $\pm$  Std değerinin 91.50  $\pm$  13.53 olduğu saptanmıştır. Bu konu ile ilgili ayrıntılı deskriptif istatistiki analiz sonuçları aşağıda ilgili tabloda sunulmuştur.

KONTROL			T.KAN SOD				GPX		CAT	
NO	ADI	CINS	YAS	U/g Hb	U/g Hb	U/g Hb	k/g Hb	k/g Hb	k/g Hb	
1	S.D	E	40	1207.55	101.95	73.76				
2	A.H	E	38	752.94	114.96	104.24				
3	M.C	E	50	948.15	102.19	112.52				
4	S.S	E	43	1263.16	102.11	108.34				
5	H.G	E	42	1066.67	112.57	119.60				
6	H.O	K	24	1465.65	147.43	76.13				
7	S.A	K	21	1433.77	123.18	81.48				
8	C.S	E	47	1084.75	109.12	71.52				
9	C.A	K	35	1298.82	123.76	74.31				
10	F.O	K	30	1210.43	143.95	88.03				
11	N.K	K	46	1902.44	84.12	87.18				
12	A.B	K	31	763.44	117.58	87.59				
13	R.T	K	45	2277.37	140.98	113.63				
14	R.C	K	40	893.02	98.25	84.23				
15	G.S	E	23	1059.31	130.82	90.00				
16	M.B	E	28	898.06	109.03	92.29				
17	B.B	E	19	1362.96	112.84	90.57				
18	H.L	K	34	1391.30	129.96	97.14				
19	K.D	K	38	1003.92	121.73	88.57				
20	T.F	K	41	1795.92	110.27	88.86				
		ORT	35.8	1253.98	116.84	91.50				
		S. ZCV	25.7	31.06	13.89	15.17				
		S. STD	9.2	389.44	16.23	13.88				
		S. VARYANS	84.4	151667.00	263.40	192.79				
		POP. ZCV	25.0	30.27	13.54	14.79				
		POP. STD	9.0	379.60	15.82	13.53				
		POP. VARYANS	80.2	144092.99	250.23	183.15				
		ST. HATA	2.1	87.08	3.63	3.11				
		MIN	19.0	752.94	84.12	71.52				
		MAX	50.0	2277.37	147.43	119.60				

Tablo 4.3

KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ (KLL)'Lİ HASTALARDA ERİTROSİT İÇİ GSH-PX, SOD, KATALAZ AKTİVİTELERİ :

KLL'li hasta grubunda bulunan 6 hastadan alınan kan örneklerinde saptanan enzim aktiviteleri, aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Bu grupta yapılan deskriptif istatistiki analiz sonucu eritrosit içi SOD aktivitelerinin 1520.79 ile 3606.56 Ü/g Hb arasında değiştiği, ortalama  $\pm$  Std değerinin 2565.03  $\pm$  680.69 olduğu, GSH-PX aktivitelerinin 143.98 ile 243.12 Ü/g Hb arasında değiştiği ve ortalama  $\pm$  Std değerinin 181.67  $\pm$  34.73 olduğu, katalaz aktivitelerinin ise 51.53 ile 75.14 k/g Hb arasında değiştiği, buna mukabil ortalama  $\pm$  Std değerinin 62.99  $\pm$  7.85 olduğu saptanmıştır. Bu konuda ayrıntılı deskriptif istatistiki analiz sonuçları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

NO	ISIM	TANI	YAS	CINS	SOD U/g Hb	GPX U/g Hb	CAT k/g Hb
1	I.Z	KLL	55	E	3606.56	243.12	70.02
2	M.S	KLL	42	E	1520.79	153.66	75.14
3	A.Z	KLL	44	E	3154.29	211.86	57.82
4	M.I	KLL	56	K	2064.52	166.88	51.53
5	K.U	KLL	50	E	2563.11	143.98	64.05
6	U.F	KLL	52	K	2480.90	170.51	59.36
		DRT.	49.83		2565.03	181.67	62.99
	S.	%CV	11.52		29.07	20.94	13.64
	S.	STD	5.74		745.73	38.04	8.59
	S.	VAR	32.97		556112.00	1447.18	73.88
	POP.	%CV	10.52		26.54	19.12	12.46
	POP.	STD	5.24		680.69	34.73	7.85
	POP.	VAR	27.47		463340.18	1205.99	61.57
	ST.	HATA	2.34		304.44	15.53	3.51
		MIN	42.00		1520.79	143.98	51.53
		MAK	56.00		3606.56	243.12	75.14

Tablo 4.4 :

KRONİK MYELOİD LÖSEMİ (KML) Lİ HASTALARDA ERİTROSİT İÇİ GSH-PX , SOD, KATALAZ AKTİVİTELERİ :

KML li hasta grubunda bulunan 6 hastadan alınan kan örneklerinde saptanan enzim aktiviteleri, aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

KML li hasta grubunda yapılan deskriptif istatistikî analiz sonucu eritrosit içi SOD aktivitelerinin 1076.64 ile 1899.28 Ü/g Hb arasında değiştiği, ortalama  $\pm$  Std değerinin 1435.64  $\pm$  277.03 olduğu, GSH-PX aktivitelerinin 130.19 ile 239.20 Ü/g Hb arasında değiştiği, ortalama  $\pm$  Std değerinin 165.90  $\pm$  39.71 olduğu, katalaz aktivitelerinin ise 38.71 ile 101.57 k/g Hb arası değiştiği, ortalama  $\pm$  Std değerinin 76.68  $\pm$  23.42 olduğu saptanmıştır. Ayrıntılı deskriptif analiz sonuçları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

NO	ISIM	TANI	YAS	CINS	SOD	GPX	CAT
					U/g Hb	U/g Hb	k/g Hb
1	M.Y	KML	47	E	1692.31	198.98	93.67
2	F.C	KML	45	E	1290.32	239.20	100.09
3	S.D	KML	31	E	1271.52	130.19	66.29
4	K.K	KML	65	K	1076.64	148.27	101.57
5	D.K	KML	30	K	1899.28	138.95	38.71
6	S.I	KML	67	K	1383.78	139.82	59.76
		DRT	47.50		1435.64	165.90	76.68
	S.	%CV	33.57		21.14	26.22	33.46
	S.	STD	15.95		303.47	43.50	25.66
	S.	VAR	254.30		92093.05	1891.91	658.43
	POP.	%CV	30.65		19.30	23.93	30.55
	POP.	STD	14.56		277.03	39.71	23.42
	POP.	VAR	211.92		76744.21	1576.61	548.69
	ST.	HATA	6.49		123.89	17.76	10.47
		MIN	30.00		1076.64	130.19	38.71
		MAK	67.00		1899.28	239.20	101.57

(Tablo 4.5 )

AKUT LENFOSİTİK LÖSEMİ (ALL) Lİ HASTALARDA ERİTROSİT İÇİ GSH-PX, SOD, KATALAZ AKTİVİTELERİ :

ALL'li hasta grubunda bulunan 7 hastadan alınan kan örneklerinde saptanan enzim aktiviteleri, aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Bu grupta yapılan deskriptif istatistikî analiz sonucu eritrosit içi SOD aktivitelerinin 1018.18 ile 1964.29 Ü/g Hb arası değiştiği, ortalama  $\pm$  Std değerinin 1479.67  $\pm$  368.82 olduğu GSH-PX aktivitesinin 133.25 ile 160.00 arası değiştiği, buna karşılık ortalama  $\pm$  Std değerinin 150.57  $\pm$  8.41 olduğu, katalaz aktivitesinin 58.42 ile 113.33 arası değiştiği ve ortalama  $\pm$  Std değerinin 76.94  $\pm$  17.29 olduğu saptanmıştır. Bu konuda ayrıntılı deskriptif analiz sonuçları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

NO	ISIM	TANI	YAS	CINS	SOD	GPX	CAT
					U/g Hb	U/g Hb	k/g Hb
1	B.G	ALL	20	K	1964.29	157.05	113.33
2	F.B	ALL	66	E	1066.67	146.90	84.97
3	B.U	ALL	19	K	1018.18	133.25	60.94
4	K.D	ALL	47	K	1583.51	160.00	73.99
5	D.E	ALL	35	E	1669.57	146.95	79.52
6	I.R	ALL	23	E	1903.45	154.61	58.42
7	A.Y	ALL	18	K	1152.00	155.20	67.42
		ORT.	32.57		1479.67	150.57	76.94
S.		XCV	55.74		26.92	6.03	24.28
S.		STD	18.16		398.37	9.08	18.68
S.		VAR	329.62		158700.00	82.53	348.94
FDP.		XCV	51.61		24.93	5.59	22.48
FDP.		STD	16.81		368.82	8.41	17.29
FDP.		VAR	282.53		136028.63	70.75	299.10
ST.		HATA	6.86		150.57	3.43	7.06
		MIN	18.00		1018.18	133.25	58.42
		MAK	66.00		1964.29	160.00	113.33

Tablo 4.6

AKUT MYELOİD LÖSEMİ (AML) `Lİ HASTALARDA ERİTROSİT İÇİ GSH-PX, SOD, KATALAZ AKTİVİTELERİ :

AML `li hasta grubundaki 17 hastadan alınan kan örneklerinde saptanan enzim aktiviteleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Bu grupta yapılan deskriptif istatistiki analiz sonucu eritrosit içi SOD aktivitelerinin 859.26 ile 3183.67 arası değiştiği, ortalama  $\pm$  Std değerinin 1434.46  $\pm$  637.87 olduğu, GSH-PX aktivitelerinin 131.96 ile 319.15 arası değiştiği, ortalama  $\pm$  Std değerinin 195.55  $\pm$  51.98 olduğu, katalaz aktivitesinin ise 44.28 ile 94.80 arası değiştiği, ortalama  $\pm$  Std değerinin 74.91  $\pm$  13.47 olduğu saptanmıştır. Ayrıntılı deskriptif analiz sonuçları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

NO	İSİM	TANI	YAS	CİNS	SOD	GPX	CAT
					U/g Hb	U/g Hb	k/g Hb
1	M.A	AML	39	E	1066.67	202.34	79.28
2	B.D	AML	30	K	1777.78	197.99	93.02
3	M.Y	AML	35	E	1409.17	142.39	69.67
4	C.E	AML	41	E	1210.81	136.71	80.54
5	N.A	AML	66	K	3000.00	312.56	70.67
6	H.M	AML	29	E	3183.67	168.93	44.28
7	S.G	AML	52	E	1115.49	223.45	73.51
8	H.A	AML	44	K	859.26	174.57	67.02
9	R.Y	AML	51	E	1185.19	183.09	67.65
10	S.A	AML	39	E	1256.07	151.49	69.29
11	H.E	AML	38	E	953.42	203.16	84.05
12	G.A	AML	65	K	1352.11	223.45	85.26
13	S.A	AML	31	E	1100.00	205.98	94.57
14	G.Y	AML	34	K	1432.84	319.15	82.87
15	R.T	AML	40	E	1185.19	191.61	94.80
16	E.E	AML	35	E	1168.70	131.96	59.03
17	U.K	AML	31	E	1129.41	155.54	58.00
		ORT.	41.18		1434.46	195.55	74.91
S.		%CV	32.00		45.84	27.40	18.53
S.		STD	11.28		657.49	53.58	13.88
S.		VAR	127.15		432304.00	2871.08	192.82
POP.		%CV	26.57		44.47	26.58	17.98
POP.		STD	10.94		637.87	51.98	13.47
POP.		VAR	119.67		406874.71	2702.20	181.48
ST.		HATA	2.74		159.47	12.99	3.36
		MIN	29.00		859.26	131.96	44.28
		MAK	66.00		3183.67	319.15	94.80

Table 4.7 :

KONTROL VE HASTA GRUPLARINDA YAŞ İLE ERİTROSİT İÇİ GPX, SOD, KATALAZ ENZİM AKTİVİTELERİNİN CİNSİYET GRUPLARINA GÖRE DAĞILIMI VE CİNSİYETLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI :

Kontrol ve hasta gruplarındaki yaş ve enzim aktivitelerinde cinsiyet gruplarına göre dağılımın deskriptif istatistik analiz sonuçları ve bu parametreler yönünden cinsler arası anlamlı fark olup olmadığını bulmak için yapılan "Mann-Whitney U" testi sonuçları 0.05 önemlilik düzeyinde (yanılma olasılığı,  $\alpha = 0.05$ ) incelenerek bir sonraki sayfada bulunan tabloda gösterilmiştir.

Bulunan sonuçlar içinde sadece AML grubundaki Glutatyon peroksidaz düzeyleri arasında cinsler arası anlamlı derecede fark bulunmuş olup, bu gruptaki GPX düzeylerinin kadınlarda belirgin derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir.

BİRİM			ORT.	STD	ST. HATA	MIN	MAK	Mann-Whitney U 2-tailed p	CİNSLER ARASI ANLAMLI FARK
KONT-CAT	1k/g Hb	E	335.55	58.34	19.45	71.52	119.60		
KONT-CAT	1k/g Hb	K	307.73	37.16	11.21	74.31	113.63	p=0.1754	P>0.05 F.Y
KONT-GPX	1U/g Hb	E	110.62	9.07	3.03	101.95	130.82		
KONT-GPX	1U/g Hb	K	121.93	19.27	5.81	84.12	147.43	p=0.0952	P>0.05 F.Y
KONT-SOD	1U/g Hb	E	1071.50	189.51	63.17	752.94	1362.96		
KONT-SOD	1U/g Hb	K	1403.29	452.70	136.49	763.44	2277.27	p=0.0674	P>0.05 F.Y
KONT-YAŞ		E	36.66	10.84	3.61	19.00	50.00		
KONT-YAŞ		K	35.00	8.06	2.43	21.00	46.00	p=0.6027	P>0.05 F.Y
KLL-CAT	1k/g Hb	E	233.66	26.19	13.09	57.82	75.14		
KLL-CAT	1k/g Hb	K	194.06	19.36	13.69	51.53	59.36	p=0.2667	P>0.05 F.Y
KLL-GPX	1U/g Hb	E	188.15	47.34	23.67	143.98	243.12		
KLL-GPX	1U/g Hb	K	168.69	2.56	1.82	166.88	170.51	p=0.9999	P>0.05 F.Y
KLL-SOD	1U/g Hb	E	2711.18	901.29	450.64	1520.79	3606.56		
KLL-SOD	1U/g Hb	K	2272.71	294.42	208.19	2064.52	2480.90	p=0.5333	P>0.05 F.Y
KLL-YAŞ		E	47.75	5.91	2.95	42.00	55.00		
KLL-YAŞ		K	54.00	2.83	2.00	52.00	56.00	p=0.2667	P>0.05 F.Y
KML-CAT	1k/g Hb	E	303.39	62.82	36.27	66.29	100.09		
KML-CAT	1k/g Hb	K	233.38	111.99	64.66	38.71	101.57	p=0.7000	P>0.05 F.Y
KML-GPX	1U/g Hb	E	189.45	55.12	31.82	130.19	239.20		
KML-GPX	1U/g Hb	K	142.34	5.14	2.97	138.95	148.27	p=0.7000	P>0.05 F.Y
KML-SOD	1U/g Hb	E	1418.05	237.70	137.23	1271.52	1692.31		
KML-SOD	1U/g Hb	K	1453.23	415.69	240.00	1076.64	1899.28	p=0.9999	P>0.05 F.Y
KML-YAŞ		E	41.00	8.72	5.03	31.00	47.00		
KML-YAŞ		K	54.00	20.81	12.01	30.00	67.00	p=0.7000	P>0.05 F.Y
ALL-CAT	1k/g Hb	E	260.06	49.09	28.34	58.42	84.97		
ALL-CAT	1k/g Hb	K	276.21	82.43	41.22	60.94	113.33	p=0.9999	P>0.05 F.Y
ALL-GPX	1U/g Hb	E	149.49	4.44	2.56	146.90	154.61		
ALL-GPX	1U/g Hb	K	151.37	12.24	6.12	133.25	160.00	p=0.4000	P>0.05 F.Y
ALL-SOD	1U/g Hb	E	1546.56	431.74	249.26	1066.67	1903.45		
ALL-SOD	1U/g Hb	K	1429.49	430.47	215.23	1018.18	1964.29	p=0.8571	P>0.05 F.Y
ALL-YAŞ		E	41.33	22.19	12.81	23.00	66.00		
ALL-YAŞ		K	26.00	14.02	7.01	18.00	47.00	p=0.2286	P>0.05 F.Y
AML-CAT	1k/g Hb	E	253.07	54.37	16.39	44.28	94.80		
AML-CAT	1k/g Hb	K	279.18	37.55	16.79	67.02	93.02	p=0.4409	P>0.05 F.Y
AML-GPX	1U/g Hb	E	172.21	31.15	9.39	131.96	223.45		
AML-GPX	1U/g Hb	K	245.54	66.51	29.74	174.57	319.15	p=0.0275	P<0.05 ***
AML-SOD	1U/g Hb	E	1354.28	616.80	185.97	953.42	3183.67		
AML-SOD	1U/g Hb	K	1684.39	805.31	360.14	859.26	3000.00	p=0.2212	P>0.05 F.Y
AML-YAŞ		E	38.36	7.58	2.28	29.00	52.00		
AML-YAŞ		K	47.80	16.95	7.58	30.00	66.00	p=0.4409	P>0.05 F.Y

Tablo 4.8

KONTROL VE HASTA GRUPLARINDA YAŞ İLE ERİTROSİT İÇİ ENZİM AKTİVİTELERİ ARASI VE ENZİM AKTİVİTELERİNİN BİRBİRİ ARASINDAKİ KORELASYONUN ARAŞTIRILMASI :

Kontrol ve hasta gruplarında yaş ile enzim aktiviteleri arası korelasyon ile enzim aktivitelerinin birbiri arasındaki korelasyonu araştırmak amacıyla, herbir gruptaki kişi sayısının parametrik korelasyon yöntemi uygulamaya elverişli olmaması nedeniyle, amaca en uygun yöntem olması açısından nonparametrik bir yöntem olan "Spearman rank (sıra) korelasyonu" uygulanmıştır. Herbir grup için korelasyon matrisi oluşturulmuş bulunan korelasyon katsayıları (r) ve önemlilik düzeyleri (p) aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

		YAS	CAT	BPX
KONT-CAT	r	0.1866		
KONT-CAT	p	0.4310		
KONT-BPX	r	-0.5455	0.0316	
KONT-BPX	p	0.0130	0.8950	
KONT-SOD	r	0.0301	-0.1023	0.2496
KONT-SOD	p	0.9000	0.6680	0.2890
KLL-CAT	r	-0.4857		
KLL-CAT	p	0.3290		
KLL-BPX	r	0.3143	-0.1429	
KLL-BPX	p	0.5440	0.7870	
KLL-SOD	r	0.2000	-0.0286	0.6571
KLL-SOD	p	0.7040	0.9570	0.1560
KML-CAT	r	0.3714		
KML-CAT	p	0.4680		
KML-BPX	r	0.3714	0.6571	
KML-BPX	p	0.4680	0.1560	
KML-SOD	r	-0.3143	-0.7143	-0.0286
KML-SOD	p	0.5440	0.1110	0.9570
ALL-CAT	r	0.3929		
ALL-CAT	p	0.3830		
ALL-BPX	r	0.0000	0.2143	
ALL-BPX	p	1.0000	0.6450	
ALL-SOD	r	0.0357	0.2500	0.6071
ALL-SOD	p	0.9390	0.5890	0.1480
AML-CAT	r	0.1016		
AML-CAT	p	0.7080		
AML-BPX	r	0.2682	0.5445	
AML-BPX	p	0.3150	0.0290	
AML-SOD	r	-0.1518	-0.0280	0.0972
AML-SOD	p	0.5750	0.9180	0.7200

Tablo 4.9

KONTROL VE HASTA GRUPLARINDA SAPTANAN ERİTROSİT İÇİ GSH-PX, SOD, KATALAZ ENZİMİ AKTİVİTELERİ İLE HERBİR GRUPTA SAPTANAN YAŞ ORTALAMALARININ GRUPLAR ARASI İSTATİSTİKİ YÖNDEN KARŞILAŞTIRILMASI :

Kontrol ve hasta gruplarında saptanan eritrosit içi glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz enzimi aktivitelerinin ve herbir gruba ait yaş ortalamalarının istatistikî yönden karşılaştırılması amacıyla gruplar ilk önce "Kruskall-Wallis tek yönlü varyans analizi" ile test edildi. Bu testin sonucunda tüm gruplarda söz konusu parametreler yönünden istatistiksel olarak fark bulunduğu için ikili karşılaştırmalara tüm gruplar dahil edilerek " Mann-Whitney U " testi uygulandı. Yapılan tüm analizlerin sonuçları aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir. Nonparametrik Kruskall-Wallis tek yönlü varyans analizi sonuçları

	YAŞ	SOD	GPX	CAT
TÜM GRUPLAR	p<0.05	p<0.01	p<0.01	p<0.01

Mann-Whitney U testi sonuçları aşağıdaki tabloda gösterilmiş olup anlamlı farkın bulunduğu durumlar \* işareti ile belirtilmiştir. Not: Aşağıdaki tabloda herbir satırda belirtilen parametre sütunlar için de geçerlidir.

	KLL	KML	ALL	AML
KONT-CAT	!P<0.05	!P>0.05	!P<0.05	!P<0.05
KONT-GPX	!P<0.05	!P<0.05	!P<0.05	!P<0.05
KONT-SOD	!P<0.05	!P>0.05	!P>0.05	!P>0.05
KONT-YAŞ	!P<0.05	!P>0.05	!P>0.05	!P>0.05
KLL-CAT		!P>0.05	!P>0.05	!P>0.05
KLL-GPX		!P>0.05	!P>0.05	!P>0.05
KLL-SOD		!P<0.05	!P<0.05	!P<0.05
KLL-YAŞ		!P>0.05	!P>0.05	!P<0.05
KML-CAT			!P>0.05	!P>0.05
KML-GPX			!P>0.05	!P>0.05
KML-SOD			!P>0.05	!P>0.05
KML-YAŞ			!P>0.05	!P>0.05
ALL-CAT				!P>0.05
ALL-GPX				!P<0.05
ALL-SOD				!P>0.05
ALL-YAŞ				!P>0.05

Tablo 4.10

Aşağıdaki şekillerde herbir gruptaki ortalama enzim aktiviteleri, kontrol ve hasta gruplarında enzimlerin cinslere dağılımları ve herbir gruptaki enzim aktivitelerinin yaşlara göre düzeyleri grafikler halinde verilmiştir.

Şekil 4-1 A`da : Herbir gruba ait ortalama enzim aktiviteleri

Şekil 4-1 B`de : Kontrol grubundaki enzim aktivitelerinin cinslere dağılımı

Şekil 4-1 C`de : Hasta gruplarındaki enzim aktivitelerinin cinslere dağılımı

Şekil 4-1 D,E,F`de : Sırası ile kontrol grubundaki SOD, GPX ve katalaz aktivitelerinin yaşlara göre düzey değişimleri

Şekil 4-2 A,B,C`de KML`deki

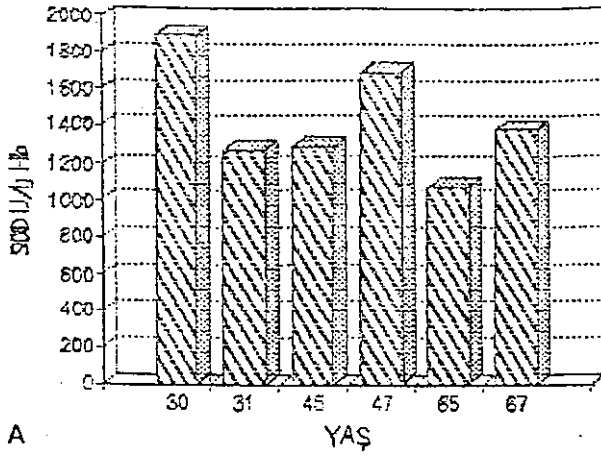
Şekil 4-2 D,E,F`de KLL`deki

Şekil 4-3 A,B,C`de AML`deki

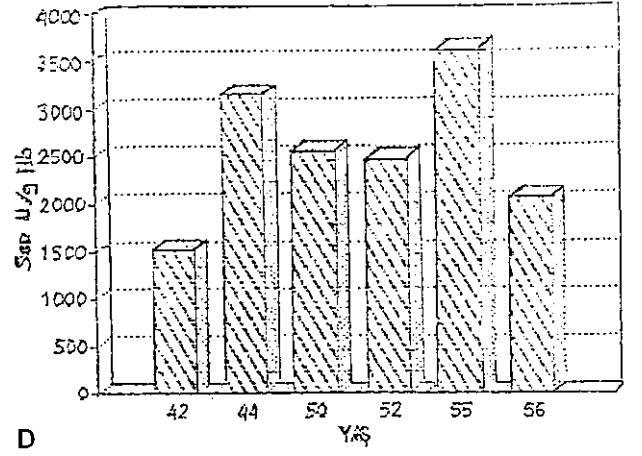
Şekil 4-3 D,E,F`de ise ALL`deki sırası ile SOD, GPX ve katalaz aktivitelerinin yaşlara göre düzey değişimleri gösterilmiştir.



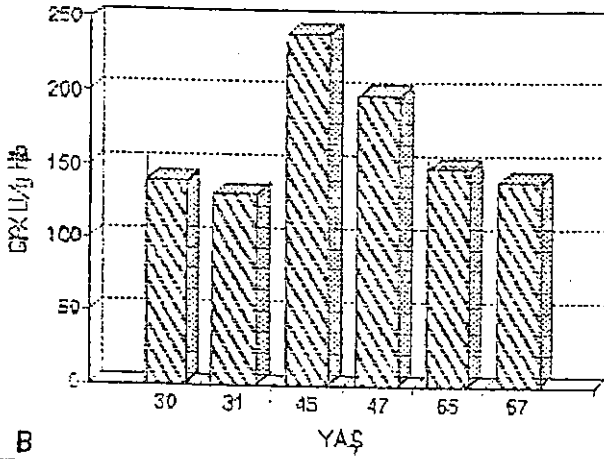
KML'de SOD'in yaşlara göre düzeyleri



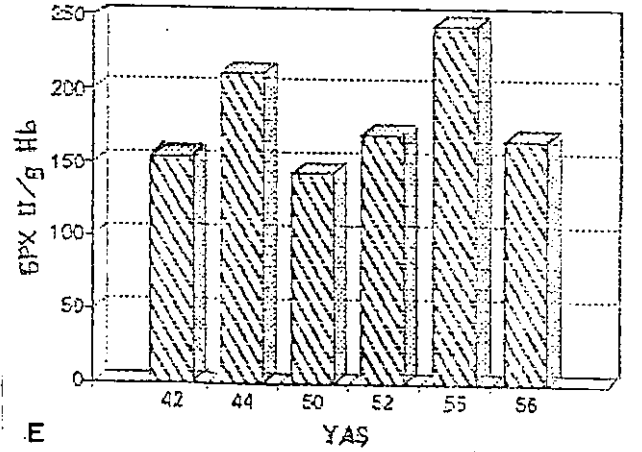
KLL'DE SOD'un yaşlara göre düzeyleri



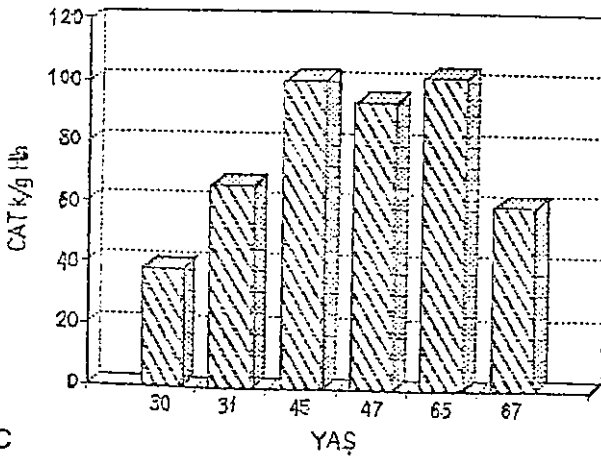
KML'de GPX'in yaşlara göre düzeyleri



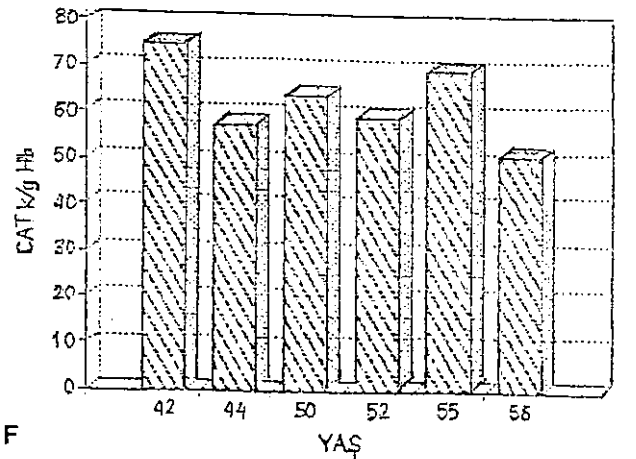
KLL'de GPX'in yaşlara göre düzeyleri



KML'de CAT'in yaşlara göre düzeyleri

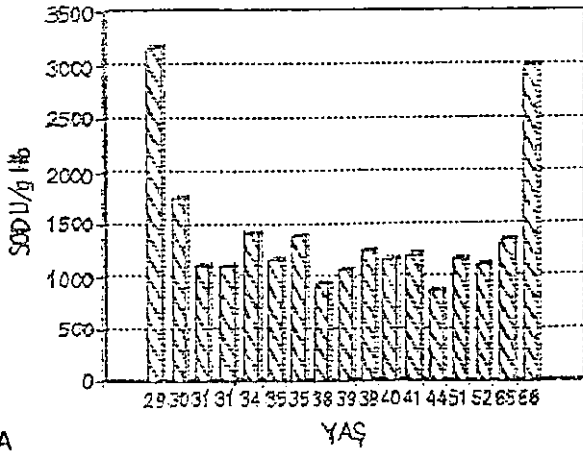


KLL'de CAT'in yaşlara göre düzeyleri



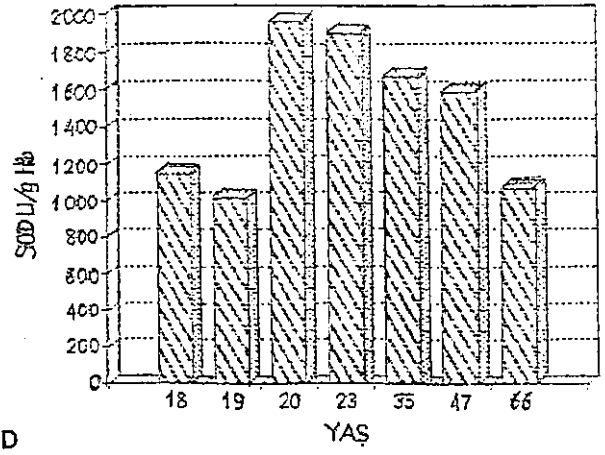
Şekil 4-2

AML'de SOD'in yaşlara göre düzeyleri



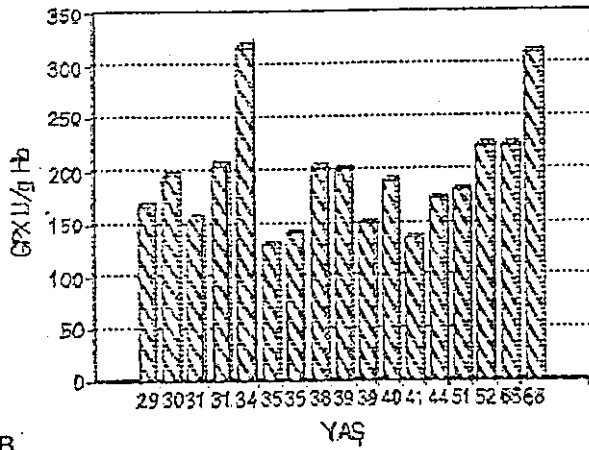
A

ALL'de SOD'in yaşlara göre düzeyleri



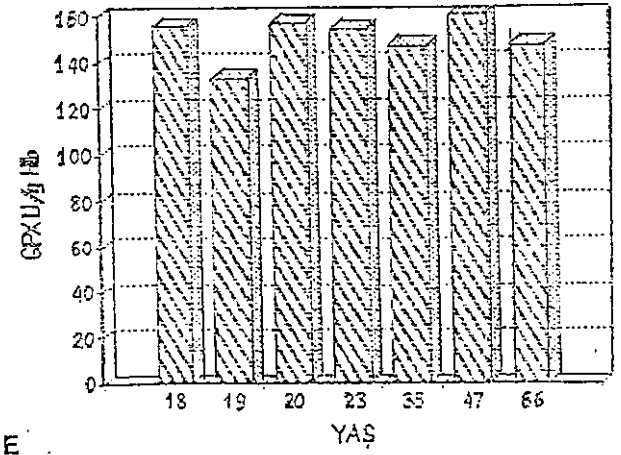
D

AML'de GPX'in yaşlara göre düzeyleri



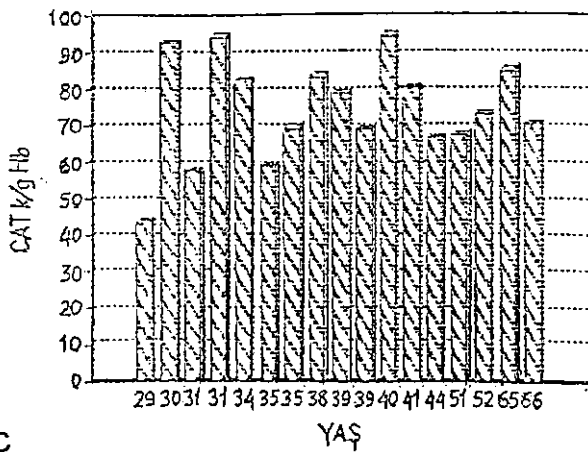
B

ALL'de GPX'in yaşlara göre düzeyleri



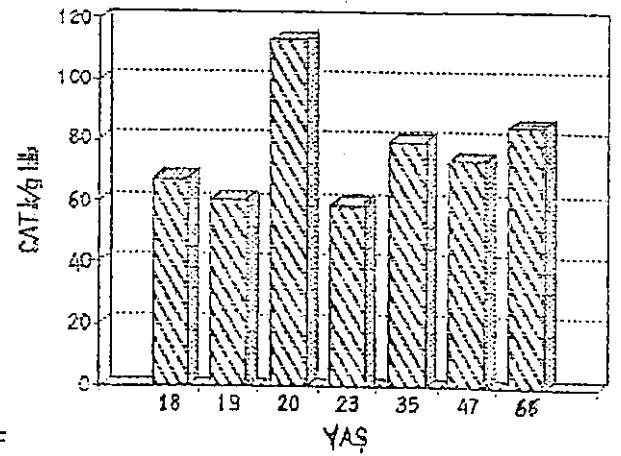
E

AML'de CAT'in yaşlara göre düzeyleri



C

ALL'de CAT'in yaşlara göre düzeyleri



F

##### 5. TARTIŞMA VE SONUÇ :

Hücre içi yerleşimlerine göre dört çeşit SOD vardır. İlki ökaryotik hücrelerin sitozol, nükleus ve mitokondrial intermembran boşluğunda bulunan (toplam mitokondrial SOD'ın % 10'u) CuZn SOD (CuZn SOD'a örnek olarak sığır ve insan eritrositlerinde bulunan eritrokuprein verilebilir), ikincisi mitokondrial matrikste bulunan Mn SOD (toplam mitokondrial SOD'ın % 90'ı), üçüncüsü E.Coli, Streptococcus mutans gibi bakterilerin matriksinde bulunan Mn SOD ve dördüncüsü E.Coli gibi bakterilerin periplazmik boşluğunda bulunan Fe SOD'dır. (11,108,159)

Malign hücrelerin, normal hücrelerden pekçok yönden farklı olduğu bilinir. İn vitro olarak transforme hücrelerde SOD aktivitesinin anormal olduğunu ilk kez 1974'te Yamanaka ve Deamer gösterdi. Bu çalışmada akciğer fibroblast WI-38 hücrelerindeki SOD aktivitesinin, insan embriyonik akciğer dokusundan daha yüksek olduğu ve jel elektroforezinde heriki CuZn ve Mn SOD'a ait bantlar saptanmıştır. SV-40 transforme hücrelerde elektroforezde Mn SOD bandı yokken total SOD aktivitesi normal WI-38 hücrelerden daha yüksek bulunmuştur. Bu olay transformasyondan sonra CuZn SOD aktivitesinin birkaç misli yükseldiğini ortaya koymuştur. (108)

İN vivo olarak malign neoplastik dokularda SOD aktivitesinin değiştiğine ait ilk gözlemler, iki farklı grup tarafından aynı zamanlarda bulundu. İlk defa Dionisi, invivo olarak kanser hücrelerinde SOD baktı. Normal doku olarak sığır kalbi, tümör dokusu olarak Morris hepatoma 3924 A ve Erlich Ascites tümörlü mutant hücrelerden izole edilen mitokondrilerde yapılan çalışmalarda heriki normal ve malign hücrelerin mitokondrial membranlarında süperoksit radikali üretildiğini ve normal hücrelerdeki süperoksit oluşumunun, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşumunda prekürsör olduğunu saptadılar. Hepatoma mitokondrisi SOD aktivitesine sahip değildi ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretmedi. Erlich ascites tümör mitokondrisi az miktar SOD ativitesine sahipti fakat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretmedi. Bu nedenle süperoksit iyonlarının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in prekürsörü olduğu ve bu reaksiyonun SOD tarafından katalizlendiği sonucuna varıldı. Ayrıca Morris hepatomada süperoksit üretim hızı, sığır kalbinden 5 kez fazla idi. Erlich ascites tümörlü hücrelerde süperoksit üretimi sığır kalbine yakındı. (60) Bu nedenle SOD aktivitesi ve süperoksit üretimi invivo tümör hücrelerinde farklı olabilir.

Bu çalışmadan iki yıl kadar sonra diğer grup olan Sahu ve Oberley'in PAGE yöntemini kullanarak Erlich ascites tümör hücrelerinde yaptıkları çalışmada, tümör hücreleri sadece CuZn SOD aktivitesine sahipken, normal fare karaciğer dokusu ekstraktları heriki CuZn SOD ve Mn SOD aktivitelerine sahipti. Bazı tümör hücreleri azalmış sayıda mitokondriye sahip olduğundan Mn SOD azalmasının, mitokondri sayısı azlığına bağlı olabileceği düşünüldü ve bu ihtimali kontrol etmek için normal karaciğer ve tümör hücrelerinden izole edilen mitokondri ekstraktlarına disk jel elektroforezi uygulandığında, normal fare karaciğerinden izole edilen mitokondrilerin heriki CuZn SOD ve Mn SOD içerdiği, halbuki tümör hücre mitokondrilerinin eşdeğer miktarının ise elektroforezde sadece CuZn SOD 'a ait bandı içerdiği görülmüştür. Sonucun güvenilirliğini artırmak için tümör hücre mitokondrilerinin sayısı 10 kat artırılarak test edildiğinde dahi Mn SOD bandı gözlenmemiştir. Bu bulguya göre, daha önce Dionisi'nin yaptığı çalışmada, Erlich ascites tümör hücrelerinde saptanan az miktardaki SOD aktivitesinin, mitokondrinin intermembran boşluğunda bulunan CuZn SOD'a ait olduğu düşünülebilir. Aynı zamanda Dionisi'nin çalışmasında Erlich tümör mitokondrisinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretmediğinin saptanmış olması, bu organelde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretiminden Mn SOD 'un sorumlu olduğunu göstermiştir.

Oberley tarafından fare normal doku ve tümörlerinde yapılan birbaşka çalışmada normal timus lenfositlerinin 15.5 Ü/mg Prot. total SOD aktivitesi ile 5.5 Ü/mg Prot. Mn SOD aktivitesi içerdiği, halbuki L-1210 lösemi hücrelerinin 26.3 Ü/mg Prot. total SOD aktivitesine sahipken Mn SOD aktivitesine hiç sahip olmadığı bulundu.(108) Yamanaka da PAGE yöntemi kullanarak L-1210 hücrelerinin Mn SOD aktivitesi içermediğini saptadı.(11,152)

İnsan tümör hücrelerinde SOD aktivitesi tayini ilk kez Yamanaka tarafından insan lösemi hücrelerinde yapıldı. Myelositik monositik, lenfositik lösemi hücrelerinde saptanan total SOD aktivitesi, benzer tipteki normal olgun kan hücrelerine göre daha yüksek bulundu. PAGE yöntemi ile özellikle immatür tipteki malign hücrelerde Mn SOD aktivitesinin azaldığı yada hiç bulunmadığı gözlemlendi. (11,108,152,153)

İnsan tümörlerinde daha sonra yapılan çalışmalarda Sykes, 46 çeşit insan tümöründe sitozolik SOD aktivitesini araştırmış fakat normal kontrol dokusunda aktivite tayini yapmamıştır. Bununla birlikte tümörün SOD içeriği ile radyasyon duyarlılığı arasında bağlantı olduğunu saptamıştır. (154)

Galeotti insan normal epidermisi ve yassı hücre kanserlerinde CuZn SOD aktivitesine bakmış, yassı hücre kanserinde normalin yarısı kadar aktivite bulmuştur.(11,155) Marklund ve Westman çeşitli insan normal doku ve malign tümörlerinde heriki CuZn SOD ve Mn SOD aktivitesini ölçmüş, hem CuZn, hem de Mn SOD aktivitesini tümör dokularında düşük bulmuştur. (11)

Bu gözlemler, kaynağına bakılmaksızın tüm tümör hücrelerinde Mn içeren mitokondrial matriks enzimi olan Mn SOD aktivitesinin daima normale göre azaldığını yada hiç bulunmadığını, CuZn SOD aktivitesinin ise genelde azalmakla birlikte bazı cins tümörlerde tam tersine arttığını gösterdi. Özellikle lösemilerde CuZn SOD artışı ilginçti. Daha da ilginç istisnasız olarak tüm tümörlerde Mn SOD'ın neden azaldığı idi. Tümör hücrelerinde CuZn SOD aktivitesinin çoğunlukla düşük bulunmasının nedeni olarak, aktivite ölçümleri genelde hızlı bölünen ve hızlı rejenerere olan hücrelerde yapılmış olduğu için, ana hücreden oluşan yavru hücrelerdeki SOD sentezinin doğal olarak henüz olgunlaşmanın tamamlanmamasına bağlı azalmış olabileceği düşünüldü. Diğer yandan hücre içi süperoksit radikali üretiminin esasen hücrenin mitokondrial ve mikrozomal membranlarındaki e transport sistemleri (56,57,60,62,63,64) ve ayrıca hücre nükleusundaki "Fp FAD Monooksijenaz" enzimi tarafından nükleer membranda (11,157,158,159) yapıldığını gözönüne aldığımızda, tümör mitokondrisindeki Mn SOD aktivitesinin azalması, tümör hücre mitokondrisinde oluşan süperoksit radikallerinin dismutate edilememesi nedeni ile süperoksit radikali üretiminde net artışa sebep olacaktır. (108) Nitekim Morris hepatoma hücre mitokondrilerinde SOD aktivitesi hiç saptanmadığı halde, süperoksit radikali üretimi normalden beş kat yüksek bulunmuştur.(60) Diğer yandan Erlich ascites tümör hücrelerinde yapılan bir çalışmada tümör hücre nükleusunda da süperoksit ve hidrojen peroksit üretildiği ve nükleusta SOD aktivitesi bulunduğu ancak bu enzimin süperoksit radikallerinden tam korunmayı sağlamaya yetecek düzeyde üretilmediği (157) saflaştırılmış normal hamster hepatic

nükleuslarında yapılan başka bir çalışmada nükleusta süperoksit radikali üretildiği ve nükleustaki SOD'nın CuZn SOD olduğu saptanmıştır.(159)

Bize göre ayrıca insan lösemik hücrelerinde diğer tümörlerin tersine artmış CuZn SOD aktivitesi bulunması, bunun tümör hücresinde artmış olan süperoksit üretiminin doğrudan yada Mn SOD azalmasına bağlı bir artış olup, CuZn SOD azalmasına dayanan bağıl bir yükseklik olmadığını ve CuZn SOD enziminin süperoksit artışını kompanse etmeye yönelik yükselmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Bugün biliyoruz ki SOD enzimi oksidatif hasara karşı hücredeki enzimatik savunma mekanizmalarının sadece bir parçasını oluşturur. Hücrenin toplam savunma mekanizmalarına bakıldığında diğer çok önemli iki enzim katalaz ve glutatyon peroksidaz`dır.

Bu enzimlerin her ikisinin de tümör hücrelerindeki aktivitelerine bakıldığında, bazı istisnalar dışında genelde azaldığı bulunmuştur. Bu konuda ilk yapılan çalışmalardan birinde 1966 da Ono, sıçan Morris hepatomlarında katalaz aktivitesini ölçtü. Tüm tümörler, çok yavaş büyüyen ve iyi diferensiye olan biri dışında, normal karaciğere göre düşük katalaz aktivitesine sahipti. Katalaz aktivitesi büyüme hızı ile ters orantılı idi.(11,160) Bozzi ve ark. çeşitli fare ve sıçan tümörlerinde heriki katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerini normal karaciğer dokusundan daha düşük buldular. İlginç olarak, tümöre dayanıklı farelerin karaciğerlerinde de heriki enzimin aktiviteleri düşük bulundu.(11,161) Peskin ve ark.`nın yaptığı bir çalışmada glutatyon peroksidaz aktivitesi transplante hepatoma 27 hücrelerinin heriki sitozol ve mitokondrisinde, normal karaciğer hücrelerine göre düşük bulunmuştur. (156)

Docampo ve ark. farelerde, sarkoma 180 ascites hücrelerinde katalaz aktivitesi bulamazken, aynı hücrelerde SOD aktivitesi saptamışlardır.(11) Sun ve Cederbaum hepatoselüler karsinoma HC-252 hücrelerinde, normal karaciğerden önemli derecede daha düşük katalaz aktivitesi tespit etmişler, yine Pinto ve ark. da dietilnitrozamin`in indüklediği karaciğer tümörlerinde, normal karaciğer dokusunun sadece üçte biri oranında katalaz aktivitesi bulmuşlardır.(11)

Şu ana dek, hücrelerin oksidatif metabolizmasında, antioksidan savunma mekanizması açısından çok önemli rol

oynadığına inanılan üç enzim olan, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidazın, genel anlamda tümörlerdeki aktivitelerini ölçmeye yönelik geçmişte yapılan çalışmalardan bahsettik. Bundan sonra bizim asıl ilgilendiğimiz konu olan değişik lösemi tiplerinde, adı geçen üç antioksidan enzimin değişik kan hücrelerindeki ve özellikle de eritrosit içi aktiviteleri ile ilgili yapılmış çalışmalardan bahsedeceğiz ve bunları bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgularla kıyaslayarak yapacağımız yorumlarla konuya bir açıklık getirmeye çalışacağız.

Değişik lösemi tiplerinde kan hücrelerindeki ve özellikle eritrosit içi Süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri ile ilgili yaptığımız "MEDLINE CD" ve "INDEX MEDICUS" taraması neticesi bu konuda şimdiye dek yapılmış az sayıdaki çalışmanın, çalışılan parametre yada çalışılan hastalık tipi açısından bizim konumuzla kısmen çakıştığını gördük. Bu konuda yapılan çalışmaları başlıca eritrositlerde ve lösemik blastlarda yapılanlar şeklinde ikiye ayırabiliriz. Bizim konumuzla direkt ilgili olması açısından öncelikle eritrositlerde yapılan çalışmalara değineceğiz.

#### LÖSEMİLERDE YAPILAN ERİTROSİT İÇİ ÇALIŞMALAR:

Yaptığımız literatür taramasında lösemilerde eritrosit içi antioksidan enzimler konusunda yapılmış başlıca 5 çalışma olduğunu, bunlardan 2'sinin fare ve sıçanlarda yapılan hayvan deneyi olup, 3'ünün insan lösemilerinde yapıldığını saptadık. Bu çalışmalardan, insan lösemilerinde yapılanların ilki 1983'te Pavri tarafından (162) yapılmış olup, lösemilerde eritrosit membranı ve hemoglobinde meydana gelen oksidatif hasar saptanmaya çalışılmış, bu amaçla membran lipidlerinin peroksidasyon hasarını gösteren Malondiáldehit (MDA) ile plazma alfa tokoferol ve eritrosit içi SOD enzim aktivitelerine bakılmıştır. Hastaların 68 % inde plazma alfa tokoferol düzeyleri belirgin derecede düşük bulunurken, SOD aktiviteleri sadece 25 % inde düşük bulunmuştur. Aynı hastalarda MDA yüksek bulunduğundan hastaların eritrosit membranlarında yüksek derecede lipid peroksidasyonu olduğuna karar verilmiş ve MDA, alfa tokoferol ve eritrosit içi SOD aktivitesi arasındaki bu ters bağıntının lösemili hastalarda eritrositlerin oksidan hasara karşı direncinin azaldığını gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Bir diğerk çalışma 1984`te Saito tarafından (163) yayınlanmış olup, akciğerk kanserli 15, malign lenfomalı 11, akut myeloid lösemili (AML) 12 hastada eritrosit içi SOD ve katalaz enzim aktivitelerine bakılmıştır. Akciğerk kanserli hastalarda heriki enzimin de aktiviteleri normal bulunurken, Malign lenfomalı ve AML`li hastalarda her iki enzimin de aktiviteleri düşük bulunmuştur. Üstelik remisyonda olan fakat antikanser ilaç tedavisi almayan malign lenfomalı ve AML` li hastalarda da heriki SOD ve katalaz enzim aktivitelerinde önemli bir düşme görülmüştür. Bu gözlemlere dayanılarak, eritrosit içi SOD ve katalaz aktivitelerindeki azalmanın, kanser tarafından oluşturulduğu ve kanser tipine göre değişiklik gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Bu konuda yapılan diğerk önemli bir çalışma ise yine 1984`te Gonzales ve ark. tarafından (12) yayınlanan ve Akut myeloblastik lösemili (AML), kronik lenfositik lösemili (KLL), Hodgkin hastalığı olan, lenfosarkomalı ve değişik viseral kanserli hastalarda eritrosit içi SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzim aktivitelerinin tayin edildiği çalışmadır. Bu çalışmada, tüm araştırılan vakalarda heriki katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin aktiviteleri, kontrol grubuna göre normal sınırlar içinde bulunurken, eritrosit içi SOD aktivitesinin ise AML`li, KLL`li, lenfosarkomlu ve Hodgkin`li hastalarda önemli derecede yükseldiği, tersine viseral kanserli hasta grubunda ise normal düzeyde olduğu saptanmıştır. Süperoksit düzeyindeki bu artışın, retikülositoz ve hipokrom anemi ile ilgili olmadığı ve SOD düzeyi ile hastalığın evresi, hastalık süresi ve iltihabi sendrom mevcudiyeti arasında bir bağıntı bulunmadığı açıklamıştır. Ayrıca en yüksek SOD düzeylerinin, tedavi edilmeyen yada erken tedavi periyodunda bulunan hastalarda saptandığı ve SOD düzeylerinin tedavi süresindeki artışın bir fonksiyonu olarak azaldığı açıklanmıştır. Bu verilerin "pluripotent stem cell" denen kemik iliği ana hücrelerindeki SOD geni ekspresyonunun düzenlenmesinde, bir anormallik olduğunu ifade ettiği sonucuna varılmıştır.

Eritrosit içi antioksidan enzim aktiviteleri konusunda hayvanlarda yapılmış olan ve literatür taramasında saptayabildiğimiz sadece iki çalışmadan biri, 1988`de Madej tarafından (164) yayınlanmış olup, naturel lenfositik lösemili fare soyunda eritrositlerdeki SOD, katalaz ve glutatyon

peroksidaz enzimlerinin aktivitesi, doğum sonrası 0,90,180 ve 270 `nci günlerde ölçülmüş ve her üç enzimin aktivitesinin de lösemi gelişimi esnasında azaldığı gözlenmiş ve farelerde lösemi gelişimi esnasında serbest radikallere karşı bu enzimlerin koruyucu rolünün bozulduğu sonucuna varılmıştır.

Lösemik hayvanlarda eritrosit içi enzim aktivitelerinin ölçüldüğü diğer çalışmayı 1989 `da Kuvshinnikov (165) yayınlamış, murine lösemili farelerin eritrositlerinde vitamin E ve diketogulonik asit (DKGA) düzeylerinin düşük, MDA seviyesinin yüksek, glutatyon içeriğinin azalmış ve SOD aktivitesinin artmış olduğunu gözlemlemiştir. Ayrıca antioksidan kompleks olarak A, E ve C vitaminlerinin kullanımının eritrositlerin enzimatik ve nonenzimatik antioksidan savunmasını iyileştirdiğini saptamıştır.

#### **LÖSEMİK BLASTLARDA YAPILAN ÇALIŞMALAR:**

Lösemik blastlarda yapılan çalışmalara da bakacak olursak, bu konuda yaptığımız taramalarda, insanlarda yapılmış 5 ve hayvanlarda yapılmış 4 çalışma saptadık.

Bunlardan ilki, Yamanaka ve ark. tarafından (153) 1978`de yapılmış olup, insan myelositik (n=6, 3 AML, 3 KML), monositik(n=2), lenfositik lösemi(n=2, 1 ALL, 1 KLL) hücrelerinde total SOD aktivitesinin, kontrol grubunun (n=3) karşılık gelen hücrelerine göre arttığı bulunmuştur. Daha önce de bahsettiğimiz gibi bu çalışma aynı zamanda insan tümörlerinde yapılan ilk çalışma olması açısından da önemlidir.

Diğer bir çalışma Yoshimitsu ve ark. tarafından (13) 1984`te yaşları 1-14 arası değişen, 20`si ALL`li, 4`ü AML`li olmak üzere akut lösemili toplam 24 çocuğun lösemik blastlarında SOD enzim aktivitesi tayini yapılmış , total SOD aktivitesi T yada B hücre lösemili 5 hastada önemli derecede azalmış, non-T, non-B hücre lösemili 15 hastada aktivite yönünden geniş bir dağılım saptanmış olup tüm ALL tiplerinde Mn SOD aktivitesi normal kontrol hücrelerine göre daha düşük bulunmuştur. AML`li hastalarda ise heriki total ve Mn SOD aktiviteleri, normal kontrol hücrelerinden önemli derecede daha yüksek bulunmuştur. Düşük SOD aktiviteli hastalarda, prognozun kötü olduğu gözlenmiş ve lösemik blastlarda SOD aktivite tayininin akut lösemili çocukların tedavisinde prognostik değere sahip olabileceği ileri sürülmüştür.

Bir başka çalışma Kökoğlu ve ark. (166) tarafından 1989`da yayınlanmış, yaşları 16-65 arası değişen 17 AML, 16 ALL, 6 KML

ve 9 KLL' li hastada polimorfnükleer yada mononükleer gibi hücre tipi ayrımı yapmadan, lökosit içi SOD aktivitesi saptanmış ve tüm lösemi tiplerinde SOD enzim aktivitelerinin normalden önemli derecede yüksek olduğu, buna karşılık remisyonda normale düştüğü bulunmuştur. Lösemi tipi ile SOD düzeyi arasında ilişki saptanmamıştır.

İnsan lösemi hücrelerinde tespit edebildiğimiz diğer çalışma, 1989' da Saito ve ark.(167) tarafından yayınlanan, insan monositik ve promyelotik lösemi hücrelerinde yapılan çalışma olup, " 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) " yada "dimethylsulfoxide (DMSO)" tarafından indüklenen, insan monositik lösemi U-937 hücreleri yada promyelotik lösemi HL-60 hücrelerinin diferensiyasyonu esnasında moleküler bir probe kullanarak CuZn SOD mRNA'sının düzey değişiklikleri saptanmış ve diferensiyasyon seyri esnasında spesifik olarak azaldığı bulunmuştur. Halbuki insan B-hücreli lösemi hücrelerinin yada normal diploid fibroblastların TPA ile muamelesi neticesi CuZn SOD mRNA'sında herhangi bir düzey değişimi olmamıştır. Öyleyse CuZn SOD mRNA düzeyinin azalması (yani CuZn SOD geni ifadesinin azalması), diferensiyasyona özgüdür.

İnsan lösemik hücrelerinde yapılmış tespit edebildiğimiz son çalışma, 1989 'da Auwerx ve ark. tarafından (168) yayınlanan çalışmadır. Bu çalışmada yine, bir üstteki çalışmaya benzer şekilde, myelo-monositik orjinli hücrelerin (THP-1, HEL ve HL-60 insan lösemik hücre kültürleri kullanılarak) terminal diferensiyasyonu esnasında, hSOD1 mRNA'sının steady-state düzeyi ve hSOD-1 geni transkripsiyon hızı ölçülerek, hSOD1 mRNA sında düzey değişimi olup olmadığı araştırılmıştır. Makrofaj diferensiyasyonu SOD1 mRNA' sının transkripsiyon hızı ve steady-state düzeyinde kademeli bir azalma ile sonuçlanmış, PMA benzeri olan ve kullanılan konsantrasyonda protein kinaz C' yi de aktive eden fakat diferensiyasyonu indüklemeyen bir diacylglycerol analogu (di-C8) ile muamele sonrası, SOD1 mRNA'sında azalma gözlenmemiştir. HL-60 hücrelerinin DMSO tarafından granülositlere diferensiyasyonu indüklendiği zaman SOD1 mRNA düzeyinde aynı azalma gözlenmiştir. Bu verilere göre SOD1 mRNA'sının saptanamayacak düzeylere dek azalmasının, makrofaj ve granülositlerin diferensiyasyonuna eşlik ettiği öne sürülmüştür.

Hayvan lösemik hücrelerinde yapılan çalışmalara baktığımızda ilk çalışmanın 1978`de Yamanaka tarafından (152) PAGE yöntemi kullanılarak, L-1210 lösemi hücrelerinde yapıлып, hiç Mn SOD aktivitesi saptanmadığından, bir diğer çalışmanın ise 1979`da Oberley tarafından (108) yayınlandığından ve farelerde L-1210 lösemi hücrelerinde total SOD aktivitesinin normalden yüksek, halbuki Mn SOD aktivitesinin ise hiç bulunmadığından bahsetmiştik. Diğer çalışmalar 1988`de Brown (169) ve yine 1988`de Paoletti tarafından (170) yapılmıştır. Brown L-1210 lösemi hücrelerinde azalmış SOD aktivitesi saptamış, Paoletti ise murine eritrolösemi hücrelerinde "hexamethylene bisacetamide" tarafından indüklenen diferensiyasyon esnasında CuZn SOD aktivitesinin kontrol grubuna göre 2 kat yükseldiğini saptamıştır.

Bizim yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz bulgulara gelince, KLL (n=6), KML (n=6), ALL (n=7) ve AML (n=17) olmak üzere 4 tip lösemi grubunda eritrosit içi antioksidan enzim aktiviteleri çalışılmış ve bulgular kontrol grubu (n=20) ile karşılaştırılmıştır.

Eritrosit içi SOD aktivitesi yönünden tüm hastalık gruplarının tek tek ortalamaları, kontrole göre yüksek olduğu halde sadece KLL grubunda kontrole göre "anlamli derecede yükseklik" bulunmuştur.

Eritrosit içi GSH-PX aktivitesi yönünden, tüm gruplar kontrolden "anlamli derecede yüksek" bulunmuştur.

Eritrosit içi katalaz aktivitesi yönünden, tüm grupların ortalamaları kontrolden düşük olduğu halde, KML grubunda anlamli fark bulunmayıp, KLL, ALL ve AML grupları ise kontrol grubuna göre "anlamli derecede düşük" bulunmuştur.

Herbir hastalık grubunun kendi içinde, antioksidan enzim aktiviteleri yönünden, cinsler arası anlamli fark olup olmadığına bakıldığında, sadece AML`de GSH-PX aktivitesi yönünden cinsler arası "anlamli fark" bulunmuş olup (kadınlarda daha yüksek), başka hiçbir grupta enzim aktiviteleri yönünden, cinsler arası anlamli fark bulunmamıştır.

Bizim sonuçlarımız, KLL`de eritrosit içi SOD aktivitesinin anlamli derecede yüksek bulunmuş olması açısından Gonzales (12), AML`de eritrosit içi katalaz aktivitesinin anlamli derecede düşük bulunması açısından ise Saito`nun (163) bulduğu sonuçla uyumludur. Zaten bu konuda, gerek insan ve hayvanlarda yapılan az sayıdaki çalışmalarda elde edilen sonuçların birbirleri ile

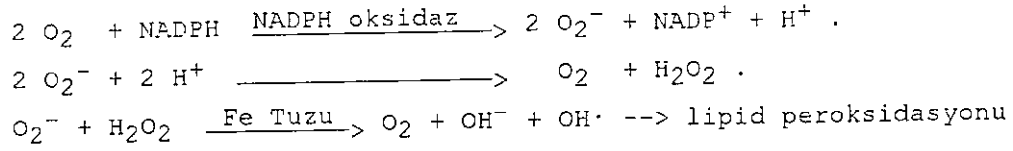
uyumsuz olması, gerekse bu çalışmalardaki lösemi tipi ve bakılan parametrelerin birbiri ile tam çakışmaması nedeniyle tam bir fikir birliği yoktur. Bu yüzden bulduğumuz sonuçları tam olarak karşılaştırabilmemiz mümkün değildir. Gonzales AML ve KLL'de eritrosit içi GSH-PX aktivitesini normal bulurken, biz tüm lösemi gruplarında bu enzimin aktivitesini yüksek bulduk. Buna karşın Madej (164), farelerde naturel lenfositik lösemi gelişimi esnasında, eritrositlerde diğer iki enzimle birlikte GSH-PX aktivitesini de düşük bulmuştur.

Bu konuda yapılan çalışmalar ve elde ettiğimiz bulgulardan, lösemilerde eritrosit membranında oluşan lipid peroksidasyonuna karşı antioksidan enzim aktivitelerinin değiştiği, özellikle KLL'de SOD aktivitesini anlamlı derecede yüksek, diğer lösemi gruplarındaki SOD aktivitelerinin ise istatistiki açıdan anlamlı olmasa da ortalamalar açısından daha yüksek bulmamız ve tüm lösemi gruplarında GSH-PX aktivitesini anlamlı derecede yüksek, ayrıca KML dışında tüm lösemi gruplarında katalaz aktivitesini anlamlı derecede düşük bulmuş olmamız itibarıyla, kemik iliğinin pluripotent ana hücrelerinde, ilk iki enzime ait gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde artış yönünde, katalazda ise azalma yönünde bir anormallik olduğunu düşünebiliriz.

Lösemik hücrelerde yapılan çalışmalarda, diğer tüm tümör hücrelerinde olduğu gibi mitokondrial Mn SOD aktivitesinin istisnasız olarak azaldığını ve Mn SOD azalmasına bağlı olarak mitokondrial elektron transport zincirinde  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$  oluşumunun arttığını, yine yapılan bazı çalışmalarda lösemik blastlarda CuZn SOD aktivitesinin yükseldiğini biliyoruz.(11,60,108,152,153)

Biz lösemik blastlardaki bu CuZn SOD yükselişinin, Mn SOD azalmasını kompanze etmeye yönelik bir artış olduğunu düşünmekteyiz fakat lösemik hücrelerde net olarak artmış olan süperoksit üretimini gözönüne aldığımızda bu kompenzasyonun tam yapılamadığı açıkça görülmektedir. Ayrıca lösemilerde ister polinükleer ister mononükleer olsun artmış olan fagositik lökosit ve lösemik blastların sayısını gözönüne aldığımızda sayısal olarak artmış olan bu fagositik lökositlerdeki NADPH oksidaza bağlı olarak, respiratory burst dediğimiz solunumsal patlamanın da aşırı miktarda artmış olabileceğini ve sonuçta  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^-$  ve diğer oksijen serbest radikallerinin artmış oluşumuna sebep

olduğunu düşündüğümüzde, eritrosit membran lipidleri gibi biyolojik membran lipidlerinin peroksidatif hasar zincirinin kolaylıkla başlaması için yeterli sebep oluştuğu görülmektedir.



İşte bu nedenledir ki, kemik iliğinin "pluripotent stem cell" dediğimiz ana hücrelerinden başlamak üzere, eritrosit içi antioksidan savunma mekanizmaları devreye girmekte ve gerek lösemik blastlarda artmış  $\text{O}_2\cdot$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}\cdot$  ve diğer oksijen türevi serbest radikaller olsun, gerekse oluşan bu radikallerin eritrosit membran lipidlerinde yaptığı peroksidatif hasar neticesi oluşan "yağ asidi C radikali" ( $\text{R}\cdot$ ), "lipid hidroperoksil radikali" ( $\text{RO}_2\cdot$ ) gibi ikincil, üçüncül biyolojik radikaller neticesi eritrosit içi antioksidan savunma mekanizmaları devreye girmektedir. Biz çalışmamızda bulduğumuz eritrosit içi yükselmiş SOD ve GSH-PX aktivitelerinin bu nedenle artmış olduğunu düşünmekteyiz. Diğer yandan gerek bizim tüm lösemi tiplerinde bulduğumuz (KML`de anlamlı derecede olmamakla birlikte) eritrosit içi düşük katalaz aktivitesi, gerekse ister lösemi ister diğer tümörler olsun bu konuda yapılmış olan diğer çalışmalarda bulunmuş olan eritrosit içi yada tümör hücresi içi katalaz aktivitelerinde artış tespit edilemeyip normal yada düşük aktivite bulunmuş olmasının neticesi olarak bu hastalıkta ve diğer tümörlerde  $\text{H}_2\text{O}_2$  detoksifikasyonunda GSH-PX`ın katalazdan daha önemli rol oynadığı düşünülebilir.

Bize göre esas tartışılacak nokta, oksijen serbest radikallerinin ve antioksidan enzim aktivitesindeki değişikliklerin, tümör oluşumunun sebebi mi, yoksa sonucu mu olduğudur. Kanseri oluşum teorilerinde bahsettiğimiz gibi, "radikal hasar teorisi" ne göre radikal hasarı ister direkt radikal oluşumunun artmasına, isterse radikal oluşum hızı ve miktarı normal olduğu halde, radikal yokediciler enzimatik yada nonenzimatik antioksidanların bağıl eksikliğine bağlı olsun, kanser oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Kanseri oluştuktan

sonra ise normal metabolizması bozulmuş olan hücrede radikal oluşumu direkt yada dolaylı (azalmış antioksidan aktiviteye bağlı olarak) yoldan artmakta ve radikal hasarı hücre ölene dek gittikçe daha da büyümektedir. Çoğu kanserin bir kere oluştuktan sonra tam olarak tedavi edilememesinin ve geri dönüşsüz olmasının temel sebeplerinden biri belki de en önemlisi budur. Özellikle DNA üstündeki hassas noktalarda radikal hasarına bağlı tamir edilemeyen can alıcı değişiklikler sonucu oluşan "onkogen aktivasyonları" kanser oluşum mekanizmalarının son basamağında yer alır. Tüm vücut hücrelerindeki hasarlanmış DNA'yı tamir edip, aktif onkogenleri tekrar inaktif hale geçirmeye yönelik "gen tedavisi" gibi bugün için oldukça zor görünen tedavi yöntemleri, "transgenik hayvan" deneylerinin sonucu olarak umuyoruz ki birgün gerçek olacaktır. Ancak kabul etmeliyiz ki günümüzde, insan organizmasındaki milyarlarca hücrede bulunan hasarlanmış DNA'yı tamir etmek, onun hasarlanmasını önleyecek basit korunma yöntemlerini uygulamaktan çok daha zordur.

## 6. ÖZET :

Akut ve kronik lösemili hastaların eri rosit içi Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GPX) ve Katalaz (CAT) aktivitesi ölçülerek kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

KLL'li 6, KML'li 6, ALL'li 7 ve AML'li 17 hastadan ve kontrol grubu olarak sağlıklı 20 kişiden alınan kan örnekleri işlemlenmiştir.

Eritrosit içi SOD aktivitesinin tüm gruplarda, ortalamalar yönünden kontrole göre daha yüksek olduğu, fakat bu yüksekliğin KLL grubunda anlamlı derecede bulunduğu, eritrosit içi GPX aktivitesinin tüm gruplarda kontrole göre anlamlı derecede yüksek olduğu, katalaz aktivitesi yönünden ise, tüm grupların ortalaması kontrolden daha düşük bulunduğu halde, bu düşüklüğün KML dışındaki gruplarda anlamlı derecede olduğu saptanmıştır. Ayrıca sadece AML grubunda, GPX aktivitesi yönünden cinsler arası anlamlı fark bulunmuş olup, diğer grupların hiçbirinde, enzim aktiviteleri yönünden cinsler arası anlamlı fark bulunmamıştır.

Bu bulgulara göre kemik iliği pluripotent ana hücrelerinde SOD ve GPX'e ait gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde artış yönünde, katalazda ise azalma yönünde bir anormallik olduğu, ayrıca lösemilerde antioksidan savunma mekanizması olarak, CuZn SOD ve GPX enzimlerinin, katalaza göre daha önemli olduğu düşünülebilir.

## 6. SUMMARY :

In patients with acute and chronic leukemia, Superoxide dismutase (SOD), Glutathione peroxidase (GPX) and Catalase (CAT) activities were measured in red blood cells (RBCs) and were compared with the control group.

The blood samples that were collected from 6 patients with CLL, 6 patients with CML, 7 patients with ALL and 17 patients with AML were proceeded.

In all groups, SOD activities of RBCs were higher than the control group with respect to averages but there was a meaningful elevation only in CLL group. In all groups, GPX activities of RBCs were meaningfully higher than the control group and in all groups, the Catalase activities were lower than the control group

with respect to averages, but in the other groups except CML, this decrease was important. Furthermore, in only AML group, there was an important difference between genuses with respect to GPX activities.

For these reasons , it can be thought that the gene expressions belonging to SOD and GPX were increased and the gene expression belonging to CAT was decreased in human leukemia cells. In addition, it can also be thought that the CuZn SOD and GPX enzymes are more important than the CAT as antioxidant defense mechanism in human leukemias.

#### TEŞEKKÜR:

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, hasta temini konusunda katkılarını esirgemeyen Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn'i Sina Hastanesi Hematoloji-Onkoloji kliniği profesörlerinden ve benim Tıp Fakültesinden hocam olan sayın Prof.Dr. V.Akın Uysal'a, istatistik analizler konusunda değerli yardımlarını gördüğüm sayın Doç.Dr. Saim Yoloğlu'na ve bu çalışmayı yapmam hususunda beni yönlendiren tez danışmanım sayın Prof.Dr. Engin M.Gözükara hocama teşekkürlerimi sunarım.

Dr. İsmail Çetin Öztürk.

## 7. KAYNAKLAR:

1. Southorn P.A., Powis G. Free Radicals in Medicine. I. Chemical Nature and Biologic Reactions. Mayo Clin Proc. 1988;63:381-389
2. Halliwell B., Gutteridge M.C. Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease: An Overview. In: Methods in Enzymology (Abelson J.N., Simon M.I. Edit) Academic Press, San Diego, California 1990, Vol:186, Sayfa:1-85
3. Jain S.K., Vie R.M., Duett J., Herbst J.J. Erythrocyte Membrane Lipid Peroxidation and Glycosylated Hemoglobin in Diabetes. Diabetes 1989;38:1539-1543.
4. Borek C. In vitro Cell Cultures as Tools in the Study of Free Radicals and Free Radical Modifiers in Carcinogenesis. In: Methods in Enzymology (Colowick S.P., Kaplan N.O. Edit) Academic Press, Orlando, Florida 1984, Vol:105, Sayfa:464-479
5. Sohal R.S., Farmer K.J., Allen R.G. Involvement of Prooxidants and Antioxidants in Cellular Differentiation and Aging Process: A Hypotesis. In: Superoxide and Superoxide Dismutase in Chemistry, Biology and Medicine (Rotilio G. Edit) Elsevier Science Publishers B.V, Rome, Italy 1986, Sayfa:461-463
6. Schersten T., Hansson R., Pettersson S. The Role of Oxygen Free Radicals for Postischemic Kidney Damage. In : Superoxide and Superoxide Dismutase in Chemistry, Biology and Medicine (Rotilio G. Edit) Elsevier Science Publishers B.V, Rome, Italy 1986, 621-626
7. Aukrust P., Müller F., Froland S.S. Enhanced generation of reactive oxygen species in monocytes from patients with common variable immunodeficiency. Clin Exp Immunol 1994;97:232-238
8. Jaya D.S., Augstine J., Menon V.P. Role of lipid peroxides, glutathione and antiperoxidative enzymes in alcohol and drug toxicity. Indian J. Exp. Biol. 1993;31:453-459
9. Lunec J. Free radicals: their involvement in disease processes. Review Article. Ann Clin Biochem 1990;27:173-182
10. Kurata M., Suzuki M., Agar N.S. Antioxidant systems and erythrocyte life span in mammals. Mini Review. Comp. Biochem. Physiol. 1993;106-B, No 3, sayfa:477-487
11. Oberley L.W. Superoxide Dismutase and Cancer. In: Superoxide Dismutase. (Oberley L.W. Edit) CRC Press Florida 1982, Vol: II Sayfa:127-165

12. Gonzales R., Auclair C., Voisin E., Gautero H., Dhermy D., Boivin P. Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase in Red Blood Cells from Patients with Malignant Diseases. *Cancer Res.* 1984;44:4137-4139
13. Yoshimitsu K., Kobayashi Y., Usui T. Superoxide Dismutase Activity in Leukemic Blasts of Children with Acute Leukemia. *Acta Paediatr. Scand.* 1984;73:92-96
14. McBride T.J., Preston B.D., Loeb L.A. Mutagenic Spectrum Resulting from DNA Damage by Oxygen Radicals. *Biochemistry* 1991;30:207-213
15. Oberley L.W., Oberley T.D., Buettner G.R. Cell division in normal and transformed cells: the possible role of superoxide and hydrogen peroxide. *Med. Hyp.* 1981;7:21-23
16. Lotem J., Sachs L. Potential pre-screening for therapeutic agents that induce differentiation in human myeloid leukemia cells. *Int. J. Cancer.* 1980;25:61-64
17. Goetz I. Oxygen Toxicity in normal and neoplastic cells in culture. *In Vitro* 1975;11:382-385
18. Mitchell R.S., Elgas R.J., Balk S.D. Proliferation of Rous sarcoma virus-infected, but not of normal chicken fibroblasts in oxygen-enriched environment: preliminary report. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1976;73:1265-1267
19. Bartoli G.M., Galeotti T. Growth-related lipid peroxidation in tumor microsomal membranes and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1979;574:537-540
20. Bartoli G.M., Bartoli S., Galeotti T., Bertoli E. Superoxide Dismutase Content and Microsomal Lipid Composition of Tumours with Different Growth Rates. *Biochim. Biophys. Acta* 1980;620:205-211
21. Southorn P.A., Powis G. Free Radicals in Medicine. II. Involvement in Human Disease. *Mayo Clin Proc.* 1988;63:390-408
22. Cerutti P.A. Prooxidant States and Tumor Promotion. *Science* 1985;227:375-381
23. Emerit I., Cerutti P.A. Tumour promoter phorbol-12-myristate - 13-acetate induces chromosomal damage via indirect action. *Nature* 1981;293:144-146
24. O'Brien P.J. Free Radical Mediated DNA Binding. *Environmental Health Perspectives* 1985;64:219-232

25. Cavalieri E., Rogan E. Role of Radical Cations in Aromatic Hydrocarbon Carcinogenesis. Environmental Health Perspectives 1985;64:69-84
26. Weitberg A.B., Weitzman S.A., Destremes M., Latt S.A., Stoszel T.P. Stimulated Human Phagocytes Produce Cytogenetic Changes in Cultured Mammalian Cells. New.Eng.J.Med 1983;308:26-30
27. Borek C., Troll W. Modifiers of free radicals inhibit in vitro the oncogenic actions of X-rays, bleomycin and the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate. Proc.Natl.Acad.Sci USA 1983;80:1304-1307 Cell Biology
28. Ishida R., Takahashi T. Increased DNA chain breakage by combined action of bleomycin and superoxide radical. Biochem. Biophys. Res. Comm. 1975;66:1432-1438
29. Lown J.W., Sim S.K., Majumdar K.C., Chang R.Y. Strand scission of DNA by bound adriamycin and daunorubicin in the presence of reducing agents. Biochem. Biophys. Res. Comm. 1977;76:705-710
30. Thayer W.S. Adriamycin stimulated superoxide formation in submitochondrial particles. Chem. Biol. Interactions. 1977;19:265
31. Goodman J., Hochstein P. Generation of free radicals and lipid peroxidation by redox cycling of adriamycin and daunomycin. Biochem. Biophys. Res. Comm. 1977;77:797-803
32. Green M.J., Hill H.A.O. Chemistry of Dioxygen. Methods in Enzymology (Colowick S.P., Kaplan N.O. Edit) Academic Press. Orlando, Florida 1984, Vol:105 sayfa:3-22
33. Moon B.C., Girotti M.J., Wren S.F.G., Dawson R., Brar D. Effect of Antibiotics and Sedatives on Normal Neutrophil Nicotinamide-Adenine Dinucleotide Phosphate-Reduced Oxidase Activity. Arch. Surg. 1986;121:73-76
34. Akpoyraz M. Organik Kimya. Ankara Ü. Tıp Fak. Yayını. Sayı:413 Ankara 1981 sayfa:1-16
35. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları. Konya 1995, sayfa:1-81
36. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Review Article. Biochem. J. 1984;219:1-14
37. Foote C.S., Shook F.C., Abakerli R.B. Characterization of Singlet Oxygen. Methods in Enzymology. (Colowick S.P., Kaplan N.O Edit) Academic Press. Orlando, Florida 1984, Vol:105, Sayfa:36-47

38. Allen A.O., Bielski B.H.J. Formation and Disappearance of Superoxide Radicals in Aqueous Solutions. Superoxide Dismutase. (Oberley L.W. Edit) CRC Press. Florida 1982, Vol:I Sayfa:125-141
39. Zigler J.S., Goosey J.D. Singlet Oxygen Formation in the Lens of Eye. Photochem.Photobiol. 1981;33:869-871
40. Evensen J.F., Sommer S., Moan J., Christensen T. Tumor-localizing and Photosensitizing Properties of the Main Components of Hematoporphyrin Derivative. Cancer Res. 1984;44:482-486
41. Pathak M.A., Joshi P.C. Production of active oxygen species by psoralens and ultraviolet radiation. Biochim.Biophys.Acta. 1984;798:115-126
42. Sik R.H., Paschall C.S., Chignell C.F. Photochem.Photobiol. 1983;38:411-414
43. Hasan T., Khan A.U. Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A 1986;83:4604
44. Epe B., Hegler J., Wild D. Singlet oxygen as an ultimately reactive species in salmonella typhimurium DNA damage induced by methylene blue/visible light. Carcinogenesis. 1989;10:2019-2024
45. Ribeiro D.T., Madzak C., Sarasin A., Mascio P.D., Sies H. Menck C.F.M. Photochem.Photobiol. 1992;55:39-45
46. Mascio P.D., Menck C.F.M., Nigro R.G., Sarasin A., Sies H. Singlet molecular oxygen induced mutagenicity in a mammalian SV40-based shuttle vector. Photochem.Photobiol. 1990;51:293-298
47. Sarasin A. Shuttle vectors for studying mutagenesis in mammalian cells. New Trends in Photobiol(Invited Review) J.Photochem.Photobiol. B:Biological. 1989;3:143-155
48. Brunori M., Rotilio G. Biochemistry of Oxygen Species. Methods in Enzymology (Colowick S.P., Kaplan N.O. Edit) Academic Press. Florida 1984, Vol:105, sayfa:22-35
49. Asada K. Chloroplasts: Formation of Active Oxygen and Its Scavenging. Methods in Enzymology (Colowick S.P., Kaplan N.O Edit) Academic Press. Florida 1984, Vol:105, sayfa:422-429
50. Boveris A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. Methods in Enzymology. (Colowick S.P, Kaplan N.O Edit) Academic Press. Florida 1984, Vol:105, sayfa:429-435
51. Czapski G. Reaction of  $\cdot\text{OH}$  Methods in Enzymology (Colowick S.P., Kaplan N.O. Edit) Academic Press. Florida 1984, Vol:105, sayfa:209-215

52. Markert M., Andrews P.C., Babior B.M. Measurement of  $O_2^-$  Production by Human Neutrophils. The preparation and Assay of NADPH Oxidase-Containing Particles from Human Neutrophils. Methods in Enzymology (Colowick S.P., Kaplan N.O. Edit) Academic Press. Florida 1984, Vol:105, sayfa:358-365
53. O'Brien P.J. Superoxide Production. Methods in Enzymology. (Colowick S.P., Kaplan N.O. Edit) Academic Press. Florida 1984, Vol:105, sayfa:370-378
54. Gözükara E.M. Biyokimya. Ofset Repromat. Ankara 1990, Sayfa:876-918
55. Maestro R.D. Systemic Consequences of  $O_2^-$  Production. Methods in Enzymology (Colowick S.P., Kaplan N.O. Edit) Academic Press. Florida 1984, Vol:105, sayfa:386-389
56. Jensen P.K. Antimycin Insensitive Oxidation of Succinate and Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide in Electron Transport Particles. Biochim.Biophys.Acta 1966;122:157-161
57. Loschen G., Azzi A., Richter C., Flohe L. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. F.E.B.S. Lett. 1974;42:68
58. Smith E.L, Hill R.L, Lehman I.R, Lefkowitz R.J, Handler P, White A. Biological Oxidations I,II. Principles of Biochemistry. (General Aspects) Seventh Edition, Mc Graw Hill 1983, Sayfa:316-356, 357-384
59. Mayes P.A Biologic Oxidation , Oxidative Phosphorylation & Mitochondrial Transport Systems. Harper's Biochemistry 22<sup>th</sup> Edit. Appleton & Lange book. 1991, sayfa:105-123
60. Dionisi O, Galeotti T, Terranova T, Azzi A. Superoxide radicals and hydrogen peroxide formation in mitochondria from normal and neoplastic tissues. Biochim.Biophys.Acta 1975;403:292-300
61. Nohl F, Jordan W. Investigations on the identity of the autoxidizable component of the mitochondrial respiratory chain. Superoxide and Superoxide Dismutase in Chemistry. Biology and Medicine (Rotilio G. Edit) Elsevier Science Publishers B.V. Rome Italy 1986, sayfa:125-127
62. Apps D.K, Cohen B.B, Steel C.M. Biochemistry. A Concise Text for Medical Students. Bailliér Tindall 1992, sayfa:5,204,211

- 63.Kagan V.E, Savov V.M, Serbinova E.A, Osipov A.N, Azizova O.A. Spin-trapping study on the formation of oxy-radicals during enzymic NADPH-dependent lipid peroxidation in rat liver microsomes. Superoxide and Superoxide Dismutase in Chemistry. Biology and Medicine (Rotilio G. Edit) Elsevier Science Publishers B.V. Rome Italy 1986, Sayfa:122-124
- 64.Boveris A, Cadenas E. Production of Superoxide Radicals and Hydrogen Peroxide in Mitochondria. Superoxide Dismutase. (Oberley L.W Edit) 1982, Vol:II Sayfa:15-30
- 65.Slater T.F. Free-Radical mechanisms in tissue injury. Review Article. Biochem J. 1984;222:1-15
- 66.Siedlik P.H, Marnett L.J. Oxidizing Radical Generation by Prostaglandin Synthase. Methods in Enzymology. (Colowick S.P. Kaplan N.O. Edit) Acad.Press, Florida 1984, Vol:105 Sayfa:412-416
- 67.Eastmond D.A, Smith M.T. Xenobiotic Activation by stimulated Human Polymorphonuclear Leukocytes and Myeloperoxidase. Methods in Enzymology. (Abelson J.N. Simon M.I Edit) Academic Press, San Diego, California 1990, Vol:186 Sayfa:579-584
- 68.Ziegler D.M, Kehrer J.P. Oxygen Radicals and Drugs: In vitro measurements. Methods in Enzymology (Abelson J.N, Simon M.I Edit) Academic Press. San Diego, California 1990, Vol:186 Sayfa:621-626
- 69.Bachur N.R, Gordon S.L, Gee M.V. A General Mechanism for Microzomal Activation of Quinon Anticancer Agents to Free Radicals. Cancer Res. 1978;38:1745-1750
- 70.Abdella B.R.J, Fisher J.A Chemical Perspective on the Anthracycline Antitumor Antibiotics. Environ. Health Perspect. 1985;64:3-13
- 71.Lown J.W, Sim S.K, Chen H.H. Hydroxyl radical production by free and DNA-bound aminoquinone antibiotics and its role in DNA degradation. Elektron spin resonance detection of hydroxyl radicals by spin trapping. Can.J.Biochem. 1978;56:1042-1047
- 72.Henderson C.A, Metz E.N, Balcerzak S.P, Sagone A.L. Adriamycin and Daunomycin Generate Reactive Oxygen Compounds in Erythrocytes Blood. 1978;52:878-885
- 73.Bhagavan N.V. Medical Biochemistry. Jones and Bartlett Publishers. 1992, Sayfa:268

74. Giri S.N, Chen Z.L, Younker W.R, Schiedt M.J. Effects of intratracheal administration of bleomisin on GSH-Shuttle enzymes, catalase, lipid peroxidation and collagen content in the lungs of hamsters. *Toxicol. & Applied Pharmacol.* 1983;71:132-141
75. Weitzman S.A, Graceffa P. Asbestos Catalyses Hydroxyl and Superoxide Radical Generation from Hydrogen Peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 1984;228:373-376
76. Sullivan P.D. Free Radicals of Benzo(a)pyrene and Derivatives *Environ. Health Perspect.* 1985;64:283-295
77. Lind C, Cadenas E, Hochstein P, Ernster L. DT-Diaphorase: Purification, Properties and Function. *Methods in Enzymology.* (Abelson J.N, Simon M.I. Edit) Academic Press. California 1990, Vol:186 Sayfa:287-301
78. Kennedy K.A, Rockwell S, Sartorelli A.C. Preferential Activation of Mitomycin C to Cytotoxic Metabolites by Hypoxic Tumor Cells. *Cancer Res.* 1980;40:2356-2360
79. Singh A, Singh H, Henderson J.S. Radioprotection by Ascorbic Acid, Desferal, and Mercaptoethylamine. *Methods in Enzymology.* (Abelson J.N, Simon M.I. Edit) Academic Press. California 1990, Vol:186 Sayfa:686-696
80. Asmus K.D. Pulse Radiolysis Methodology. *Methods in Enzymology.* (Colowick S.P, Kaplan N.O. Edit) Academic Press. Florida 1984, Vol:105, Sayfa:167-178
81. Riesz P, Berdahl D, Christman C.L. Free radical generation by ultrasound in aqueous and nonaqueous solutions. *Environ. Health Perspect.* 1985;64:233-252
82. Hartman P.E. Ergothioneine as Antioxidant. *Methods in Enzymology.* (Abelson J.N, Simon M.I. Edit) Acad. Press. California 1990, Vol:186, sayfa:310-318
83. Stocker R, McDonagh A.F, Glazer A.N, Ames B.N. Antioxidant activities of bile pigments: Biliverdin and Bilirubin. *Methods in Enzymology.* (Abelson J.N, Simon M.I. Edit) Acad. Press. California 1990, Vol:186, sayfa:301-309
84. Niki E, Nakano M. Estrogens as Antioxidants. *Methods in Enzymology.* (Abelson J.N, Simon M.I. Edit) Acad Press. California 1990, Vol:186, sayfa:330-333

85. Mak T, Weglicki W.B. Antioxidant Activity of Calcium Channel Blocking Drugs. *Methods in Enzymology*. Acad.Press. 1994, Vol:234, sayfa:620-630
86. Morand O.H. Reactivity of Plasmalogens to Singlet Oxygen and Radicals. *Methods in Enzymology*. Acad.Press. 1994, Vol:234, Sayfa:603-620
87. Wiseman H. Tamoxifen and Estrogens as Membrane Antioxidants: Comparison with Cholesterol. *Methods in Enzymology*. Acad.Press. 1994, Vol:234, Sayfa:590-602
88. Cantoni O, Sestili P, Cattabeni I, Bellamo G, Pou S, Cohen M, Cerutti P. Calcium Chelator Quin2 Prevents Hydrogen Peroxide Induced DNA Breakage and Cytotoxicity. *Euro J. Biochem.* 1989;182:209-212
89. Marx J.L. Oxygen Free Radicals Linked to Many Diseases. *Science*. 1987;235:529-531
90. Glabinski A. Increased Generation of Superoxide Radicals in blood of MS Patients. *Acta Neurol.Scand.* 1993;88:174-177
91. Faure P, Corticelli P, Richard M.J, Arnaud J, Coudray C, Halimi S, Favier A, Roussel A.M. Lipid Peroxidation and Trace Element Status in Diabetic Ketotic Patients: Influence of Insulin Therapy. *Clin. Chem.* 1993;39:789-793
92. Picardo M, Passi S, Morrone A, Grandinetti M, Carlo A.D, Ippolito F. Antioxidant status in blood of patients with active vitiligo. *Pigment Cell Res.* 1994;7:110-115
93. Ames B.N. Dietary Carcinogens and Anticarcinogens. *Science*. 1983;221:1256-1264
94. Kasama T, Kobayashi K, Sekine F, Negishi M, Ide H, Takahashi T, Niwa Y. Follow-up study of lipid peroxides, superoxide dismutase and glutathione peroxidase in the synovial membrane, serum and liver of young and old mice with collagen-induced arthritis. *Life Sciences*. 1988;43:1887-1896
95. Thayer W.S Evaluation of tissue indicators of oxidative stress in rats treated chronically with adriamycin. *Biochem. Pharmacol.* 1988;37:2189-2194
96. Gruener N, Gross B, Gozlan O, Barak M. Increase in Superoxide Dismutase after Cerebrovascular Accident. *Life Sciences*. 1994;54:711-713

97. Cheeseman K.H, Collins M, Proudfoot K, Slater T.F, Burton G.W, Webb A.C, Ingold K.U. Studies on lipid peroxidation in normal and tumour tissues. *Biochem J.* 1986;235:507-514
98. Yoshioka T, Motoyama H, Yamasaki F, Ando M, Takehara Y, Yamasaki M. Lipid peroxidation and Vitamin E Levels during pregnancy in rats. *Biol. Neonate.* 1987;52:223-231
99. Davies K.J.A, Delsignore M.A, Lin S.W. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of aminoacides. *J.Biol.Chem.* 1987;262:9902-9907
100. Wefers H. Singlet oxygen in biological systems. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics.* 1987;18:91-104
101. Davies K.J.A, Delsignore M.A. Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J.Biol.Chem.* 1987;262:9908-9913
102. Thornally P.J. Monosaccharide Autooxidation in Health and Disease. *Environ.Health Perspect.* 1985;64:297-307
103. Prohaska J.R, Oh S.H, Hoekstra W.G, Ganther H.E. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1977;74:64-71
104. Kraus R.J, Ganther H.E. Reaction of Cyanide with Glutathione Peroxidase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1980;96:1116-1122
105. Maiorino M, Gregolin C, Ursini F. Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase. *Methods in Enzymology.* (Abelson J.N, Simon M.I. Edit) Acad. Press. California Vol:186 Sayfa:448-457
106. Gaetani G.F, Galiano S, Canepa L, Ferraris A.M, Kirkman H.N. Catalase and Glutathione Peroxidase Are Equally Active in Detoxification of Hydrogen Peroxide in Human Erythrocytes.
107. Lehninger A.L, Nelson D.L, Cox M.M. *Principles of Biochemistry.* Second Edition. Worth Publishers. New York 1993, sayfa:712
108. Oberley L.W, Buettner G.R. Role of Superoxide Dismutase in Cancer: A Review. *Cancer Res.* 1979;39:1141-1149
109. McCord J.M, Fridovich I. Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for erythrocyuprein (hemocuprein) *J.Biol.Chem.* 1969;244:6049-6055
110. L'abbe M.R, Fischer P.W.F. An Automated Method for the Determination of Cu,Zn-Superoxide Dismutase in Plasma and Erythrocytes Using an ABA-200 Discrete Analyser. *Clin.Biochem.* 1986;19:175-178

111. Marklund S. Spectrophotometric Study of Spontaneous Disproportionation of Superoxide Anion Radical and Sensitive Direct Assay for Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.* 1976;251:7504-7507
112. Forman H.J, Fridowich I. On the stability of Bovine Superoxide Dismutase. The Effects of Metals. *J. Biol. Chem.* 1973;248:2645-2649
113. Parker M.W, Bossa F, Barra D, Bannister W.H, Bannister J.W. Structural and evolutionary relationships between the eukaryotic superoxide dismutases. *Superoxide and Superoxide Dismutase in Chemistry. Biology and Medicine; (Rotilio G. Edit) Elsevier Science Publishers B.V. 1986, sayfa:237-245*
114. Steinman H. Superoxide Dismutases: Protein Chemistry and Structure-Function Relationships. *Superoxide Dismutase. (Oberley L.W. Edit) CRC Press. 1982, Vol:I, Sayfa:11-68*
115. Forman H.J, Fridowich I. Superoxide Dismutase: A Comparison of rate constants. *Arch. Biochem. Biophys.* 1973;158:396-400
116. Gupta M.P, Khanduja K.L, Sharma R.R. Effect of cigarette smoke inhalation on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in the rat. *Toxicology Letters.* 1988;41:107-114
117. Marklund S.L. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem J.* 1984;222:649-655
118. Spitz D.R, Oberley L.W. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal. Biochem.* 1989;179:8-18
119. Misra H.P, Fridowich I. The purification and properties of superoxide dismutase from *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 1972;247:3410-3414
120. Marklund S.L, Holme E, Hellner L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin. Chim. Acta.* 1982;126:41-51
121. Glass G.A, Gershon D. Enzymatic changes in rat erythrocytes with increasing cell and donor age: Loss of superoxide dismutase activity associated with increases in catalytically defective forms. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1981;103:1245-1253

- 122.Groner Y, Hurwitz J.L, Dafni N, Bernstein Y, Sherman L, Levanon D, Danciger E, Stein O.E. The Human Cu,Zn Superoxide Dismutase Gene Family: Architecture and Expression of the Chromosom 21-Encoded Functional Gene and Its Related Processed Pseudogenes. Superoxide and Superoxide Dismutase in Chemistry. Biology and Medicine. (Rotilio G. Edit) Elsevier Science Publishers B.V. 1986, sayfa:257-265
- 123.Keele B.B, McCord J.M, Fridowich I. Superoxide dismutase from E.Coli. A new manganese-containing enzyme. J.Biol.Chem. 1970;245:6176-6181
- 124.Villafranca J.J, Yost F.J, Fridowich I. Magnetic resonance studies of Mn(III) and Iron(III) superoxide dismutases. Temperature and frequency dependence of proton relaxation rates of water. J.Biol.Chem. 1974;249:3532-3536
- 125.Kanematsu S, Asada K. Superoxide Dismutase from an Anaerobic Photosynthetic Bacterium, Chromatium Vinosum. Arch.Biochem.Biophys 1978;185:473-482
- 126.Tyler D.D. Polarographic Assay and Intracellular Distribution of Superoxide Dismutase in Rat Liver. Biochem J. 1975;147:493-504
- 127.Yost.F.J, Fridowich I. An Iron containing Superoxide Dismutase from Escherichia Coli. J.Biol.Chem. 1973;248:1905-1908
- 128.Steinman H.M. The Amino Acid Sequence of Mangano Superoxide Dismutase from Escherichia coli B. J.Biol.Chem. 1978;253:8708-8720
- 129.Dougherty H.W, Sadowski S.J, Baker E.E. A New Iron Containing Superoxide Dismutase from E.Coli. J.Biol.Chem. 1978;253:5220-5223
- 130.Wheeler C.R, Salzman J.A, Elsayed N.M, Omaye S.T, Korte D.W. Automated Assays for Superoxide Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase and Glutathione Reductase Activity. Analytical Biochem. 1990;184:193-199
- 131.Lück H. Catalase. in Methods of Enzymatic Analysis. (Bergmeyer H.U. 2nd Edit) Acad.Press. New York. 1963, syf:885-888
- 132.Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organisms. Phys.Rev. 1979;59:527-605
- 133.Jenkins R.R, Tengji J. Catalase activity in sceletal muscle of varying fiber types. Experientia 1981;37:67-68

134. Aviram I, Shaklai N. The association of human erythrocyte catalase with the cell membrane. Arch. Biochem. Biophys. 1981;212:329-337
135. Flohe L, Günzler W.A. Assays of Glutathione Peroxidase. Methods in Enzymology. (Colowick S.P, Kaplan N.O. Edit) Acad. Press. Florida 1984; Vol:105: sayfa: 114-121
136. Aebi H. Catalase in Vitro. Methods in Enzymology. (Colowick S.P, Kaplan N.O Edit) Acad. Press Florida 1984; Vol:105 syf:121-126
137. Van Lente F, Pepoy M. Coupled enzyme determination of catalase activity in erythrocytes. Clin. Chem. 1990;36:1339-1343
138. Flohe L, Ötting F. Superoxide Dismutase Assays. Methods in Enzymology. (Colowick S.P, Kaplan N.O Edit) Acad. Press. Florida 1984, Vol:105, sayfa:93-104
139. Paglia D.E. and Valentine W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J. Lab. Clin. Med. 1967;70:158-169
140. Podczasy J.J, Wei R. Reduction of Iodonitrotetrasolium Violet by Superoxide Radicals. Biochem. Biophys. Res. Comm. 1988;150:1294-1301
141. Fairbanks V.F, Klee G.G. Measurement of Hemoglobin Concentration in Whole Blood and Plasma. Fundamentals of Clinical Chemistry. 3rd Ed. (Tietz N.W. Edit) W.B. Saunders Company, Philadelphia 1987, sayfa:803-804
142. Fridowich I. The Biology of Oxygen Radicals. Science. 1978;201:875-880
143. Niki E. Vitamin C as an Antioxidant. Selected Vitamins, Minerals and Functional Consequences of Maternal Manutrition World Rev. Nutr. Diet. Basel, Karger. 1991, Vol:64, sayfa:1-30
144. Stewart J.R, Frist W.H, Merrill W.H. Oxygen Scavengers in Myocardial Preservation during Transplantation. Methods in Enzymology. (Abelson J.N, Simon M.I. Edit) Academic Press. California 1990, vol:186, sayfa:742-748
145. Grisham M.B, Benoit J.N, Granger D.N. Assesment of Leukocyte involvement during Ischemia and Reperfusion of the Intestine. Methods in Enzymology. (Abelson J.N, Simon M.I. Edit) Academic Press. California 1991, Vol:186, sayfa:729-742

- 146.Tho L.L, Candlish J.K, Thai A.C. Correlates of diabetes markers with erythrocytic enzymes decomposing reactive oxygen species. *Ann.Clin.Biochem.* 1988;25:426-431
- 147.Roberts N.A, Robinson P.A. Copper chelates of slow acting antirheumatic drugs and nonsteroidal antiinflammatory drugs: Their SOD-like activity and stability. *Superoxide and Superoxide Dismutase in Chemistry. Biology and Medicine;* (Rotilio G. Edit) Elsevier Science Publishers B.V. 1986, sayfa:538-540
- 148.Myers C.E, McGuire W.P, Riss R.H, Ifrim I, Grotzinger K, Young R.C. Adriamycin:The Role of Lipid Peroxidation in Cardiac Toxicity and Tumor Response. *Science.* 1977;197:165-167
- 149.Liu J.M, Auerbach A.D, Anderson S.M, Green S.W, Young N.S. A trial of recombinant human superoxide dismutase in patients with Fanconi anaemia. *British J. Haematol.* 1993;85:406-408
- 150.Takanaka K, O'Brien P.J. Generation of activated oxygen species by polymorphonuclear leukocytes. *Febs Lett.* 1980;110:283-286
- 151.Disilvestro R.A. Influence of Copper Intake and Inflammation on Rat Serum Superoxide Dismutase Activity Levels. *J. Nutr.* 1988;118:474-479
- 152.Yamanaka N, Ota K, Utsumi K. Changes in superoxide dismutase activities during development, aging and transformation. In:Biochemical and medical aspects of active oxygen. (Hayaishi O. and Asada K. Edit.) University Park Press. Baltimore, 1978 sayfa:183-190
- 153.Yamanaka N, Nishida K, Ota K. Increase of superoxide dismutase activity in various human leukemia cells. *Physiol.Chem.Phys.* 1979;11:253-256
- 154.Sykes J.A, McCormack Jr, O'Brien T.J. A Preliminary Study of the Superoxide Dismutase Content of Some Human Tumors. *Cancer Res.* 1978;38:2759-2762
- 155.Galeotti T, Barrello S, Seccia A, Farallo E, Bartoli G.M, Serri F. Superoxide dismutase content in human epidermis and squamous cell epithelioma. *Arch. Dermatol. Res.* 1980;267:83-85
- 156.Peskin A.V, Koen Y.M, Zbarsky I.B. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in tumors. *Febs.Lett.* 1977;78:41-45

157. Bartoli G.M, Galeotti T, Azzi A. Production of superoxide anions and hydrogen peroxide in Erlich Ascites Tumour cell nuclei. *Biochim.Biophys.Acta.* 1977;497:622-626
158. Peskin A.V, Zbarsky I.B, Konstantinov A.A. A novel type of superoxide generating system in nuclear membranes from hepatoma 22a ascites cells. *Febs.Lett.* 1980;117:44-46
159. Patton S.E, Rosen G.M, Rauckman E.J. Superoxide production by purified hamster hepatic nuclei. *Mol.Pharm.* 1980;18:588-591
160. Ono T. Enzyme patterns and malignancy of experimental hepatomas. In *Biological and Biochemical Evaluation in Experimental Hepatomas* . (Yoshida T. Edit) Japanese Cancer Association, Tokyo, 1966, 189
161. Bozzi A, Mavelli I, Finazzi A, Strom R, Wolf A.M, Modovi B, Rotilio T. Enzyme defense against reactive oxygen derivatives. II. Erythrocytes and tumor cells. *Mol.Cell.Biochem.* 1976;10:11-14
162. Pavri R.S, Gupta A.D, Baxi A.J, Advani S.H. Further evidence for oxydative damage to hemoglobin and red cell membrane in leukemia. *Leuk.Res.* 1983;7:729-733
163. Saito T, Kurasaki M, Kaji H, Saito K. Deficiency of erythrocyte superoxide dismutase and catalase activities in patients with malignant lymphoma and acute myeloid leukemia. *Cancer Lett.* 1984;24:141-146
164. Madej J.A, Kaszubkiewicz C, Radzanowska G. Superoxide Dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in mice with natural lymphocytic leukemia. *Pol.Arch.Weter* 1988;28:25-34
165. Kuvshinnikov V.A, Morozkina T.S, Svirnovskii A.I, Poliakova Z.I, Strelnikov A.V, Oletskii E.I, Shkrebneva I, Sukolinskii V.N. Use of the antioxidant complex of vitamins A, E, and C in murine leukemia. *Gematol.Transfuziol.* 1989;34:23-28
166. Kökoğlu E, Aktuğlu G, Belce A. Leucocyte superoxide dismutase levels in acute and chronic leukemias. *Leuk.Res.* 1989;13:457-458
167. Saito H, Kuroki T, Nose K. Decrease in CuZn-Superoxide dismutase mRNA level during differentiation of human monocytic and promyelotic leukemia cells. *Febs.Lett.* 1989;249:253-256

168. Auwerx J.H, Chait A, Wolfbauer G, Deeb S.S. Loss of copper-zinc superoxide dismutase gene expression in differentiated cells of myelo-monocytic origin. Blood. 1989;74:1807-1810
169. Brown A.C, Lutton J.D. The significance of free radical scavengers in L1210 leukemia. Adv.Exp.Med.Biol. 1988;241:135-148
170. Paoletti F, Mocali A. Changes in CuZn-superoxide dismutase during induced differentiation of murine erythroleukemia cells. Cancer Res. 1988;48:6674-6677