

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA VE KLİNİK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**KURŞUN ASETAT İLE OKSİDATİF STRES OLUŞTURULMUŞ
SIÇANLARIN ÇEŞİTLİ DOKULARI ÜZERİNE BAZI KÜKÜRTLÜ
BİLEŞİKLERİN ANTIOKSİDATİF ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Emrah ÇAYLAK

ELAZIĞ

2006

ENSTİTÜ ONAYI

Prof. Dr. Necip İLHAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Necip İLHAN

Fırat üniversitesi Tıp Fakültesi

Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. İhsan HALİFEOĞLU

Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Necip İLHAN

Prof. Dr. M. Ferit GÜRSU

Prof. Dr. Ramazan ŞEKEROĞLU

Doç. Dr. İhsan HALİFEOĞLU

Doç. Dr. Bayram YILMAZ

İTHAF

Her Őeyden çok sevdiğim, en değerli varlığım, hayat arkadaşım; Nejla ÇAYLAK'a...

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında ve doktora eğitimim boyunca benden gerekli her türlü desteği ve yardımı esirgemeyen kıymetli hocam Doç. Dr. İhsan HALİFEOĞLU'na yürekten teşekkür ederim. Çalışmalarım süresince yardım ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Prof. Dr. Necip İLHAN'a ve Anabilim Dalımızın değerli üyeleri Prof. Dr. Ferit GÜRSU'ya, Doç. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ'a, Doç. Dr. Nevin İLHAN'a, Doç. Dr. Nermin KILIÇ'a ve asistan arkadaşlarım ile Anabilim Dalımızın bütün personeline teşekkür ederim. Dokularda total antioksidan kapasitelerinin ölçümünde yardımını esirgemeyen Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Üyesi Prof. Dr. Özcan EREL'e ve Anabilim Dalındaki asistan arkadaşlara ve personeline de teşekkürlerimi sunarım. Fırat Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Biriminde (FÜTDAM) dokuları çıkarmama yardım eden Özgür BULMUŞ'a teşekkür ederim. Ayrıca eğitimim boyunca emeği geçen Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında görevli değerli hocam Doç. Dr. Halit CANATAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışmada maddi desteklerini esirgemeyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne de (FÜBAP) teşekkür ederim (FÜBAP-Proje No: 801).

İÇİNDEKİLER

Sayfa Numarası

1. Özet.....	1
2. Abstract.....	2
3. Giriş.....	3
3.1. Kurşun.....	3
3.1.1. İnsanlara Geçiş Kaynakları.....	3
3.1.2. Kurşunun Metabolizması.....	5
3.1.3. İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri.....	6
3.1.4. Kurşun Zehirlenmesinde Tedavi.....	8
3.2. Kurşun ve Oksidatif Stres.....	9
3.2.1. Kurşunun Oksidatif Hasarının Mekanizmaları.....	9
3.2.2. Kurşunun Hücre Membranlarına Etkisi.....	9
3.2.3. Kurşun-Hemoglobin (Hb) İlişkileri.....	11
3.3. Serbest Radikaller.....	16
3.3.1. Reaktif Oksijen Türevleri (ROS).....	17
3.3.2. Oksijen Türevi Olmayan Serbest Radikaller.....	21
3.3.3. Serbest Radikallerin Biyolojik Rollerini.....	23
3.3.4. ROS ve Diğer Serbest Radikallere Karşı Antioksidan Savunma Sistemleri.....	25
3.4. Sülfür İçeren Bileşikler ve Antioksidan Etkileri.....	34
3.4.1. Sülfür Kaynakları.....	36
3.5. Kurşunun Hücresel Antioksidan Enzim Sistemlerine Etkileri.....	43
3.6. Kurşun Zehirlenmesinin Tedavisinde Antioksidanların Kullanımı.....	46
3.7. Kurşunla Oluşturulmuş Oksidatif Strese Karşı Antioksidanların Koruyucu ve Tedavi Edici Etkisi.....	53
4. Gereç ve Yöntem.....	54
4.1. Hemoglobin Ölçümü.....	54
4.2. Serum Lipit Peroksit Düzeylerinin Ölçümü.....	55
4.3. Enzimatik Antioksidanların Ölçümü.....	56
4.3.1. SOD Enzim Aktivitesi Ölçümü.....	56
4.3.2. GSH-Px Enzim Aktivitesi Ölçümü.....	60
4.4. Vitamin A ve E Tayini.....	62
4.5. Total Antioksidan Kapasitelerinin Ölçümü.....	62
4.6. Dokularda Protein Tayini.....	64

4.7. İstatistik Analizleri.....	65
5. Bulgular.....	66
5.1. Gruplardaki Hb Düzeyleri.....	66
5.2. Gruplardaki Serum MDA Düzeyleri.....	67
5.3. Gruplardaki Eritrosit SOD Düzeyleri.....	68
5.4. Gruplardaki Eritrosit GSH-Px Düzeyleri.....	69
5.5. Gruplardaki Plazma Vitamin A Düzeyleri.....	70
5.6. Gruplardaki Plazma Vitamin E Düzeyleri.....	71
5.7. Grupların Karaciğer Total Antioksidan Kapasiteleri.....	72
5.8. Grupların Böbrek Total Antioksidan Kapasiteleri.....	73
5.9. Grupların Beyin Total Antioksidan Kapasiteleri.....	74
6. Tartışma.....	75
7. Kaynaklar.....	93
8. Özgeçmiş.....	103

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa Numarası

Şekil 1. Hem sentezinin basamakları.....	13
Şekil 2. Vücuttaki serbest radikallerin etkileri ve kaynakları.....	16
Şekil 3. Lipit peroksidasyonu ve hücrelerdeki akıbeti.....	21
Şekil 4. Lipit peroksidasyonu.....	24
Şekil 5. Sülfür döngüsü.....	35
Şekil 6. Sülfür içeren amino asitlerin döngüsü.....	39
Şekil 7. Metiyoninin yapısı.....	40
Şekil 8. N-asetilsisteinin yapısı.....	49
Şekil 9. Alfa-lipoik asidin yapısı.....	51
Şekil 10. SOD için standartlara ait % inhibisyon-konsantrasyon eğrisi.....	59
Şekil 11. SOD için standartlara ait % inhibisyon-log [konsantrasyon] eğrisi.....	59
Şekil 12. Grupların Hb düzeyleri.....	66
Şekil 13. Grupların serum MDA düzeyleri.....	67
Şekil 14. Grupların eritrosit SOD düzeyleri.....	68
Şekil 15. Grupların eritrosit GSH-Px düzeyleri.....	69
Şekil 16. Grupların plazma vitamin A düzeyleri.....	70
Şekil 17. Grupların plazma vitamin E düzeyleri.....	71
Şekil 18. Grupların karaciğer dokularındaki total antioksidan kapasiteleri.....	72
Şekil 19. Gruplardaki böbrek dokularına ait total antioksidan kapasiteleri.....	73
Şekil 20. Grupların beyin dokularındaki total antioksidan kapasiteleri.....	74

TABLO LİSTESİ

	Sayfa Numarası
Tablo 1. Yaş düzeylerine göre SİA ihtiyaçları.....	37
Tablo 2. Grupların Hb düzeyleri.....	66
Tablo 3. Grupların serum MDA düzeyleri.....	67
Tablo 4. Grupların eritrosit SOD düzeyleri.....	68
Tablo 5. Grupların eritrosit GSH-Px düzeyleri.....	69
Tablo 6. Grupların plazma vitamin A düzeyleri.....	70
Tablo 7. Grupların plazma vitamin E düzeyleri.....	71
Tablo 8. Grupların karaciğer dokularındaki total antioksidan kapasiteleri.....	72
Tablo 9. Grupların böbrek dokularındaki total antioksidan kapasiteleri.....	73
Tablo 10. Grupların beyin dokularındaki total antioksidan kapasiteleri.....	74

KISALTMALAR

ABTS ⁺	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)
Ag ⁺²	Gümüş
ALA	δ-Amino Levülinik Asit
ALAD	ALA-dehidraz
BAL	British Anti Lewisite-Dimerkaprol
CaNa ₂ EDTA	Kalsiyum Disodyum EDTA
Co ⁺²	Kobalt
Cu ⁺²	Bakır
DADS	Diallildisülfit
DAS	Diallilsülfit
DATS	Dialliltrisülfit
DFO	Desferroksamin
DHLA	Dihidrolipoik asit
DMSA	Dimerkaptosüksinik Asit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FDA	Food and Drug Administration-Gıda ve İlaç Örgütü
Fe ⁺²	Demir(II)
Fe ⁺³	Demir(III)
FTA	Fosfotungustik Asit
GSH-Px	Glutatyon Peroksidaz
GR	Glutatyon Redüktaz
GSH	Redükte Glutatyon
GSSG	Okside Glutatyon
GST	Glutatyon-S-Transferaz
G6PD	Glukoz-6-Fosfat Dehidrojenaz
Hb	Hemoglobin
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
Hg ⁺²	Civa
HO [•]	Hidroksil Radikali
HO ₂ [•]	Perhidroksil Radikali
HOCl	Hipokloröz Asit

HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LA	Lipoik Asit
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
MA	Molekül Ağırlığı
MDA	Malondialdehit
Mn ⁺²	Manganez
MPG	α -merkaptopropiyonilglisin
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
NAC	N-asetilsistein
NO	Nitrik Oksit
NYF	Net Yararlanma Faktörü
O ₂ ⁻	Süperoksit Radikali
O ₂ ^{↑↓}	Singlet O ₂
Pb ⁺²	Kurşun
R [·]	Alkil Radikali
RCOO [·]	Organik Peroksit Radikali
RO [·]	Alkoksil Radikali
ROO [·]	Peroksil Radikali
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SAM	S-adenozilmetiyonin
-SH	Sülhidril Grubu
SİA	Sülfür İçeren Aminoasitler
SOD	Süperoksit Dismutaz
V ⁺²	Vanadyum
Vit-A	Vitamin A
Vit C [·]	C Vitamini Radikali
Vit-E	Vitamin E
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
TAK	Total Antioksidan Kapasitesi
TBA	Tiyobarbitirik Asit
TBARS	Tiyobarbitirik Asit Reaktif Substanslar
ZnPP	Çinko Protoporfirin

1. ÖZET

Kurşun, endüstride yaygın olarak kullanılmasından dolayı büyük bir çevresel problem oluşturmaktadır. İnsan ve hayvanlar üzerine etkileriyle ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Deneysel çalışmalarda sülfür içeren antioksidanların kurşunun zararlı etkilerine karşı yararlı olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızda kurşun asetat ile oksidatif stres oluşturulan ratlarda sülfür içeren bazı bileşiklerin antioksidan etkilerinin araştırılması amaçlandı. Wistar-Albino cinsi erkek ratlara beş hafta boyunca, kontrol (n=10) dışında; 2000 ppm kurşun asetat tek başına (n=10) ya da günlük oral 100 mg/kg L-metiyonin (n=10), 800 mg/kg N-asetilsistein (n=10), 50 mg/kg L-homosistein (n=10) ve i.p. 25 mg/kg α -lipoik asit (LA) (n=8) ile birlikte verildi. Hemogloblin (Hb) düzeyi Drabkin ayırıcı kullanılarak siyanomethemoglobin yöntemi ile tam kanda, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktiviteleri ticari kitle hemolizatta, malondialdehit (MDA) düzeyi Satoh-Yagi yöntemi ile serumda; vitamin A (Vit-A), vitamin E (Vit-E) seviyeleri HPLC'de UV dedektör ile plazmada ve total antioksidan kapasitesi (TAK) düzeyleri ABTS⁺ metoduyla doku homojenatında ölçüldü.

Kontrol grubuna göre kurşun grubunda Hb ve plazma Vit-E seviyeleri anlamlı düşük; MDA düzeyi ise anlamlı yüksek bulundu ($p<0.01$). Kurşun grubuna göre kurşun-metiyonin, kurşun-LA gruplarında Hb anlamlı yüksek ($p<0.05$), tüm sülfürlü antioksidan verilen gruplarda MDA düzeyleri anlamlı düşük ($p<0.01$); kurşun-LA grubunda eritrosit SOD ($p<0.01$) ve GSH-Px ($p<0.05$) düzeyleri anlamlı düşük sonuç verdi. Plazma vitamin A düzeyleri; kurşun-metiyonin grubunda anlamlı yüksek ($p<0.01$) bulundu. Karaciğer TAK düzeyleri tüm sülfürlü antioksidan verilen gruplarda anlamlı olmayan düşük iken beyinde yüksek bulundu. Böbrek TAK düzeyleri kurşun-metiyonin ve kurşun-LA gruplarında anlamlı yüksek ($p<0.01$) bulundu.

Sonuç olarak; bu bulgular ışığında, kurşunun uyardığı oksidatif stresin sülfür içeren bileşikler tarafından azaltıldığı kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: Kurşun, oksidatif stres, sülfür-içeren bileşikler.

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT EFFECTS OF SOME SULFUR-CONTAINING COMPOUNDS ON VARIOUS TISSUES: OXIDATIVE STRESS INDUCED BY LEAD ACETATE IN RATS

Lead causes a great environmental problem because it is being widely used in the industry. Several studies focusing its effects on human and animals have been carried out. Sulfur containing antioxidants have been observed to have beneficial effects against lead's detrimental properties in experimental studies.

Evaluation of antioxidant effects of some sulfur-containing compounds in rats where oxidative stress was induced by lead acetate was the aim of our study. In addition to control group (n=10), Wistar-Albino male rats were given 2000 ppm lead acetate alone (n=10), or with daily oral 100 mg/kg L-methionine (n=10), or with 800 mg/kg N-acetylcysteine (n=10), or with 50 mg/kg L-homocysteine (n=10), or with i.p. 25 mg/kg α -lipoic acid (LA) (n=8) during five weeks. Hemoglobin (Hb) levels were analyzed by the cyanomethemoglobin method using Drabkin reagent in whole blood whereas superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) enzyme activities were assayed with commercially available kits in hemolysate. Malondialdehyde (MDA) levels were determined with method of Satoh-Yagi in sera whereas vitamin A (Vit-A) and vitamin E (Vit-E) levels were determined with HPLC UV detector in plasma. Total antioxidant capacity (TAC) levels in tissue homogenates were assayed with ABTS⁺ method.

In lead group Hb and plasma Vit-E levels were determined to be significantly low whereas MDA levels were significantly high compared to controls ($p<0.01$). Hb levels in lead-methionine, lead-LA groups were significantly low compared to lead group ($p<0.05$). MDA levels were reduced in all groups compared to lead group ($p<0.01$) whereas there was an increase over control values in erythrocyte SOD ($p<0.01$), and GSH-Px ($p<0.05$) levels in lead-LA group. Plasma Vit-A levels were significantly high in lead-methionine group compared to lead group ($p<0.01$). In all lead-antioxidants groups liver TAC levels were determined to be slightly lower compared to lead group while brain's levels were higher. Kidney TAC levels in lead-methionine, and lead-LA groups were significantly high ($p<0.01$).

In conclusion, in the light of these findings it is believed that oxidative stress induced by lead is reduced by sulfur-containing compounds.

Key words: Lead, oxidative stress, sulfur-containing compounds.

3. GİRİŞ

3.1. KURŞUN

Kurşun doğada bol olarak bulunan bir metaldir. Erime noktası 327.5, kaynama noktası ise 1740 ° C'dir. Yumuşak olması nedeniyle işleme kolaylığı vardır ve insanlar kurşunu çok eski yıllardan beri çeşitli amaçlarla (mutfak araç-gereçleri, su boruları yapımı vb.) kullanmışlardır. En önemli kurşun kontaminasyon kaynakları; benzine eklenmiş kurşun, kurşun bazlı boyalar, kurşun lehimli konserve kutuları, seramik sırlar ve endüstriyel kirlenmedir. Bu yüzden kurşun zehirlenmesi çok eski yıllardan beri bilinmektedir. Hipokrat kurşun zehirlenmesine ait klinik tabloları tanımlamıştır. Günümüzde metalik kurşunun başlıca kullanım yeri akümülatör yapımıdır. Üretilen kurşunun yarısından çoğu bu amaçla kullanılmaktadır. Diğer kullanım alanları arasında matbaacılık ile boya, kristal cam ve plastik endüstrisi sayılabilir. Kurşunun organik bileşikler olan tetra etil ve tetra metil kurşun, benzine oktan yükseltici olarak katılmaktadır. Bu kullanımın giderek azaldığı bilinmektedir (67, 141). Türkiye'de 1988 yılından önce benzine 0.84 g/L, 1988'de 0.40 g/L ve 2002'de 0.1 g/L kurşun eklendiği bilinmektedir. Fakat günümüzde düşük kurşun içerikli (0.005 g/L) benzin kullanımı ülkemizde giderek yaygınlaşmaktadır (135). Ayrıca hava kirliliğinin bir sonucu olarak kurşun biyosferde önemli ölçüde dağılmıştır ve özellikle Kuzey Yarımküre'de günlük havaya salınan miktar 1000 tona kadar ulaşmaktadır (67, 141).

3.1.1. İnsanlara Geçiş Kaynakları

Doğada en çok kurşun, sülfür bileşiği (galena) halinde bulunur. Madenlerden yeryüzüne çıkartılıp kullanılması ile biyosfere yayılmış ve endüstrileşmeye paralel olarak insan vücudundaki miktarı anlamlı derecede artmıştır. Günlük oral kurşun alımı Amerika'da ortalama 100 µg'ın, Avrupa ülkelerinde ise 30 µg'ın altındadır. Çalışma ortamındaki işçiler kurşunu solunum yolu ile almaktadır. Kurşunun önemli bir bölümü eski hurda akümülatörlerin veya kurşundan yapılmış malzemelerin ya da madenlerden çıkarılan cevherin eritilerek saflaştırılması ile elde edilir. Kurşun zehirlenmesi bakımından en riskli işler de kurşunun eritildiği safhalardır. Çünkü kurşun 500-600 ° C'nin üzerindeki sıcaklıklarda buharlaşmaktadır. Tütsü (füme) adı verilen bu buhar içinde erimiş kurşunun mikron düzeyinde partikülleri vardır. Bu partiküller solunum yolu ile vücuda girerler. Daha az miktarda kurşun ise sindirim kanalından alınır. Ancak solunum yollarından alınan kurşunun % 40'ı absorbe olup

kan dolaşımına katılırken, sindirim kanalından alınan kurşunun ancak % 10-15'i absorbe edilmektedir. Bu nedenle zehirlenme bakımından solunum yolu ile olan maruziyet daha önem taşımaktadır. Organik kurşun bileşikleri deri yolu ile de absorbe edilebilir. Ortamdaki kurşun konsantrasyonu, endüstri tipine ve tesislerde uygulanan endüstriyel hijyene bağlıdır. Maden ve hurda endüstrisi ile kablo yapımı, kurşun dökümü, kurşun bazlı boyaların üretimi, mermi yapımı, akümülatör yapımı, matbaacılık, otomobil tamiri gibi işlerde çalışanlar veya kurşun cam üfleyicileri, kaynakçılar, su tesisatçıları da kurşuna maruz kalma tehdidi altındadır (141).

3.1.1.1. Solunum yoluyla maruz kalma:

Çevresel dağılımının en önemli yolu havaya yayılan kurşundur. Havadaki kaynaklar arasında; yakım fırınları ile maden tasfiyehanelerinden çıkan baca gazları ve kurşun ilave edilmiş petrolün yanma ürünleri, bazı endüstriyel maddeleri içeren yanmış fosil yakıtları yer alır. Havadaki en önemli kaynak benzine eklenerek kullanılan inorganik tetraetil ve tetrametil kurşunun yakılmasından kaynaklanır. Kurşunun solunum sisteminden emilimi partiküllerinin büyüklüğüne göre değişir. Büyük partiküllü bileşikler üst solunum yollarında kalır ve buradan sindirim sistemine geçer. Küçük partiküllü olanlar genellikle otomobil egzoz dumanı kaynaklıdır; alt solunum yollarına ulaşır ve emilim düzeyi % 90'lara kadar çıkabilmektedir. Çocukların yetişkinlere göre kurşuna solunum yolu ile 1.6 ila 2.7 kat daha duyarlı oldukları bildirilmiştir (141, 148). Ülkemizde trafikten uzak alanlarda yaşayan çocuklarda diş kurşun seviyelerinin $1.69 \pm 0.25 \mu\text{g/g}$ düzeylerinde olmasına rağmen; özellikle trafiğin yoğun olduğu semtlerdeki çocuklarda $4.99 \pm 0.46 \mu\text{g/g}$ çıkması kurşunu egzoz gazlarından aldıklarını göstermiştir (64).

Atmosferde bulunan kurşun düzeyi evlerin kapalı ortam havasını % 60 oranında etkiler. Bireyler, evdeki yüzeylerin boyanmasında kullanılan kurşun bazlı boyalardan ya da varsa içilen sigara dumanından dolayı da kurşuna maruz kalabilir (141, 148).

3.1.1.2. Ağız yoluyla maruz kalma:

Yiyecek ve içecekler, erişkinlerde mesleki olmayan kurşun maruziyeti için ana kaynaktır. Sanayi bölgelerine yakın alanlardaki toprakta bulunan kurşun, gıda ürünlerine bitkiler yoluyla geçer. Bitkilerin kökleri, gövde ve yapraklarına göre daha fazla; tohum ve meyveleri ise daha az kurşun içerir. Havada bulunan kurşun da yapraklı sebzeleri etkiler. Böylece şehir merkezi veya yola yakın bölgelerde bulunan sebzelerdeki kurşun konsantrasyonu daha da artmaktadır (59). Alkollü içecekler,

saklanılmalarında kullanılan fiçı ve varillerde bulunan kurşun lehimler, tıkaçlar ya da üzümçülükte toprağa atılan kurşun arsenat içeren böcek öldürücüleri ile kontamine olurlar. Alkollü içecekler asidiktir ve içeriklerindeki kontamine kurşun; hazırlama, depolama ve servis sırasında çözünebilmektedir. Ayrıca yiyecek depolama amaçlı kullanılan kurşun lehimli konserve kutuları ile seramik tabaklar ve kristal züccaciye malzemelerinden de kurşun canlılara taşınmaktadır (141, 148). 2000 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ile Gıda ve İlaç Örgütü (FDA) tarafından yapılan çalışmalar sonucunda gıdalarla bireylerin alabileceği en fazla günlük kurşun miktarı 25 µg/kg olarak belirlenmiştir (142).

Su ile alınabilecek kurşun açısından yüzey ve yeraltı suları önemsiz derecede tehdit oluşturur. İçme sularının kurşunla kontaminasyonu su depoları, taşıma tankerleri ve şehir şebeke borularından kaynaklanır. 1993'te WHO, içme suyunun içerebileceği maksimum kurşun konsantrasyonunu 50 µg/L'den 10 µg/L'ye düşürmüştür (141).

3.1.1.3. Çeşitli yollarla maruz kalma:

İnsanlar kurşun içeren ilaçlarla da kurşuna maruz kalabilmektedir. Örneğin; deri hastalıklarında kullanılan Azarcon, kurşun kromat ve Greta, kurşun oksit halinde % 70'den fazla kurşun içermektedir (141, 148).

Bölgesel olarak kullanılan çeşitli kozmetik ürünleri de kurşun içerebilmektedir. Pakistan ve diğer bazı Müslüman ülkelerde bir göz preparatı olarak kullanılan Summa/Kohl, konjonktivaya sürülmekte ya da umbilikal kord kesildiğinde vazokonstriktör etkisinden yararlanılmaktadır. Avrupa'da ise kurşun içeren kozmetik maddeler ve cilt kremleri aktörler tarafından kullanılmaktadır (141, 148).

3.1.2. Kurşunun Metabolizması:

Kurşunun gastrointestinal sistemden emilimi diyetin içeriğinden, bireyin açlık-tokluk durumundan ve metalin formundan etkilenir. Yetişkinlerde % 10'dan daha az oranda absorbe edilirken; gastrointestinal sistemin daha fazla geçirgen olduğu yenidoğanlarda ve çocuklarda % 30-50 düzeylerinde emilebilmektedir. Bu oran oruç veya uzun süren açlıkta ve diyetle vitamin D bulunması halinde daha yüksek; tokluk veya diyetle kalsiyum, fosfat ve fitat varlığında ise daha düşüktür (141).

Vücuda giren kurşunun % 85-90'lık kısmı kanda eritrositlerin zarına bağlanarak, % 1'i serbest ve geri kalanı ise albumine bağlı olarak taşınır. Kurşun vücutta depolanan bir metaldir, öncelikle yumuşak dokularda ve parankimal

organlarda dağılım gösterir ve daha sonra kemiklerde kalsiyumun yerini alarak depolanır. Erişkinlerde kurşunun % 95'i iskelette depolanır. Kurşun kan-beyin bariyerini yavaş geçer. Plasentanın geçirgen olması sebebiyle fetüs annenin aldığı kurşuna direk olarak maruz kalır (67, 141, 148).

Vücuttan atılımı başlıca idrar yolu ile olur. Az miktarda kurşun dışkı ve ter içinde, epitel deskuamasyonu veya saç, tırnak kesilmesi yolu ile kadınlarda menstruasyonla ve emzirme sırasında sütle vücuttan atılabilir (67, 141, 148).

3.1.3. İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri:

Kurşun insanlarda birçok enzimi inhibe etmekte ve fizyolojik sistemleri de etkilemektedir. Klinik olarak, çocukluklarda sinirsel gelişimi etkilemekte; yetişkinlerde ise kalp-damar sisteminde hipertansiyon rahatsızlıklarına neden olmaktadır. Akut olarak gastrointestinal toksisite belirtileri, kronik olarak ise kan hücreleri ve sinir sisteminde hasarlar ortaya çıkarmaktadır. Çocuklarda akut formda ensefalopati ile yüksek konsantrasyonlarda nefropati, nöropati, kafa içi basınç artışı, konvülsiyon ve ölüme yol açabilmektedir. Akut kurşun maruziyetinde geri dönüşümlü olarak karaciğer fonksiyonlarında bozukluk (AST ve ALT'de artış), kronik maruziyette ise böbreklerde hiperürisemi ve kreatinin klerensinde azalma görülebilir (67, 141, 148).

Kurşun zehirlenmesinin karakteristik semptomlarından biri de anemidir. Kurşun tarafından alyuvarların ömrü kısaltılmakta ve "Hem" sentezinin çeşitli adımları inhibe edilerek, hemoglobinin sentezi engellenmekte ve mikrositer anemi ortaya çıkmaktadır (67, 141, 148).

Kurşun zehirlenmesinin tanısı zordur; çünkü belirtileri özel değildir. Erişkin hastada kolik ağrısı, anoreksi, konstipasyon, uykusuzluk ve iritabilite; bazen düşük Hb seviyeleri ve serum bilirubininde artışın ortaya çıkması ile kurşun zehirlenmesi tanısı konulabilir (67, 141, 148). Tanıda kurşun maruziyeti olan bir işte çalışma öyküsünün yanı sıra, klinik belirti ve bulguların da önemi olmakla birlikte; kesin tanı atomik absorpsiyon yöntemi kullanılarak kan kurşun düzeylerinin tayini ile yapılır. Çocuklarda ve hamile kadınlarda 10 µg/dl, yetişkinlerde 40 µg/dl'nin üstü kan kurşun düzeyleri anlamlı kabul edilmektedir. Kurşun zehirlenmesinin tanısında kan çinko protoporfirin (ZnPP) seviyesinin ölçülmesinden de faydalanılmaktadır. Erişkin erkeklerde kan kurşun konsantrasyonu 25 µg/dl üzerinde olduğunda, ZnPP konsantrasyonu da anlamlı olarak artmaktadır (141, 148). Normal kan ZnPP düzeyleri sağlıklı bireylerde 10-32 (ortalama 22.4) µg/dl iken; otoyol gişelerinde

çalışanlarda 20-88 (ortalama 35.4) µg/dl olarak bulunmuştur. Kadınlarda demir düzeyinin daha az olması nedeniyle daha düşük kan kurşun düzeylerinde ZnPP'de artış gözlenir. Çocuklarda kan kurşun düzeyi 15 µg/dl olduğunda ZnPP'de artış olur. Aynı zamanda demir eksikliği, hastaların kurşunun toksik etkilerine daha duyarlı olmalarına da sebep olur (148). Benzer şekilde idrarda da kurşun tayini yapılabilir; ancak kan kurşun düzeyi tayini daha güvenilir bir yöntemdir. Hem sentezinin bozulması sonucunda porfirin bileşiklerinin idrar düzeylerinde de artma olur (141).

Kurşun, merkezi ve periferik sinir sistemini etkiler. Nöroelektrofizyolojik testlerde kurşunun etkisiyle periferik sinirlerin ileti hızında azalma gözlenir (148). Subklinik olarak vücutta biriken kurşunun; birçok gizli nörolojik hasarlara, ileriki yaşlarda IQ azlığına, zayıf akademik başarıya, davranış bozukluklarına, işitme azlığına ve zekâ kaybına neden olduğu gösterilmiştir (141, 148).

Kurşunun kadın ve erkek üreme sisteminde toksik etkilerinin olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Kurşunla ilgili işlerde çalışan kadınlarda spontan abortus, ölü doğum ve düşük ağırlıkta çocuk doğurma frekansında artış olduğu bildirilmiştir. Erkeklerde ise mesleki kurşun maruziyetine bağlı sperm ve testisler üzerine toksik etki, kan kurşun düzeyinin 40 µg/dl'nin üzerine çıkması halinde görülmekte; hiperspermi, teratospermi, astenospermi ve hipogonadizm oluşabilmektedir (141, 148).

Su ve gıdaları ile kurşun verilen rat ve farelerde kanser oluşumu gösterilmiştir. Diyetlerinde yüksek dozda kurşun asetat bulunan ratlarda renal kanser oranında artış saptanmıştır. İnsanlarda ise sigara içimi ile kurşun alınması sonucunda akciğer kanseri ve kurşun maruziyetine bağlı olarak gelişen renal kanserler bildirilmiştir (141, 148).

Ülkemizdeki kurşun zehirlenmesinin prevalansı ile ilgili çok az çalışma vardır. Can ve ark.'nın (17) 1993'te Tekirdağ Merkez ilçesinde yaptıkları çalışmada kan kurşun düzeyleri ortalama olarak 29,6 µg/dl, Yapıcı'nın (147) 1999 yılında Silivri'de yaptığı çalışmada 23,4 µg/dl olarak bulunmuştur. Sevinç ve ark.'nın (118) Şanlıurfa ilinde oto tamir atölyelerinde çalışan çıraklarda yaptıkları çalışmada kan kurşun düzeyleri 27,8 µg/dl, saç kurşun düzeyleri ise 0.38 µg/g olarak ölçülmüştür. Erişkinlerde ise Kocabıyık ve Doğan'ın (71) İzmir trafik polislerinde yaptıkları çalışmada ortalama kan kurşun düzeyi 25 µg/dl olarak bulunmuştur. Yapıcı ve ark.'nın (149) Muğla Yatağan yöresindeki çocuklarda yaptıkları taramada ise kan kurşun düzeyleri $36,27 \pm 16,16$ µg/dl olarak tespit edilmiştir. Yılmaz ve ark.'nın

(151) Elazığ Keban yöresinde yapmış oldukları ölçümlerde ise kan kurşun düzeyleri $3-10 \pm 0.25 \mu\text{g/dl}$ olarak saptanmıştır.

İşyeri ortamlarında alınacak teknik korunma önlemleri çok önemlidir. Kurşun tütsüsünün olduğu yerlerde havalandırma sistemleri kurulmalı, iş esnasında sigara içilmemeli, tozumanın önüne geçmek için yerler ıslatılmalıdır. Gerekliyorsa maske kullanımı düşünülebilir. Çalışanlar iş başında yemek yememeli ve yemeklerden önce mutlaka ellerini yıkamalıdır. Böylece solunum ve sindirim yolu ile vücuda kurşun girişi önlenir. Tıbbi korunma önlemleri olarak; işe giriş öncesinde ve çalışma süresince aralıklı kontrol muayeneleri yapılmalıdır (141).

3.1.4. Kurşun Zehirlenmesinde Tedavi:

Şelasyon tedavisi: Tedavide maruziyetin kesilmesinin yanı sıra spesifik tedavi olarak şelasyon yapıcı ajanlardan yararlanır. CaNa_2EDTA (Kalsiyum Disodyum Etilen Diamin Tetra Asetik asit), iyonik formda olması nedeniyle hücre içine giremez ve sadece ekstraselüler kurşunu bağlar ve idrarla atılır. Hekim gözetiminde 5 günlük intravenöz infüzyon tedavisinden sonra tedaviye birkaç gün ara verilir. Gerek varsa ikinci, üçüncü kez tedavi tekrarlanabilir. Tedavinin yan etkilerinden en önemlisi, ilk gün dokulardan mobilize edilen kurşunun tekrar beyin ve karaciğerde dağılımının gerçekleşmesidir. CaNa_2EDTA 'nın kullanılmadığı durumlarda BAL (British Anti Lewisite-Dimerkaprol) ve penisilamin (β,β -dimetil sistein) de kullanılabilir. BAL kas içi olarak uygulanır, kurşunu 2:1 oranında bağlar, idrar ve safrayla atılır. EDTA'dan farklı olarak beyindeki kurşunu da bağlar. Bu nedenle kurşun ensefalopatisi varlığında BAL, EDTA ile kombine olarak özellikle $70 \mu\text{g/dl}$ 'nin üzerindeki kurşun seviyelerinde kullanılır. Penisilamin, sülfür içeren bir amino asittir ve sindirim sisteminden emilimi kolay olduğundan ağızdan verilebilir. Kolay uygulandığı için kullanımı yaygındır ve özellikle $25-40 \mu\text{g/dl}$ kurşun düzeylerinde tavsiye edilir. Fakat kullanımı FDA tarafından onaylanmamıştır. Succimer'in (2,3-mezo-dimerkaptosüksinik asit-DMSA) etkinliği CaNa_2EDTA ile benzer düzeydedir. Klinik deneyim yetersizliğinden dolayı kullanımı yalnızca $45 \mu\text{g/dl}$ 'nin üzerindeki kan kurşun düzeyine sahip çocuklarda onay almıştır ve oral olarak kullanılabilir (52, 148).

3.2. KURŞUN VE OKSİDATİF STRES

Kurşun, çevremizde geniş ölçüde yer alan fizyolojik, biyokimyasal ve davranışsal bozukluklara yol açan toksik bir metaldir. Toksikitesi yıllar boyunca yapılan çalışmalarda defalarca gösterilmiş, memelilerdeki zehirlenme mekanizması

ve belirtileri ortaya çıkarılmıştır. Zehirlenme belirtileri tamamıyla bilinmesine karşın, alternatif mekanizmalar gün geçtikçe artmaktadır. Son yapılan çalışmalar kurşunun potansiyel oksidatif stres oluşturduğunu ve bunun sonucunda fizyopatolojik bozukluklara sebep olduğunu göstermiştir (141).

3.2.1. Kurşunun Oluşturduğu Oksidatif Hasarın Mekanizmaları:

Bu metalin zehirlenme mekanizmaları arasında reaktif oksijen türlerinin artışı sonucu lipid peroksidasyonu, DNA hasarı ve hücrelerdeki sülfidrilli antioksidan savunma sistemlerinin tüketilmesi başrolü oynamaktadır (52).

Toksik metallere biri olan kurşunun biyolojik makromoleküller üzerinde nasıl oksidatif stres meydana getirdiği araştırılmıştır. Kurşun, civa, kadmiyum gibi ağır metaller elektron ilgileri nedeniyle özellikle tiyol grubu içeren proteinlere tutunmakta ve biyolojik fonksiyonlarını engellemektedir. İki değerlikli Co^{+2} , Mn^{+2} , V^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} linoleik ve linolenik asit emülsiyonlarındaki oksidatif hasarı arttırmaktadır. Kurşunun da böyle bir prooksidan etkisi görülmüştür. Yiin ve Lin (152); linoleik, linolenik ve araşidonik asidi kurşun ile inkubasyona bırakmış ve lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehit (MDA) miktarının arttığını görmüştür. Daha sonraki çalışmalarda ise kurşuna maruz kalan dokularda lipid peroksidasyonunun arttığı ve antioksidan savunma sisteminin azaldığı görülmüştür (52). El-Sokkary ve ark. (31), kurşuna maruz bırakılan ratların beyin homojenatlarında lipid peroksidasyonunun (TBARS), antioksidan enzimler azalırken arttığını tespit etmişlerdir. Karaciğerde de benzer bir durum Sandhir ve Gill tarafından bulunmuştur (115). Somashekaraiah ve ark. (128), tavuk embriyolarının karaciğer, mitokondri ve lizozom membranlarında kurşunun lipid peroksidasyonunu arttırdığını göstermişlerdir.

3.2.2. Kurşunun Hücre Membranlarına Etkisi:

Kurşunun membran yapısı ve fonksiyonları üzerine olan etkilerinin araştırılması için en çok eritrositler kullanılmıştır. Eritrositler üzerine olan etkileri, kurşuna bu hücrelerin yüksek afinite ile bağlanmaları ve kan dolaşımı esnasında daha fazla maruz kalmaları sonucu oluşmaktadır. Eritrositlerin membranlarındaki ozmotik mekanik geçirgenlik, kurşun toksikasyonunu arttırmakta; böylece deformite oranı artmakta ve proteinlerin kompozisyonu ile membrana bağlı enzimlerin aktiviteleri de değişmektedir (34, 77). Kurşun, reaktif oksijen türlerini (ROS) ve membranlar üzerinde oksidatif stres sonucu direk bozucu etkileri arttırmaktadır. Biyolojik membranların ana komponentleri lipid ve proteinlerdir. Lipid molekülleri

membranlarda yağ asitlerinin hidrofobik yan zincirlerinde bulunur. İlk zincir reaksiyonu, membranlar ya da doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunda ilk basamaktır. Bunu yağ asitlerinin bir metilen grubundan H atomu çıkarılması izler. Yağ asitlerindeki çift bağın varlığı, komşu -CH bağlarını zayıflatarak, H atomunun ayrılmasını kolaylaştırır (34, 52, 75).

Kurşunun membranlar üzerine olan toksik etkilerine yönelik birçok araştırma yapılmış ve bu etkiler ile kurşunla artmış oksidatif hasar arasında bir korelasyon belirlenmiştir (52). Kurşun; linoleik, linolenik ve araşidonik asit gibi çoklu doymamış yağ asitleri ile inkübe edilmiş ve MDA konsantrasyonunun yağ asitlerinin çift bağ sayısı ile doğru orantılı arttığı gösterilmiştir (152). Araşidonik asit ile araşidonik asit/linoleat oranı, kurşuna maruz kalan civcivlere ait eritrosit membranlarında, karaciğer ve serumda yükselmiş olarak bulunmuştur (70). Yağ asitlerinin zincir uzunluğuna ve doymamışlığına bağlı olarak membranların peroksidasyonunda kurşuna bağlı artış meydana gelmektedir (75).

Ag^{+2} , Hg^{+2} , Pb^{+2} ve Cu^{+2} gibi metallerin lipit peroksidasyonuna ve hemolize neden olduğu bildirilmiştir (34). Kurşunun, E vitamini bakımından yetersiz beslenen ratların eritrositlerinin membranlarında peroksidasyon ile şekil bozukluğuna neden olduğu ileri sürülmüştür (77). Çalışmalar sonucunda kurşunun direk olarak lipit peroksidasyonu oluşturmadığı, indirek yolla bunu yaptığı ortaya çıkarılmıştır (110). Ağır metaller ve kurşunun eritrositlerde oksihb ile etkileşimleri önemli miktarda O_2^- ortaya çıkarmakta ve buna bağlı olarak oksidatif hasar oluşmaktadır (73, 110). Ayrıca kurşunun *in vitro* lipozom modelinde Hb otooksidasyonuna neden olduğu da bulunmuştur. SOD ve katalaz ile bu etkinin önlenmesi, O_2^- ve H_2O_2 'nin bu olayda rol oynadığını göstermiştir. Sonuç olarak kurşunun, oksihb ile etkileşime girerek ROS oluşumunu arttırdığı ve eritrosit membranlarında peroksidatif hasara yol açtığı bildirilmiştir (110).

Diğer yandan kurşunun *in vitro* deneylerde fosfatidilkolin içeren membranlara kuvvetli bir şekilde bağlandığı da ortaya konulmuş ve eritrosit membran fosfolipitlerinden fosfotidilkolin miktarında bir azalmaya neden olduğu bulunmuştur (34, 52). Ayrıca kurşuna maruz kalan ratların beyinlerinde fosfolipit ve lipit peroksidasyonu oranında yükselme de tespit edilmiştir (119).

3.2.3. Kurşun-Hemoglobin (Hb) İlişkileri

3.2.3.1. Porfirin ve Hem Sentezi

Porfirinler ve Hem halkası, mitokondrisi olmayan olgun eritrositler hariç tüm hücrelerde sentez edilmektedir. Fakat başlıca uzun kemiklerin ilikleri ve karaciğerde daha baskın olarak sentezlenmektedir (140). Hem sentezi sekiz geri dönüşümsüz reaksiyon basamağı ile oluşturulmaktadır. İlk basamak ve son üç basamak mitokondride, diğer basamaklar ise sitozolde gerçekleşmektedir (93, 140).

Hem sentezinin basamakları şekil 1’de gösterilmiştir.

1. Basamak [δ -amino levülinik asit (ALA) sentezi]:

Glisin ve süksinil-CoA’nın, mitokondride bulunan ve prostetik grup olarak piridoksal fosfat kullanan ALA-sentaz tarafından katalizlenen reaksiyonla birleştirilmesidir. Bu tepkimede glisinin α karbonu ile süksinil-CoA’nın karbonil grubunun bağlanması ile α -amino- β -ketoadipik asit oluşmakta ve daha sonra bu bileşiğin CO₂ kaybetmesi sonucu ALA elde edilmektedir. ALA-sentaz, Hem sentezinde hız kısıtlayıcı enzimdir ve son ürün olan Hem tarafından düzenlenir.

2. Basamak (Porfobilinojen sentezi):

Mitokondri içinde oluşan ALA sitoplazmaya geçer ve iki molekül ALA, iki molekül H₂O çıkışı ile porfirin prekürsörü olan porfobilinojeni (PBG) oluşturur. Oluşan PBG monopirolo yapısındadır. Bu tepkimeyi katalizleyen enzim, yapısında çinko bulunan ALA-dehidrataz (ALAD) enzimidir ve kurşun bu enzimin güçlü bir inhibitörüdür.

3. Basamak (Hidroksimetilbilan sentezi):

Dört adet PBG, baş kuyruk birleşmesi ile lineer tetrapirolo olan hidroksimetilbilanı oluşturur. Her bir metilen köprüsünün oluşumu için bir molekül amonyak salınır. Bu tepkimenin katalizini; porfobilinojen deaminaz (üroporfirinojen I sentetaz) enzimi gerçekleştirir.

4. Basamak (Üroporfirinojen III sentezi):

Hidroksimetilbilan, üroporfirinojen III sentetaz enzimiyle yapısındaki dördüncü pirol halkasında bulunan yan grupların yer değiştirmesiyle üroporfirinojen III’e ve kendiliğinden de üroporfirinojen I’e dönüşür. Oluşan üroporfirinojen I, Hem sentezine katılmaz. Üroporfirinojen I’de ardışık olarak dört adet asetat, dört adet de propiyonat yan grubu bulunmaktadır. Üroporfirinojen III’ün dördüncü pirol halkasına ise önce propiyonat daha sonra asetat bağlanmaktadır.

5. Basamak (Koproporfirinojen III sentezi):

Üroporfirinojen III, üroporfirinojen dekarboksilaz enzimi aracılığıyla koproporfirinojen III'e dönüştürülmektedir. Bu reaksiyonda tüm asetat yan grupları CO₂ kaybederek metile dönüşmektedir. Aynı enzim üroporfirinojen I'i de koproporfirinojen I'e dönüştürür.

6. Basamak (Protoporfirinojen sentezi):

Koproporfirinojen III, mitokondri içerisine girerek burada koproporfirinojen oksidaz enzimi eşliğinde, protoporfirinojen IX'a dönüşmektedir. Bu tepkime sırasında birinci ve ikinci pirol halkalarında bulunan iki adet propiyonat CO₂ kaybederek, vinil yan grubuna dönüşmektedir. Sonuç olarak protoporfirinojende, üç ayrı yan grup (metil, vinil, propiyonat) bulunmaktadır.

7. Basamak (Protoporfirin sentezi):

Protoporfirinojen IX, mitokondride bulunan protoporfirinojen oksidaz enzimi varlığında altı H⁺ atomunu kaybederek protoporfirin IX'a dönüşür. Buradaki altı H⁺ atomunun ikisi pirol halkasındaki azotlardan, dördü ise metilen köprülerindeki C atomlarından elde edilmektedir.

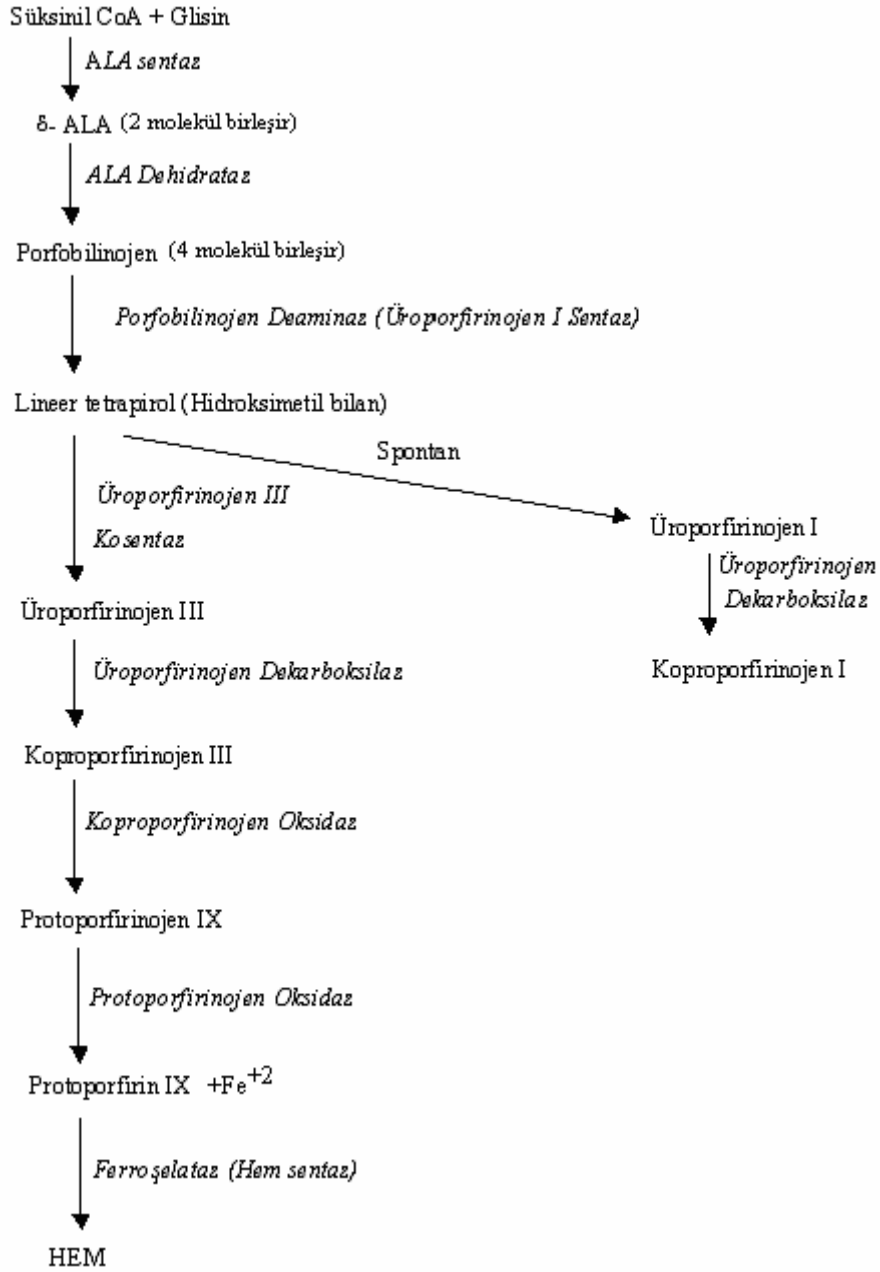
8. Basamak (Hem sentezi):

Hem sentezinde son kademe Fe⁺²'nin, mitokondrial bir enzim olan ferroşelatazın katalizlediği bir reaksiyonla protoporfirin IX'a sokulmasıdır.

3.2.3.2. Hem Sentezinin Düzenlenmesi

Hem biyosentezi özellikle sitokrom P₄₅₀'nin sentezlendiği karaciğerde ve Hb sentezinin yapıldığı kemik iliğinde gerçekleşir. Özellikle karaciğerde, ALA sentaz enzimi düzenleyici rol oynar ve son ürün Hem tarafından baskılanır (105, 140).

Hepatik Hem'in bir kısmı düzenleyici havuz halindedir. Bu havuzun doyurulması enzim sentezini yavaşlatırken, havuzun azalması ALA sentaz enziminin daha çok sentezlenmesine ve aktivitesinin artmasına neden olur. ALA sentaz, turnover hızı yüksek olan (yarı ömrü yaklaşık 1 saat) bir enzimdir. Düzenleyici Hem havuzunun büyüklüğü hemoprotein gereksinmesinden etkilenebilir. Sinek öldürücüler gibi birçok ilaç ve karsinojenler karaciğerde bulunan bir hemoprotein oksidaz sistemi olan mikrozomal sitokrom P₄₅₀ monooksijenaz sistemi ile metabolize olurlar. Bu esnada büyük oranda sitokrom P₄₅₀ kullanılır ve sonuçta karaciğer hücre içi Hem konsantrasyonu azalır. Bu da ALA sentazı uyarır (93, 105).



Şekil 1. Hem sentezinin basamakları (93).

ALA sentaz artışına yol açan bir diğer durum da, Hem sentez yolundaki enzimlerin kısmi eksiklikleri sonucu ortaya çıkan porfiriyalarda görülür. Kısmi bloklanma sonucu Hem sentezinin yeterince yapılamaması nedeniyle Hem havuzu azalır ve sekonder porfiriyalarda bu nedenle ALA sentaz aktivitesi artmıştır. Buna bağlı olarak; baskılanmanın olduğu aşamaya kadar olan porfirinler aşırı yapılmakta ve bunlar vücutta birikerek özellikle idrar ile dışarı atılmaktadır. Benzer bir mekanizma ile akut porfiriyalarda bazı ilaçların alınması porfiriya atağını gölgeleyebilir. Örneğin; hastaya glukoz veya hematin verilmesi ALA sentaz aktivitesini azaltır. Karaciğer dışı Hem sentezleyen dokularda, özellikle olgunlaşmamış eritrositlerde

ALA sentazın, hız kısıtlayıcı enzim olmadığı düşünülmektedir. Retikülositlerde Hem sentez hızı demir sağlanması ile düzenlenmektedir (93, 105).

3.2.3.3. Kurşun Zehirlenmesi ve Hem Biyosentezi

Hem biyosentezi basamaklarındaki bozukluk çeşitli tipte porfiriyalara neden olmaktadır. Primer porfiriyalarda enzim eksikliği, sekonder porfiriyalarda ise enzim inhibisyonu mevcuttur. Sekonder porfiriya; heksaklorobenzen, alkol, kloralhidrat, morfin, eter, kurşun ve diğer ağır metallerin Hem biyosentezinde rol alan enzimleri inhibe etmesiyle oluşur. Sekonder porfiriya için idrar koproporfinin artışı ortak bulgudur (61).

Genellikle Hem sentezindeki ilk basamaktaki enzimlerin kurşun ile inhibisyonu; karın ağrısı, periferal nöropati, psikiyatrik rahatsızlıklar, ALA ve PBG'nin idrarla atılımı ile karakterize akut porfiriyalara neden olmaktadır. Son basamaklardaki enzimlerin kurşun ile inhibisyonu ise porfirinlerin fotodinamik etkileri ile oluşan cilt rahatsızlıklarının görüldüğü akut olmayan porfiriyalara yol açmaktadır. Bu tip porfiriyalarda ciltte ciddi yangılara, kabarcıklara, yara izlerine ve fazla miktarda porfirinlerin idrar ve feçesle atılmasına rastlanır. Hastalar bazen akut porfiriyanın belirtilerini gösterebilir, idrarla ALA ve porfobilinojen atabilir (61).

Kurşun zehirlenmesi karmaşık bir bozukluk olup; eritrositler, böbrekler ve sinir sistemini etkilemektedir. En göze çarpan etkisini Hem biyosentezine yapar. Burada kurşun; hemoglobin, sitokrom, katalaz ve peroksidazlar üzerinde yer alan prostetik grubu etkilemektedir. Kurşunun anemi yapması onun Hem biyosentezini etkilediğini düşündürmektedir (126). Vücuda demir alımını engelleyerek etkisini gösterdiği düşünülecek olsa da; zehirlenme sonucunda idrarla porfirinler ve Hem prekürsörü olan ALA atılımının artması kurşunun sentez basamaklarını da etkilediğini ispatlamaktadır (46). Dahası kalıtsal akut intermitent porfiriya ile kurşun zehirlenmesi benzer belirtiler göstermektedir. Enzim çalışmaları kurşunun ALAD, koproporfirinojen oksidaz ile ferroşelatazı inhibe ettiğini göstermiştir (34, 46). Fakat en yüksek etkiyi ALAD üzerine yaptığından dolayı kandaki kurşun seviyesini gösteren bir indikatör olarak kullanılmaktadır. Böylece kurşun zehirlenmesi ve akut porfiriyanın etkisi ile kanda yükselmiş olan ALA düzeyi görülür. Kurşun; ALAD'ı inhibe ederek önce hücre içi, sonra sırasıyla plazma ve idrar ALA artışına neden olur. Kurşun eritrosit ferroşelataz enzimini de inhibe eder. Dolayısıyla enzimin görevi olan demirin protoporfirin IX içine sokulması aksar ve özellikle eritrosit protoporfirininin serbest formu artar. Ayrıca eritrosit çinko protoporfirinde de (ZnPP) artış görülür.

Artan protoporfirin IX içine demir yerine çinkonun girmesi sonucu ZnPP meydana gelir (46). Ayrıca otonom sinir sisteminin inhibisyonu nedeniyle kas tonusundaki zayıflık, kabızlık ve karın ağrısı belirtilerine sahip nöropatinin, sinir sisteminde ALA'nın γ -aminobütirik asit reseptörlerinin agonisti olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (20).

3.2.3.4. ALA İle Reaktif Oksijen Türevleri Oluşumunun İndüklenmesi:

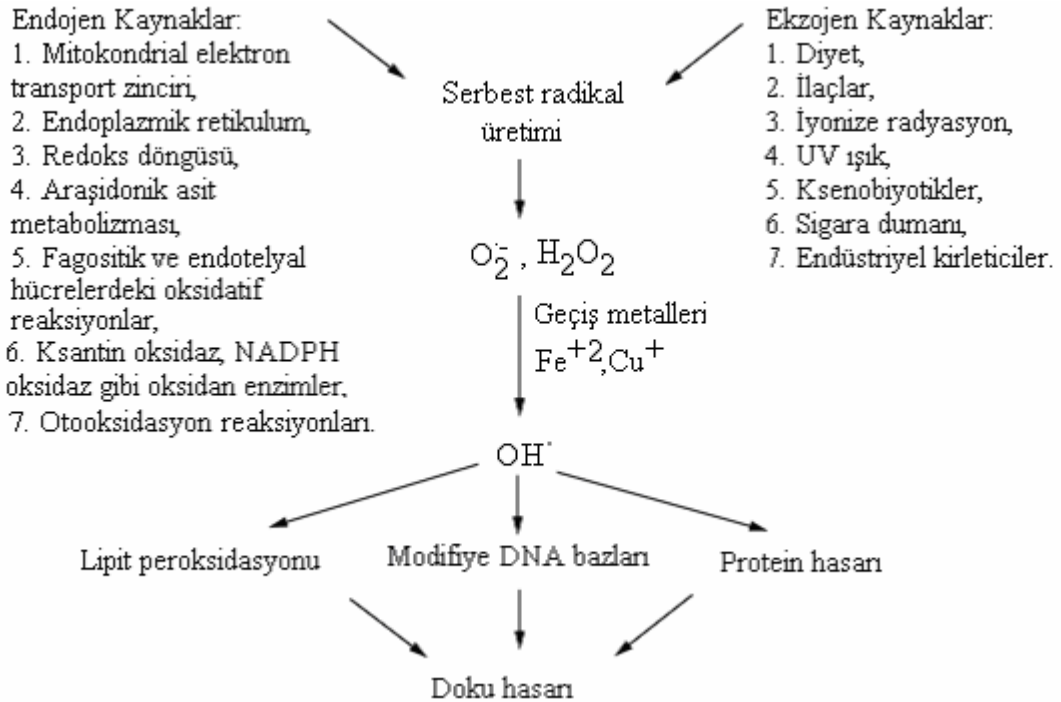
Kurşun zehirlenmesinin hedeflerinden biri de hematolojik sistemdir. Kurşun bu sistemi; Hem ve Hb sentezini önleyerek ve eritrosit morfolojisi ile ömrünü değiştirerek etkiler. Kurşun Hem sentezinde ALA sentazı, ferroşelatazı ve ALAD'ı engeller. Bu ara yolda kurşuna en duyarlı olan enzim ALAD'dır. Kurşun düşük kan seviyelerinde bile (15 $\mu\text{g}/\text{dl}$) sitozolik tiyol grubu taşıyan bir enzim olan ALAD'ı engelleyebilir (34, 52). Kurşun Hem sentez yolunun son basamağındaki ferroşelatazı da engeller. İki ALA molekülünden ALAD'la porfobilinojen oluşumu ve protoporfirin IX'a demirin ferroşelataz ile sokulmasının engellemesi sonucunda Hem sentezi bozulmaktadır. Hem sentezinin baskılanması ise negatif geri besleme yoluyla ALA üretiminin yükselmesine ve 2 ALA molekülünün birleşerek porfobilinojene dönüşümünün baskılanmasına; böylece kan dolaşımındaki ve idrardaki ALA miktarının yükselmesine neden olur (34, 46, 52).

ALA'nın ROS oluşumunu indüklemesi üzerine birçok araştırma yapılmıştır (20, 34, 52, 56). ALA, pH 7.0-8.0'de enolizasyona ve otooksidasyona uğrar. Keto-ALA formun enol forma dönüşümü, otooksidasyon reaksiyonları için gereklidir. Fakat ALA'nın amino grubunun enolizasyonunun oksidasyon reaksiyonlarında aktif olmadığı görülmüştür. Enolize ALA, daha sonra otookside olmakta ve ferrisitokrom C'nin indirgenmesi ile birlikte süperoksit anyonu oluşturarak; aynı zamanda elektron yörüngesi kaybetmektedir. ALA/oksiHb çiftinin ise oksidasyonu, ROS oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Buradaki basamaklarda sırasıyla tautoizomerizasyonu takiben enol formu oluşur; ALA, moleküler oksijene elektron vererek oksihb'in metHb'e dönüşümüne ve ALA radikali oluşumuna yol açar. ALA ve ALA/oksiHb otooksidasyon çifti etkileşerek, ROS bileşikleri içinde en yüksek reaksiyon kabiliyetine sahip OH^\cdot ve $\text{O}_2^{\cdot-}$ ile H_2O_2 'i oluştururlar. Bu bilgiyi SOD, katalaz ve mannitolün ALA/oksiHb çiftinin oksidasyonunu önlemesi sonucunda yukarıdaki radikallerin ortaya çıkmaması da desteklemektedir (34, 52). Sonuç olarak, kurşun zehirlenmesinin patofizyolojisinde kabul edildiği gibi ALA birikiminin ROS oluşumu ve oksidatif hasarın kaynağı olduğu görüşüne varılmıştır (34). Buna ek

olarak nükleozid ve izole DNA'dan elde edilen guanozini etkili bir şekilde alkilleyen 4,5-dioksovalerik asidin, ALA'nın bir oksidasyon ürünü olduğu da gösterilmiştir. Ayrıca kronik olarak ALA verilmiş ratların DNA'larında; ALA'nın indüklediği DNA hasarına yol açan OH[•] oluşumu sonucunda 8-okzo-7,8-dihidro-29-deoksiguanozin ve 5-hidroksi-29-deoksisistidin düzeylerinin yükseldiği de rapor edilmiştir. Bu bulgular aynı zamanda ALA'nın genotoksik etkilerini de göstermektedir (56).

3.3. SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller, dış yörüngesinde paylaşılmamış bir elektron taşıyan biyokimyasal ürünlerdir. Atomların çoğu moleküllerde zıt yönlerde dönmekte ve yapılarında birbirlerinin fizikokimyasal reaktivitesini engelleyen elektron çiftleriyle dolu yörüngeler bulunmaktadır. Serbest radikaller, radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron çıkmasıyla ya da bir elektron ilavesiyle oluşurlar. Bu durumda radikal çok reaktif ve kararsız yapıdadır. Diğer moleküllere elektron verebildiklerinden ya da onlardan elektron alabildiklerinden dolayı vücutta indirgeyici veya yükseltgeyici olarak davranırlar. Bu özellikleri nedeniyle çok kısa bir yarı ömre (10^{-6} saniyeden daha kısa) sahiptirler. İnorganik ve organik kimyasal maddelere-özellikle membran molekülleri ve nükleik asitler için anahtar özellikteki moleküllere-girerek hücre reaksiyonlarını etkilerler (36, 60, 153). Başlıca serbest radikal kaynakları ve etkileri şekil 2'de özetlenmiştir:



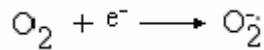
Şekil 2. Vücuttaki serbest radikallerin etkileri ve kaynakları (153).

3.3.1. REAKTİF OKSİJEN TÜREVLERİ (ROS)

Dış orbital yörüngesinde paylaşılmamış bir elektron ile bir oksijen atomu taşıyan bileşiklere reaktif oksijen türevleri adı verilmektedir. Sadece oksijenin indirgenmesi ya da oksijene iyonize radyasyonun etkimesi ile meydana gelmektedirler. Oksijenden oluşan başlıca reaktif oksijen türevleri; $O_2^{\cdot-}$ (süperoksit) radikali, H_2O_2 (hidrojen peroksit), OH^{\cdot} (hidroksil) radikali, $HOCl$ (hipokloröz asit), $O_2^{\uparrow\downarrow}$ (singlet O_2), R^{\cdot} (alkil radikali), ROO^{\cdot} (peroksil radikali), $RCOO^{\cdot}$ (organik peroksit radikali), HO_2^{\cdot} (perhidroksil radikali) ve RO^{\cdot} (alkoksil radikali)'dir (36, 153):

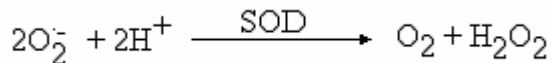
1. $O_2^{\cdot-}$ (Süperoksit) Radikali:

Moleküler oksijene (O_2) bir elektron transfer edilerek indirgenmesi sonucu kararsız bir yapı olan $O_2^{\cdot-}$ (süperoksit) radikali oluşur. *In vivo* olarak adrenalın, flavin nükleotidleri, tiyol içeren bileşikler, glukoz ile demir ve bakır gibi geçiş metallere oksijene etkisiyle $O_2^{\cdot-}$ oluşur. İç mitokondri membranındaki elektron transport zinciri esnasında oksijen suya dönüştürülmekte ve bu esnada elektron transport zinciri komponentlerine bağlanabilen serbest radikal bileşikler meydana gelmektedir. Ayrıca mitokondri matriksine birkaç elektron sızarak süperoksit de meydana getirebilmektedir. Karaciğerde sitokrom P_{450} ile adrenal medullada hormonların sentezinde yer alan bazı enzimler de sitoplazmaya elektron sızıntısına yol açarak süperoksit meydana getirmektedir. Damar endotelinde nitrik oksitlerin elimine edilmesinde, hücre büyümesi ve farklılaşması esnasında hücreler tarafından ve fagositik hücrelerce de süperoksit oluşturulmaktadır (153):



2. H_2O_2 (Hidrojen Peroksit):

$O_2^{\cdot-}$ 'e bir elektron transfer edilir (süperoksit dismutasyonu) ya da O_2 'e iki elektronun eklenmesi sonucu indirgenmesiyle hidrojen peroksit oluşur. Ayrıca glukolat oksidaz ile D-amino asit oksidaz direk olarak H_2O_2 meydana getirirler. Dismutasyon spontan olarak veya SOD enziminin katalizlemesi ile oluşur (36, 153):

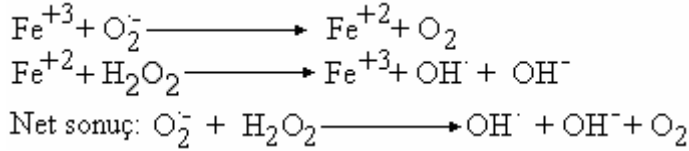


3. OH^{\cdot} (Hidroksil) Radikali, Fenton ve Haber-Weiss Reaksiyonları:

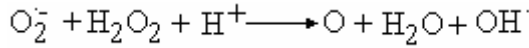
Moleküler oksijene üç elektron transferi ile meydana gelir. Serbest radikallerin çoğunun zararlı etkilerine hidroksil radikaline dönüşmeleri neden olmaktadır. ROS arasında en reaktif olanıdır ve yaşayan hücrelerde bulunan şeker,

amino asit, lipid ve nükleotid gibi tüm bileşiklerle reaksiyona girebilir. Hidrojen peroksit ve süperoksit, elemental halde bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektron taşıyan ve bu nedenle serbest radikal özelliği kazanan geçiş metalleri ile reaksiyona girerek ya da diğer etkilere hidroksil radikalini oluşturur (36, 153):

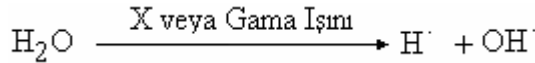
1. Fenton reaksiyonu: Hidrojen peroksidin, Fe^{+2} ve diğer geçiş metalleri (Cu^{+1} , Mn^{+2} , Cr^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Mo^{+2}) varlığında indirgenmesi ile OH^{\cdot} radikali oluşur:



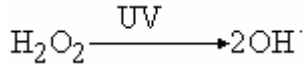
2. Haber-Weiss reaksiyonu: Hidrojen peroksit, $O_2^{\cdot-}$ ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturur (Bu reaksiyon bakır ve demir tarafından katalizlenir).



3. Suyun yüksek enerjili iyonizan radyasyona maruz kalmasıyla da OH^{\cdot} oluşur:

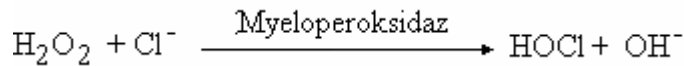


4. H_2O_2 'nin UV ışığına maruz kalması ile de OH^{\cdot} oluşabilir:



4. HOCl (Hipokloröz Asit):

Hipokloröz asit, radikal olmadığı halde ROS arasında yer almaktadır. Vücudun mikroorganizmalara karşı savunma sisteminde önemli rol alan nötrofil, monosit, makrofaj ve eozinofillerin arasında yer aldığı fagositik hücreler, bakterilerin öldürülmesinde süperoksitten yararlanırlar. Özellikle nötrofiller içerdikleri myeloperoksidaz enzimi aracılığıyla süperoksidin dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksidi, klorür iyonu ile birleştirilerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl'ye dönüştürürler (3, 153):



5. $O_2^{\uparrow\downarrow}$ (Singlet O_2):

Yapısında eşleşmemiş elektronu bulunmaması nedeniyle serbest radikal olmadığı halde; ROS arasında yer alan $O_2^{\uparrow\downarrow}$ serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olması açısından önem taşımaktadır. Singlet O_2 , oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi neticesi oluşabileceği gibi; süperoksit radikalının NO ile veya hidrojen peroksidin hipoklorit ile reaksiyonu

sonucunda da oluşabilir. Tetrapiroller (protoporfirin IX, bilirubin), flavinler (FMN, FAD) ve redükte pirimidin nükleotidleri (NADH, NADPH) ile ilaçlar, kozmetikler ve yiyeceklerde bulunan fotosensitif bileşiklerin moleküler oksijene radyasyonik etkili 320-400 nm spektrum aralığındaki UV ışıktan aldıkları enerjiyi transfer etmeleri ile singlet oksijenin meydana geldiği de bildirilmiştir. Vücutta deri ve retina gibi gün ışığına maruz kalan bölgelerde sıkça oluştuğu belirlenmiştir (36, 47).

6. R[•] (Alkil Radikali, Organik radikaller):

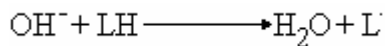
Hidroksil radikali, yağ asitleri başta olmak üzere; nükleik asitler, karbonhidratlar ve proteinler gibi çeşitli moleküllerden bir proton çıkarıp karbon merkezli organik radikallerin oluşmasına neden olur (143).

7. ROO[•] (Peroksil Radikali) ve Lipit Peroksidasyonu:

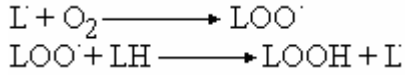
Karbon merkezli radikaller, hızlı bir şekilde oksijen ile reaksiyona girerek peroksil radikalini oluştururlar. Bu peroksil radikali lipit peroksidasyonunu başlatan radikal olup, çok uzun ömürlüdür. Biyomembranlar ve hücre içi organeller (mitokondri, endoplazmik retikulum vs.) membran fosfolipitlerindeki doymamış yağ asitlerinin varlığı nedeniyle oksidatif ataklara duyarlıdır. Lipit peroksidasyonundaki ROS'ların oluşumu; metabolik dismutasyon, redüksiyon ya da fotokimyasal olarak oluşan O₂⁻ ve H₂O₂ ile başlar. Fenton reaksiyonu ile H₂O₂'den Fe⁺² etkisi ile tetikleyici (initiator) faktör OH[•] radikali meydana gelmektedir (47, 143, 153).

Biyolojik membranlarda serbest radikallerle indüklenen lipit peroksidasyonu; başlatma (initiation), ilerleme (propagation), yıkım (degradation) ve sonlanma (termination) olmak üzere dört aşamada gerçekleşir (47, 143):

1. Başlatma (Initiation) safhası: Hidroksil radikallerinin poliansatüre yağ asitlerinin bir metilen grubundaki divinil (allilik) H atomunu koparması ile zincir reaksiyonu başlamaktadır (36, 106). Yağ asidinde çift bağ varlığı, C-H bağı zayıflatarak H⁺ atomunun koparılmasını kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle membran lipitlerindeki doymamış yağ asitleri peroksidasyona özellikle duyarlıdır. Bu reaksiyon hem membran lipitleri; hem besinsel yağlarda gerçekleşmektedir. Fosfolipitlerde bu H⁺, kolesterolün C-7 hidrojeninden koparılmaktadır. Metilen grubundaki H atomunun çıkartılması ile geride karbon üzerinde eşleşmemiş bir elektron kalmaktadır (-CH[•]). Oluşan bu yapıya karbon merkezli radikal veya lipit alkil radikali (L[•]) denilmektedir:



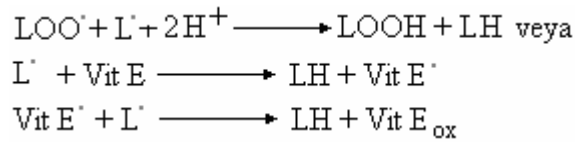
2. İlerleme (Propagation) safhası: Oluşan bu radikal moleküler düzenlenme ile konjuge dien formuna çevrildikten sonra moleküler oksijen ile reaksiyona girerek lipit peroksil radikali (LOO[·]) ile lipit peroksidi (LOOH) oluşturur:



3. Yıkım (Degradation) safhası: Konjuge dienlerin oluşumuna yol açan çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu; yağ asidi zincirinin ayrılması ve sonrasında genellikle tiyobarbitürik asit reaktif maddeler olarak bilinen ürünlerin açığa çıkması izlemektedir.

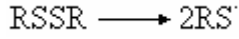
4. Sonlanma (Termination) safhası: Demir ile bakır iyonları, bu iyonların fosfat esterleri ile oluşturdukları asit şelatları ile Hem, hemoglobin ve miyoglobini de içeren bazı demir proteinleri lipit hidroperoksitlerini bozarak peroksidasyonu sonlandırmaktadır (47, 143).

Lipit peroksidasyonuna karşı koruyucu safhada, süperoksidi bakır/çinko-bağımlı (sitozolik) ile manganez-bağımlı (mitokondrial) süperoksit dizmutazlar; düşük konsantrasyonlardaki (düşük K_m) H₂O₂'yi sitozolik ve mitokondrial GSH-Px, yüksek konsantrasyonlardaki (yüksek K_m) H₂O₂'yi ise perokzimal katalaz etkisizleştirmektedir (şekil 3). Ek olarak sonlandırıcı safhada lipit peroksidasyonunu kesen ya da etkilerini onaran mekanizmalar da bulunmaktadır. Zincir kırıcı özellikteki α-tokoferol ve bütil hidroksitoluen, peroksil radikalleri için lipitlerle yarışmalı mekanizma ile lipit peroksidasyonunu sonlandırmaktadır (47). Vitamin E'nin etkisi aşağıda gösterilmiştir:

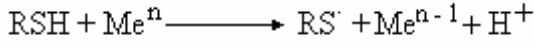


Şekil 3'teki reaksiyon akışına dikkatle bakıldığında, lipit peroksidasyonunun kendisini tetikleyerek yeniden lipit radikalleri ve peroksitleri oluşturduğu görülmektedir. NO'nun ise zincir kırıcı antioksidatif etkisini peroksil radikalleri ile nitrozoperoksil bileşikleri oluşturarak gösterdiği bildirilmiştir. Demir içeren laktoferrin ile ferritin birinci ve ikinci basamakta etkisini göstermektedir. GSH-Px, yağ asidi hidroperoksitlerini detoksifiye ederek ikinci safhada da görev almaktadır (36, 47).

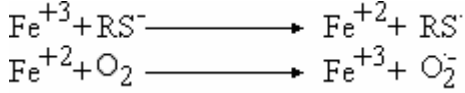
Işığın etkisiyle kendiliğinden de serbest radikal formuna dönüşürler:



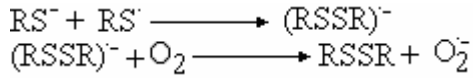
Geçiş metallere varlığında oksitlenerek RS^{\cdot} radikali oluştururlar:



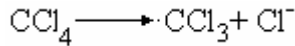
Tiyol bileşikleri prooksidan etkisini Fe^{+3} 'ü, Fe^{+2} 'ye indirirken de göstererek tiyil radikallerini ortaya çıkarmaktadırlar. Daha da önemlisi bu reaksiyonlar sonucunda fazladan bir süperoksit radikali de meydana gelmektedir:



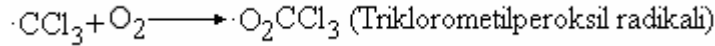
Genellikle tiyil bileşikleri vücutta bir tiyolat anyonu ile reaksiyona girmekte ve oluşan disülfid radikal anyonu $(\text{RSSR})^{\cdot-}$ ise moleküler oksijenle birleşerek süperoksit ortaya çıkarmakta; bu bileşik de SOD tarafından yıkılmaktadır (143):



2) Karbon merkezli radikaller, birçok biyolojik sistemde oluşabilmektedir. Örnek olarak CCl_4 verilebilir:



3) Karbon merkezli radikaller çoğunlukla O_2 ile reaksiyona girerek peroksil radikali verirler:



4) Fosfor merkezli radikallerin de olduğu bildirilmiştir.

5) Azot merkezli radikaller de oluşabilir. Örneğin eritrositlerde fenilhidrazin metabolizmasında fenilhidrazin radikali ($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}=\text{N}^{\cdot}$) oluşur. Bu başlık altında nitrik oksit (NO) önem arz etmektedir.

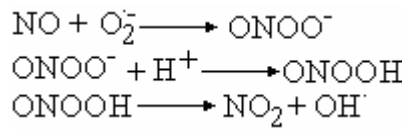
Nitrik Oksit (NO)

NO, biyolojik sistemlerde oluşan reaktif nitrojen türevlerinin en önemlisi olup, oksidasyon değeri +2'dir. Bir azot atomu ile oksijen atomunun çiftleşmemiş elektron vererek birleşmesinden meydana gelmiştir ve bu yüzden radikal tanımına uymaktadır. Bu lipofilik serbest radikal, damar endotel hücrelerinde nitrik oksit sentaz enzimi aracılığıyla L-arjininden sentezlenir. NO'nun yarı ömrü 10-20 saniye olduğu için üretimi hakkında fikir sahibi olabilmek amacıyla NO_2 ölçümleri yapılabilir. Kolayca düz kasa geçerek guanilat siklaz enziminin "Hem" demirine bağlanır ve cGMP sentezini uyarıp damar gevşemesini sağlar. Sentezlenen NO, aynı

zamanda tiyol gruplarını S-nitrozilasyona uğratarak protein ve reseptör fonksiyonlarını da değiştirir. NO, Fe-S kümelerine afinite gösterdiği için bu grupları içeren akonitaz enzimine de bağlanır. Bu enzim hücre içi demir trafiğini kontrol eder. NO, akonitaz enzimine mRNA bağlanmasını artırır ve enzimin aktivitesini düşürür. NO, metabolize olurken moleküler oksijen ile bağlanıp azot dioksit (NO₂) oluşturur:

$$2\text{NO} + \text{O}_2 \longrightarrow 2\text{NO}_2$$

Yukarıdaki etkileri dışında NO'nun tek başına radikal özelliği, ortaya çıkan toksisiteyi tanımlamaya yetmemektedir. NO'nun vücuttaki ROS'lar ile reaksiyon vererek güçlü bir oksidan olan peroksinitrit (ONOOH) oluşturduğu ve bunun da ileri dekompozisyonla OH[•] radikali meydana getirdiği ifade edilmektedir:



OH[•] ise biyolojik olarak yıkıcı bir moleküldür. Ayrıca, peroksinitrit de tirozin gibi fenolik amino asitleri nitrolayarak toksik nitro-türevleri (nitrotirozin) oluşturmaktadır. Sonuç olarak NO; endotel hücre disfonksiyonu, ateroskleroz, hipertansiyon ve kalp-damar hastalıklarında rol oynayabilmektedir (12, 36, 54).

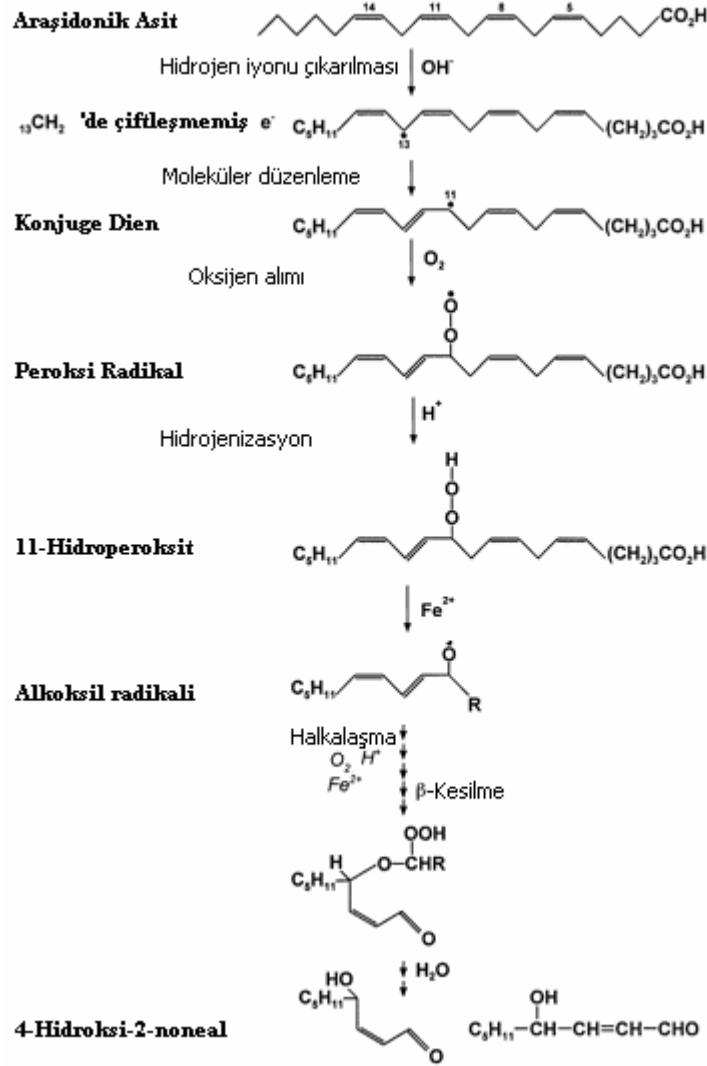
3.3.3. Serbest Radikallerin Biyolojik Roller

Hücre membranları serbest radikallere karşı oldukça duyarlıdır. Özellikle, membranın lipit yapısı içinde kolaylıkla yer değiştiren hidroksil radikali, protein ve lipit yapısında oksidasyonlara yol açarak membran akışkanlığının bozulması ve permeabilite artışı gibi hücre yaşlanması ve ölümü ile sonuçlanan olaylara neden olur (2). Serbest radikaller birçok kronik hastalığın patogenezine aracılık eder, ama bunun yanında immün sistemde aktif fagositik hücreler tarafından patojenlerin öldürülmesinde de görev alırlar. Bu nedenle serbest radikaller biyolojide iki yüzü keskin bıçak gibidir. Fizyolojik seviyelerde koruyucu molekül olarak görev yaparken, patolojik seviyelerde organizma için zararlıdırlar (2, 36).

3.3.3.1. Serbest Radikallerin Membran Lipitlerine Etkileri

Lipit peroksidasyonu; membranda bulunan fosfolipit, glikolipit, gliserid ve sterol yapısında yer alan çoklu doymamış yağ asitlerinin, serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur (Şekil 4). Membrandaki yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan kısa zincirli yağ asitleri ve yapısal proteinlerin oksidasyonu; membran permeabilitesinin artmasına ve membrandaki akışkanlığın

azalmasına neden olmaktadır. Membran geçirgenliğinin bozulması ise; protein sentezi için çok önemli olan K^+ ve Mg^{+2} konsantrasyonlarının değişmesine, kalsiyum gibi iyonların hücre içine geçişinin kolaylaşmasına ve buna bağlı olarak protein sentezinin inhibisyonuna neden olmaktadır (2, 47, 72).



Şekil 4. Lipit peroksidasyonu (106).

3.3.3.2. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri

Proteinler serbest radikal etkisine karşı, çoklu doymamış yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme dereceleri amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Metiyonin, sistein gibi -SH (tiyol grubu) içeren amino asitler ile triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi aromatik amino asitler oksidasyona en fazla derecede maruz kalmaktadırlar. Oksidasyon sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında oluşan değişiklikler fonksiyonlarını etkilemektedir. Enzim veya reseptör olan membran proteinleri, özellikle serbest

radikallerin modifikasyonuna duyarlı oldukları için önemli hücresel fonksiyonlarını kaybetmektedirler (82, 83).

3.3.3.3. DNA Hasarı

ROS'un hücrede saldırdığı bir diğer önemli makromolekül nükleik asitlerdir. Serbest oksijen radikalleri etkilerini DNA'nın temel taşı olan nükleotidin yapısı içinde yer alan pürin ve pirimidin bazları üzerinde gösterirler. Radikaller aracılığı ile özellikle guanin bazının hidroksilasyonu sonucunda DNA molekülünün yapısı değişmekte ve mutasyonlar ortaya çıkmaktadır (82, 83).

3.3.4. ROS ve Diğer Serbest Radikallere Karşı Antioksidan Savunma Sistemleri

Aerobik organizmalar metabolizmaları esnasında oksijen kaynaklı radikalleri oluştururlar. Bununla beraber, serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma sistemleri bulunur. Sağlıklı bireylerde oluşan ROS'lar ile antioksidan savunma sistemi arasında bir denge söz konusudur. Bu dengenin bozulması, oksidatif stresle sonuçlanmaktadır (145). Antioksidanların ilk belirlenen etkileri membranların yapısında bulunan lipitlerin peroksidasyona karşı korunması olmuştur. Günümüzde ise, antioksidanların koruyucu etkilerinin lipitlerin yanı sıra proteinleri, nükleik asitleri ve karbonhidratları da kapsadığı gösterilmiştir. Böylece, antioksidanlar hedef moleküllerdeki oksidan hasarı engelleyen veya geciktiren maddeler olarak tanımlanmıştır ve bu tanımla bağlantılı olarak antioksidanların etkileri farklı şekillerde olabilmektedir (85).

Antioksidanlar etkilerini başlıca iki şekilde gösterirler (97):

1) Serbest radikal oluşumunun önlenmesi:

- Başlatıcı reaktif türevlerini uzaklaştırıcı etki,
- Oksijeni uzaklaştırıcı veya konsantrasyonunu azaltıcı etki,
- Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etki.

2) Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi:

- Toplayıcı (scavenging) etki: ROS'u tutma ve çok daha az reaktif başka bir moleküle çevirme (Ör: Enzimler).
- Bastırıcı (quencher) etki: ROS ile etkileşip onlara bir proton ekleyerek aktivite kaybına neden olma (Ör: Flavonoidler, vitaminler).
- Onarıcı (repair) etki.

- Zincir kırıcı (chain breaking) etki: ROS ve zincirleme reaksiyonları başlatacak diğer maddeleri kendilerine bağlayıp fonksiyonlarını önleyici etki (Ör: Hemoglobin, seruloplazmin, mineraller).

Fizyolojik koşullarda, hücreler serbest radikal ürünleri ve peroksitler gibi moleküllerin neden olabileceği oksidatif hasara karşı antioksidan savunma sistemleri tarafından korunur. Bu sistemler şu şekilde sınıflandırılabilir:

A) Enzimatik Antioksidanlar:

1) Primer Enzimatik Antioksidanlar: Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon-S-transferaz (GST) ve glutatyon redüktaz (GR)'dir.

2) Enzimatik Antioksidanlarla İlişkili Olanlar: NADPH-kinolon oksidoredüktaz, epoksit hidrolaz, UDP-glukuronil transferaz, sülfonil transferaz, glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) ve α -fosfoglukonat dehidrojenazdır.

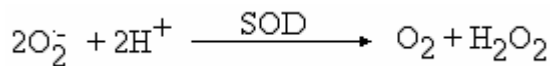
B) Enzimatik Olmayan Antioksidanlar: Bunlar glutatyon (GSH), vitamin A, C ve E ile flavonoidler, melatonin, ürik asit, albümin, haptoglobulin, sistein, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, ferritin, oksipurinol, ubiquinon, bilirubin, mannitol, lipoik asit ve hemopeksindir.

Genel olarak enzimatik antioksidanlar hücre içinde, enzimatik olmayanlar ise hücre dışında daha fazla etkilidir (istisna olarak; GSH hücre içi güçlü bir antioksidandır.) (85).

3.3.4.1. Enzim Yapısındaki Antioksidanlar

1. Süperoksit Dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1):

Süperoksidi hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çeviren reaksiyonu katalizleyen bir metalloenzimdir (40, 85, 117):

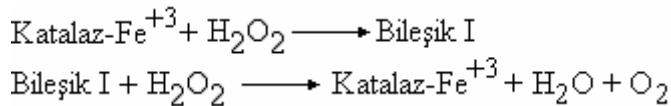


Bu reaksiyon “oksidatif strese karşı ilk savunma” olarak da adlandırılır. Çünkü süperoksit zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısıdır. Bu sistem sayesinde hücresel bölümlerdeki O_2^- düzeyleri kontrol altında tutulur. Oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit radikalinin zararlı etkisine karşı koruyan SOD enzimi; ayrıca fagosite edilmiş bakterilerin intraselüler öldürülmesinde de rol oynamaktadır (97). Oksijen kullanımının yüksek olduğu dokularda enzimin aktivitesi yüksek iken; ekstraselüler alanda enzim aktivitesi oldukça düşüktür. SOD'ın farklı izoenzimleri mevcuttur (40, 85):

- a) CuZn-SOD; ökaryotların sitozolunda, gram (-) bakterilerin periplazmasında, bitkilerin plastidlerinde ve memelilerin ekstraselüler kısımlarında ile olgun eritrositlerinde bulunmaktadır. Kofaktörleri çinko ve bakırdır. Enzimin aktivitesinden bakır, stabilitesinden çinko sorumludur. Çinko ile bakır arasında protonu tutan bir imidazol köprüsü bulunur. Cu^{+2} -imidazolün süperoksit ile indirgenmesi ile Cu-imidazol bağı kırılmakta ve imidazol protonlanmaktadır. Daha sonra diğer süperoksit molekülünün Cu^{+1} 'e indirgenmesi ile Cu-imidazol bağı yeniden oluşmakta, bu arada süperoksit proton ile HO_2^- 'ya dönüştürülmektedir. Aktif bölgeden ayrılan bu bileşiğe ikinci proton tutunarak H_2O_2 'yi meydana getirmektedir.
- b) Mn-SOD; prokaryot ve ökaryotların mitokondrisinde bulunmakta, kofaktör olarak mangan içermektedir.
- c) Fe-SOD; *E. Coli*, *Bacteroides fragilis* ve *Propionibacterium shermanii* bakterilerinde anaerobik ortamda Fe içeren, aerobik ortamda ise Mn içeren SOD enziminin kullanıldığı özel bir sistem şeklinde bulunmaktadır.
- d) Ni-SOD; *Streptomyces griseus* bakterinde tanımlanan homotetramerik yapılı nikel içeren bir izoenzimdir (40, 153).

2. Katalaz (EC, 1.11.1.6):

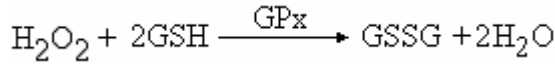
Katalaz, peroksizomlarda lokalize olmuş ve her birinin yapısında "Hem" grubu ile bir molekül NADPH bulunan 4 alt üniteden meydana gelmiş bir antioksidan enzimdir. Karaciğer ve eritrositlerde en yüksek aktiviteye sahiptir. SOD aracılığıyla oluşmuş olan hidrojen peroksit, OH^\cdot radikalinin öncüsü olması nedeniyle vücudun antioksidan savunma sistemi için önemli bir tehdittir. Bu nedenle birçok ROS'dan daha fazla oksidatif hasara neden olur. Katalaz ortamda yüksek konsantrasyonlarda hidrojen peroksit bulunduğunda (K_m 'si milimolar değerlerdedir), onu iki aşamada su ve moleküler oksijene parçalar (85, 153):



Böylece katalaz hücreyi kendi solunum patlamasına karşı korumaktadır. Katalazın peroksidaz aktivitesi hidrojen peroksidin yanı sıra, küçük molekülü lipid hidroperoksitleri ve kendi yapısına demir katmak amacıyla metanol, etanol, nitrit ve formik asidi de içine alır (153).

3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px, EC 1.11.1.9):

Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksit ve büyük moleküllü lipit hidroperoksitlerinin indirgenmesinden sorumludur. Sitozol ve mitokondride yerleşmiş, 4 selenyum atomu içeren tetramerik yapıda bir enzimdir. Karaciğerde en yüksek; kalp, akciğer ve beyinde orta; kasta düşük aktivitede bulunur. GSH-Px'in plazma formu böbrek tarafından sentezlenmektedir. GSH-Px, düşük hidrojen peroksit konsantrasyonlarında GSH'nın okside glutatyona (GSSG, glutasyon disülfid) oksidasyonunu katalize eder; bu arada H₂O₂ de suya dönüştürülerek detoksifiye edilmiş olur (117, 153):

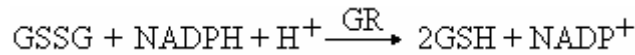


4. Tiyoredoksin redüktaz (EC 1.6.4.5):

Tiyoredoksin redüktaz, piridin nükleotidleri ile disülfid/tiyol bileşikleri arasında elektronların transferini, FAD ve redoks aktif disülfid ile uyarılarak katalize eden, dimerik flavoenzim ailesinin bir üyesidir. Enzim ailesi, mekanizma ve yapı bakımından benzer lipoamit dehidrojenaz, glutasyon redüktaz ve merkürük redüktazı da içine alır. Bunlar tek basamakta katalizlerini gerçekleştirirken, tiyoredoksin redüktaz iki basamakta reaksiyonu başarmaktadır. Tiyoredoksin redüktaz iki tiptedir: Prokaryotlarda 70 ve ökaryotlarda 112-130 kDa ağırlığında alt formlardadır (4, 18).

5. Glutasyon Redüktaz (GR, EC 1.6.4.2):

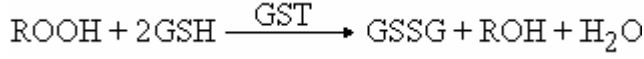
GSH-Px tarafından H₂O₂ ve diğer lipit peroksitlerin redüksiyonu sırasında glutasyon, okside glutatyona dönüştürülür. Bu okside formun ileride kullanılmak üzere tekrar redükte GSH'ya dönüştürülmesi gereklidir. Çünkü organizmanın glutasyon deposu sınırlıdır. Flavin nükleotidlere bağımlı bir enzim olan GR, pentoz fosfat yolundan elde edilen NADPH varlığında, glutasyon disülfidi tekrar redükte glutatyona (GSH) çevirir (117, 153):



6. Glutasyon-S-Transferaz (GST, EC 2.5.1.18):

GST'ler iki protein alt biriminden oluşan bir enzim ailesidir. 20 adet sitozolik formu bulunur ve bunlardan beşi membrana bağlı enzimdir. Membrana bağlı enzimler arasında lökotrien-C4 sentetaz; mikrozomal GST 1, 2, 3 ve prostaglandin E sentetaz bulunur. GST 1 sadece GSH-Px aktivitesi; GST 2 ve 3 ise hem GSH-Px hem de lökotrien-C4 sentetaz aktivitesi göstermektedir. Organizmaya giren ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynamaktadırlar. Ayrıca

GSH-Px aktivitesi de gösterirler. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipit hidroperoksitleri (ROOH), Se-bağımsız olarak etkisizleştirirler:



Antioksidan aktivitelerinin yanısıra çok önemli fonksiyonları da vardır. Ağrı, ateş, yangı, kanser, apopitoz, alerji ve astım gibi süreçlerde yer alırlar. Bilirubin ve kortikosteroidler gibi endojen maddeleri geri dönüşümlü olarak bağlayarak; bunların hücre içi transportunda görev alırlar. Bazı güçlü alkilleyici ajanlara doğrudan kovalent bağlanarak hücrel proteinler ve makromolekülleri bu ajanların etkisinden korurlar. GST'ler lökotrien B₄ ve prostaglandin sentezinde rol oynarlar (111).

3.3.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma Sistemleri

1. Glutasyon (GSH):

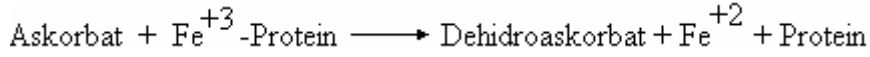
Önemli bir intrasellüler antioksidandır ve ekstrasellüler alanda çok düşük konsantrasyonlarda bulunur. Glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden meydana gelmiş bir tripeptittir. GSH'ya antioksidan özelliğini, sisteinin tiyol grubu kazandırır. Glutasyon, OH[•] ve singlet O₂ gibi ROS'ların temizleyicisidir. Serbest radikal ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Ayrıca proteinlerdeki -SH gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı muhafaza eder. Demirin, Fe⁺² (ferröz) halde tutulmasını sağlar. Böylece; protein ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller, hatta rejenere olmalarını sağlar. GSH birçok enzimin kofaktörüdür (Ör: HMGCoA Redüktaz). Tiroid hormon sentezinde rol oynar. Bazı moleküllerin hücre içi taşınmasına aracılık eder. Birçok kimyasalın karaciğerde detoksifikasyonunda rol oynar (97, 153).

2. Vitamin C (Askorbik Asit):

Vitamin C (askorbat), bir ketolaktondur. Suda eriyen vitaminlerden olan askorbik asit özellikle taze yeşil sebze ile meyve ve turunçgillerde bol miktarda bulunur. İnsanlarda askorbat hidroksilasyon reaksiyonlarını katalize eden enzimlerin kofaktörü olarak görev alır. Burada enzimlerin enzimatik aktivitelerini tam olarak kazanmaları için prostetik metal iyonlarına elektron sağlar. Örneğin kollajen sentezinde görevli prolin ve lizil oksidazlar için kofaktör olarak davranır. Çok güçlü bir indirgeyici ajan olan vitamin C; sulu fazlarda zincir kırıcı antioksidan olarak süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri, hipoklöröz asit, aküöz peroksil radikalleri ve singlet oksijen ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. Antioksidan etkisi esnasında, askorbat iki elektron ile indirgenerek semidehidroaskorbil radikaline ve sonra da dehidroaskorbata dönüşür.

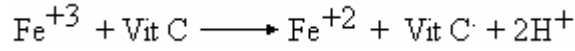
Dehidroaskorbat stabil değildir ve kolayca okzalik aside dönüşen diketogulonik aside hidrolize olur. Vücutta dehidroaskorbatın tekrar askorbata indirgendiği iki mekanizma vardır: Selenoenzim tiyoredoksin redüktaz ve redükte GSH. Ayrıca, antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller. Yine vitamin C, tokoferoksil radikalinin tokoferole redüklenmesini de sağlar (84, 153).

C vitamininin antioksidan etkisinin yanında oksidan etkisi de söz konusudur. Çünkü vitamin C ferrik demiri (Fe^{+3}), ferröz demire (Fe^{+2}) indirgeyen süperoksit dışındaki tek hücresel ajandır:

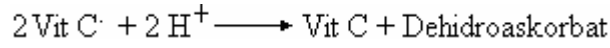


Bu yolla askorbik asit, proteine bağlı ferrik demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan indirgeyerek Fenton reaksiyonunda H_2O_2 ile etkileşmeye uygun olan ferröz demire dönüştürür. Yani $O_2^{\cdot-}$ üretimine katkıda bulunur.

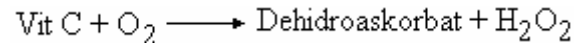
Vitamin C'nin Fe^{+3} ile doğrudan reaksiyonunda C vitamini radikali (Vit C \cdot) de oluşur:



Vit C çok reaktif değildir. Ya NADH redüktaz tarafından indirgenir ya da iki proton alıp serbest radikal reaksiyonlarının ilerlemesini durdurur:



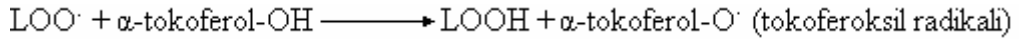
Bundan başka vitamin C oksidasyonundan H_2O_2 de meydana gelebilir (84, 117):



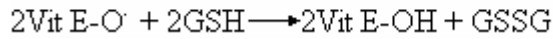
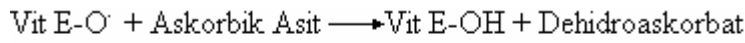
3. Vitamin E (Tokoferol):

Vitamin E, tokoferol biyolojik etkisi taşıyan 8 farklı bileşiğin ortak ismidir. Bunlar α -, β -, γ - ve δ -tokoferol ile α -, β -, γ - ve δ -tokotrienoldür. α -tokoferol biyolojik olarak en yüksek aktiviteye sahiptir. Diğer tokoferoller ve tokotrienoller ise daha az aktiviteye sahip iken gıdalarda daha bol olarak bulunmaktadır. Tokoferoller bir kromonal halka ile bir -fitil kuyruktan oluşur ve birbirlerinden bu kromonal halkada değişik sayı ve pozisyonlarda metil gruplarının bulunması ile ayrılmışlardır. Tokotrienoller yapı olarak α -tokoferollere benzerler; fakat doymamış yapıda bir -fitil kuyruk taşımaktadırlar. Antioksidan etkisi en fazla olanı da α -tokoferoldür. Yapısında bulunan fenolik hidroksil gruplu aromatik halka vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır (15, 87, 97, 117, 153).

En yüksek vitamin E konsantrasyonu, mitokondri ve mikrozoimler gibi membrandan zengin hücre kısımlarında bulunur. Çok güçlü bir antioksidan olan E vitamini, hücre membran fosfolipitlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal etkilerinden koruyan bir savunma elemanıdır. Bir molekül vitamin E, 100 molekül yağ asidinin peroksidasyonunu önleyebilir. Vitamin E; O_2^- , OH^- , singlet O_2 , lipit peroksil radikallerini (LOO^\cdot) ve diğer radikalleri temizler. Lipit peroksil radikallerini yıkarak lipit peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırdığından yağlı fazlar için zincir kırıcı bir antioksidan olarak da bilinir (15, 97, 117, 153):



Sonuçta oluşan stabil özellikteki tokoferoksil radikalinde kromonal halkada fazladan bir elektron vardır ve kendi kendine lipit peroksidasyonu başlatmak için yeterince reaktif değildir. Glukuronik asitle oksidasyona uğrayarak safra yolu ile atılır. E vitamini ve GSH-Px, serbest radikal etkisine karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. GSH-Px, oluşmuş peroksitleri ortadan kaldırırken E vitamini sentezlerini engeller. Ayrıca GSH-Px'in yapısına katılan Se^{+2} 'un organizmadan kaybını önler ve enzimi aktif şekilde tutar. İnsan eritrositlerinin hidrojen peroksit ile *in vitro* ortamdaki hemolizi, E vitamini tarafından önlenir. E vitamini, okside olduktan sonra ve parçalanmadan önce sulu fazlarda askorbik asit ve GSH tarafından yeniden indirgenebilir. Alternatif olarak iki α -tokoferol radikali birleşerek stabil bir dimer oluşturur ya da tamamen okside olarak tokoferol quinon oluşturur (87, 97, 117, 153):



4. Vitamin A (Retinol) ve β -Karoten:

Karotenoidler, izoprenoid karbon iskeletine sahip lipitlerde çözünebilen antioksidanlardır. Membran ve lipoproteinlerde 20 farklı tipi görülse de bunlardan en önemlisi β -karotendir. A vitamininin metabolik ön maddesi olan β -karoten son derece güçlü singlet O_2 temizleyicisi olup; ayrıca düşük oksijen basıncında α -tokoferol gibi hidroksil, peroksil ve alkoksil radikalleriyle de doğrudan reaksiyona girerek, lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonunu kırabilir. Ayrıca karotenoidler A vitamini (retinol) prekürsürüdür. A vitamini, oksijen etkisi ile kolayca oksitlenir. Görme, üreme, büyüme, epitel hücre sağlığında rol oynar (117, 153).

5. Melatonin:

Melatonin, pineal bez tarafından üretilen ana indolamin bileşimidir. Lipofilik olması nedeniyle seruma göre safrada daha çok bulunur; safra kesesi ve ince barsağı oksidatif strese karşı korur. OH[•] radikalini temizleyen ve GSH sentezini uyaran çok güçlü bir antioksidandır. Bunun yanı sıra SOD, GSH-Px ve GR enzimlerinin aktivitelerini de arttırmaktadır. OH[•] ile reaksiyona girdikten sonra bir indolil katyon radikaline dönüşür. Bu radikal de O₂^{-•} radikalini tutarak antioksidan aktivite gösterir. Lipofilik olması nedeniyle hücrenin tüm organellerine ve birçok dokuya rahatça girerek antioksidan etkisini geniş bir alanda kolayca gösterir. Hücre çekirdeğine girebilmesi nedeniyle DNA'yı oksidatif hasara karşı korur. Melatonin çok yüksek dozlarda, uzun süreli kullanımında bile toksik bir etki göstermez ve prooksidan aktiviteye sahip değildir. Yaşlılıkta melatonin de azaldığı için yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı bazı hastalıkların patogeneğinde önemli rolü olabileceği bildirilmiştir. Sonuç olarak, melatoninin klinik açıdan etkili bir antioksidan ve antikanserojen olduğuna inanılmaktadır (9, 109).

6. Ürik Asit:

Pürin metabolizmasının son ürünü olan ürik asit, allantoina dönüşerek normal plazma konsantrasyonlarında lipit radikalleri dışında tüm serbest radikalleri temizler. Özellikle ozon gibi okside edici ajanlara karşı koruyucu etki sağlar. Demir ile stabil reaktif olmayan bileşikler oluşturarak ve C vitaminin oksidasyonunu engelleyici etkisi ile antioksidatif etki gösterir (97, 153).

7. Albümin:

Albümin, yapısında bulunan 17 tiyol grubu aracılığıyla bakır iyonlarını sıkıca bağlar ve bakır bağımlı lipit peroksidasyonu ile OH[•] oluşumunu inhibe eder. Albümine bağlı bakır bazı oksidan oluşumlarda bulunabilirse de, oluşan radikaller biyolojik olarak önemsizdirler. Albümin aynı zamanda yapısındaki sisteinden dolayı etkin bir fagositik HOCl temizleyicisidir; bu özelliği kanda serbest yağ asitlerini taşıması açısından önemlidir. Albumine bağlı bilirübinin antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir. Özellikle yenidoğanlarda diğer zincir kırıcı antioksidanların olmaması nedeniyle hayati rolü vardır (85, 97, 153).

8. Sistein:

O₂^{-•} ve OH[•] radikallerinin temizleyicisidir (8, 97).

9. Bilirubin:

“Hem” katabolizmasının sonucunda oluşan safra pigmenti bilirubin, lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği ve OH[·] ve H₂O₂ radikallerinin temizleyicisi olduğu bilinmektedir (85, 97).

10. Seruloplazmin:

Plazmada major bakır içeren proteindir. Seruloplazmin, ferro-oksidad aktivitesi ile Fe⁺²'yi Fe⁺³'e okside eder. Böylece Fenton reaksiyonunu ve serbest radikal oluşumunu inhibe eder. Demir ve bakır bağımlı lipit peroksidasyonunu önleyici etki gösterir. Aynı zamanda bir akut faz reaktanıdır ve yangısal hadiselerde seviyesi artar (85, 97, 153).

11. Ferritin, Transferrin ve Laktoferrin:

Ferritin dokulardaki, transferrin dolaşımdaki, laktoferrin lökositlerdeki serbest demiri bağlar ve serbest radikal oluşumunu önler (85, 97, 153).

12. Haptoglobin ve Hemopeksin:

Hemoglobin, gerek dekompozisyonla ortama demir vererek; gerekse doğrudan peroksitlerle etkileşerek lipit peroksidasyonunu uyarabilir. Haptoglobin hemoglobini, hemopeksin “Hem”i bağlayarak, bu demir bileşiklerinin lipit peroksidasyonunu uyarmasını engeller (85, 97).

13. Mannitol:

OH[·] radikalini temizleyici etki gösterir (85, 97).

14. Oksipurinol:

Allopurinol metaboliti olup, doğrudan OH[·] ve HOCl radikallerini azaltıcı etki gösterir (85, 97).

15. Probukol:

Kan kolesterolünü düşürmede kullanılan bir ilaç olup, güçlü antioksidan özelliği vardır. Lipit peroksidasyon zincirini kırıcı özellik taşır (85, 97).

16. Desferroksamin (DFO):

DFO, Fe⁺³'ü bağlar ve oluşan bu bileşikteki demirin indirgenmesi son derece zordur. Bu sayede demir serbest radikal oluşumuna katılamaz (2, 85).

17. Lipoik Asit:

Lipit peroksidasyonunu önler. OH[·] ve singlet O₂ toplayıcısıdır. H₂O₂'yi indirger. Vitamin E tüketimine karşı koruyucudur (85, 97).

18. Flavonoidler:

Çay, şarap ile birçok meyve ve sebze de bulunan flavonoidler polifenolik antioksidanlardır. 4000'den fazla çeşidi bulunan flavonoidler; flavonoller (quersetin, kaimferol), flavanoller (kateşinler), flavonlar (apigenin) ve izoflavonlara (genistein) ayrılmışlardır. Epidemiyolojik çalışmalar flavonoid alımının koroner kalp rahatsızlıkları gibi çeşitli kronik hastalıkların insidensini azalttığını göstermiştir. Farklı mekanizmalarla lipit peroksidasyonunu engellerler (85, 97, 153).

3.4. SÜLFÜR İÇEREN BİLEŞİKLER ve ANTIOKSIDAN ETKİLERİ

Sülfür, 32.064 atom ağırlığında ve 16 atom numarasına sahip bir elementtir. Antoine Lavoiser, 1777'de bu metal olmayan elementi keşfetmiştir. Sülfür doğal olarak veya element halinde; demirle birlikte, saf ya da sülfid mineralleri halindedir. Katı sülfür sarı renkte, kokusuz, tatsız ve suda çözünmez özelliktedir (101).

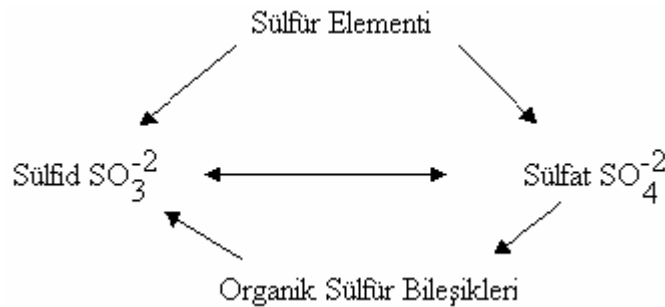
Sülfürün vücuttaki döngüsü şekil 5 ve 6'da görülmektedir. İnorganik maddeler ya da amino asitlerle alınan sülfür idrarda sülfat olarak atılmaktadır (101). Birçok literatür bu elementin diyetdeki ana kaynağının sülfür içeren amino asitler (SİA) olduğu görüşünde birleşmektedirler. Bunlar metiyonin, sistein ve taurindir. Araştırmacılar sülfürün biyolojik sistemlerdeki rolünü araştırmak için vücuda sülfür alımını diyetdeki protein üzerinden kontrol etmişlerdir. Etik nedenlerden dolayı birçok çalışma hayvanlar üzerinde yapılmıştır. En iyi bilinen yararlı sülfür bileşikleri sarımsak ve soğandaki izotiyosiyanatlar, diallil sülfat ve allisindir. İnsanlarda sülfür araştırmaları; SİA'lar, düşük molekül ağırlıklı tiyol bileşikleri ve redoks tepkimelerindeki disülfidler üzerine yoğunlaşmıştır (5, 101).

Organizmada sülfür, tiyol gruplarının bir parçası olarak asetat gibi moleküllerin aktivasyonu için gerekli tiyoester bağlarını oluşturur. Sülfür atomları süksinat dehidrojenaz ve NADH dehidrojenaz gibi demir içeren flavoenzimler için de önemlidir. Ayrıca, sistein içindeki sülfür atomları; stabilize proteinlerin oluşumunu ana kovalent bağlar ve iki sistein molekülü arasındaki disülfid köprüleri ile sağlar (5). Sülfür; ilaçların, steroidlerin ve ksenobiyotiklerin biyokimyasal reaksiyonlarında da gerekmektedir (5, 101).

Tiyol terimi sülfür içeren bileşikleri ifade eder. Plazma tiyolleri, fizyolojik olaylar üzerine prooksidan veya antioksidan etkilere sahiptir; ama genel olarak antioksidan olarak kabul edilirler. Radyasyonun DNA hasarına radikal ara ürünleri ile yol açmasından dolayı; net pozitif yüklü tiyoller, DNA çevresinde yoğunlaşarak ve tiyil serbest radikallerini tutarak radyasyona karşı DNA'yı korurlar (5, 101).

Tiyollerin anti veya prooksidan fonksiyon göstereceği oksidan stres, fizyolojik koşullar ve SİA'ların konsantrasyon düzeyi tarafından belirlenir. Plazma tiyolleri arasında en çok sistein bulunur, homosistein ve GSH onu takip eder. Bu tiyollerdeki -SH grubunun oksidatif strese karşı koruyucu öneminin olduğuna inanılır. Plazmadaki albuminin antioksidan rolü 34.sistein rezidüsü tarafından kuvvetlendirilir. Tiyoller Cu^{+2} veya Fe^{+3} 'ü, direk olarak radikalleri tutabilen Cu^{+1} ve Fe^{+2} 'ye kendileri disülfite okside olarak indirgeyebilir. Bu indirgenmiş metal iyonları bir süperoksitle reaksiyona girerek tekrar yükseltgenebilir. SOD, süperoksidi H_2O_2 'ye dönüştürür. Kısaca, bu reaksiyonlar süperoksit, H_2O_2 ve hidroksil radikalleri gibi ROS'ları üretir. Tiyol bileşikleri ile indüklenen prooksidan etkiler, böbrek iskemisi, karaciğer yetmezliği ile kalp-damar ve serebrovasküler dokuların hastalıklarında bildirilmiştir (36, 150).

Sülfür içeren bileşikler tüm vücut hücrelerinde bulunurlar ve hayat için zorunludurlar. Tedavi amaçlı kullanımları için birçok medikal durum bulunmaktadır. Diyetle SİA'ların veya proteinlerin verilmesi vejetaryen atletler, AIDS'li hastalar ve çocuklarda SİA'ların yokluğu riskinin artmış olmasından dolayı zorunludur. Ayrıca, sülfür içeren antioksidan bileşikler; iskemi-reperfüzyon, diyabet, katarakt oluşumu, nörodejenerasyon ve radyasyon maruziyeti gibi oksidatif stres modellerinde de yararlıdır (5, 101). Sülfür, cilt bozukluklarından aknenin tedavisindeki merhemlerin, kepek şampuanlarının ve akut olarak radyoaktif maddelere maruz kalanlarda kullanılan antidotların hazırlanmasında uzun yıllardır kullanılmaktadır. Sülfür, keratinden geçerek yara iyileşmesine yardım eder. Halk tarafından ürtikerin tedavisinde tarih boyu kullanılmıştır. Sülfür topikal olarak kullanıldığında hidrojen sülfid oluşturarak keratinositlerle reaksiyona girer. Deride hiperkeratoz, akantozis gibi histolojik değişikliklere ve damarlarda genişlemeye yol açar (134).



Şekil 5. Sülfür döngüsü (101).

Bilim dünyasının en çok ilgilendiği sülfür bileşikleri; metiyonin, sistein, sistin, taurin, homosistein, sistatyon, S-adenozilmetiyonin (SAM), N-asetilsistein

(NAC), ketometiltiyobütirat, metantiyol, tiamin, biyotin, α -lipoik asit (LA), koenzim A, glutasyon (GSH), kondroitin sülfat, glukozamin sülfat, fibrinojen, heparin, metallotiyonin, inorganik sülfat, α -merkaptopropiyonilglisin (MPG) ve sarımsak yağındaki organosülfür antioksidan bileşikler olan diallilsülfid (DAS), diallildisülfid (DADS) ile dialliltrisülfittir (DATS). Vitamin olan tiamin ve biyotin dışındaki diğer bileşikler ana bileşik olan metiyoninden sentezlenir (5, 101).

3.4.1. Sülfür Kaynakları:

İnsanlar ve tek mideli hayvanlardan farklı olarak, bitkiler inorganik sülfürü kullanarak metiyonin ve sistein gibi sülfür içeren amino asitleri sentezleyebilirler. Bundan dolayı bitkiler; insanlar ve birçok hayvan türü için en önemli sülfür kaynaklarıdır. Metiyonin, sistein ve taurin gibi sülfür içeren amino asitler hayvani ve tahıl proteinlerinde baklagil proteinlerine göre daha fazla bulunmaktadır. Metilsülfonilmetan, insan diyetinin diğer bir sülfür kaynağıdır ve sülfür döngüsünde yer alan uçucu bir bileşiktir. Sülfür, ana sütünde en çok bulunan makromoleküller arasında altıncı (kolostrumda normalden üç kat daha fazla); toplam vücut ağırlığında yer alan makromoleküller arasında ise üçüncü sırada yer almaktadır (5, 101). Sistein içeren bir tripeptit olan GSH, diyet sülfürünün bir diğer kaynağıdır. Meyveler ve sebzeler diyet GSH'sının % 50'den fazlasını sağlarken; etten % 25'ten daha azı sağlanmaktadır (5, 26, 101). Birçok çalışmada serbest sülfür ile sülföester gibi bileşik halindeki sülfürün alımı karşılaştırılmıştır. Bununla beraber glutasyon, taurin, NAC ve inorganik sülfatın diyetle alımı, gerekli metiyonin ve sistein alımında tasarruf sağlamaktadır. Bunu keşfetmek için araştırmacılar, SİA ve sülfat vermeyerek hayvanları beslemişlerdir. Sülfür bileşikleri daha sonra verilmiş ve ağırlık artışı ya da nitrojen atılımı gözlenmiştir. Sisteinsiz diyetlerle beslenen hayvanlarda sülfür bileşiklerinin ağırlık kaybını geri çevirdiği görülmüştür. Ayrıca radyoaktif olarak işaretli sülfürün metiyonin haricinde yine vücuttaki sisteinde de, diyetle veya enjeksiyonla verilmesiyle yer aldığı tespit edilmiştir. Böylece sülfatın, taurin ve GSH gibi bileşiklerin prekürsörleri olan sisteine sokulabileceği sonucuna varılmıştır. Diyetle yer alan ve endojen olarak SİA'lardan gelen sülfat, kartilaj matriksinin sentezinde de kullanılır (7, 26). İnsanlardaki sülfat havuzu hayvanlara göre daha küçüktür ve diyetle proteinin az alımı ve ilaçların sülfatla metabolize edilmesi ile tükenebilir (7).

FDA, günlük SİA alımının en az 13 mg/kg olmasını tavsiye etmiştir. 70 kg'lık bir yetişkin için bu yaklaşık olarak günlük 910 mg'dır. Diğer uzmanlar ise

bunun yetersiz olacağını ve bir yetişkinin en az günde 25 mg/kg SİA alması gerektiğini belirtmişlerdir (5, 7, 101).

Hayvansal protein, yüksek net yararlanma faktörüne (NYF) sahiptir ve genelde birçok bitkisel proteinden ağırlık olarak daha fazla protein içerir. Böylece yaşamsal amino asitlerin bir gram bitkisel proteinden alımı hayvansal proteine göre daha zordur. Bu sebeple, hayvani ürünler içermeyen (vejetaryen) diyetler düşük SİA alımına yol açar. Bu ise diyetteki toplam protein oranının çok düşük olmasından, sindirilebilirliğinin azlığından ya da SİA miktarının yetersizliğinden kaynaklanır. Protein alımının günlük ortalama 64 g ve her gram içerisinde de en az 16 mg SİA olması önerilmektedir (7). Her bitkide SİA miktarı düşük değildir. Yenilebilen bitkilerden mısır, ay çekirdeği, yulaf, ceviz, badem ve susam sırasıyla metiyonin bakımından zengindir. Yulaf ve mısır aynı zamanda sistein bakımından da zengindir. Mısır, lizin bakımından fakirdir fakat; tavuk eti gramında yaklaşık 41 mg protein (NYF yüksek) içerirken; şaşırtıcı bir şekilde mısır da gram başına yaklaşık 44 mg protein (NYF düşük) içerir (7, 101). Tablo 1’de yetişkinler ve çocuklar için gereken SİA miktarları gösterilmiştir:

Tablo 1. Yaş düzeylerine göre SİA ihtiyaçları (7).

SİA	3–4 aylık bebek	2 yaşında çocuk	10–12 yaş çocuk	Yetişkin
Met + sistein	58 (mg/kg/Gün)	27 (mg/kg/Gün)	22 (mg/kg/Gün)	13 (mg/kg/Gün)

3.4.1.1. Glutasyon (redükte = GSH; okside = GSSG):

Glutasyon; glutamilsisteinilglisin şeklinde bir tripeptittir ve endojen non-protein tiyoldür. Diyet içinde bulunan GSH, ince bağırsaktan kısmen emilir ve *de novo* olarak sentezlenebilir; yani GSH ekzojen ve endojen bir antioksidandır. GSH’nın oksidasyonla GSH-radikaline (GS[•]) dönüşmesi nedeniyle bir prooksidan olmasına rağmen, GS[•] diğer bir GS[•] ile reaksiyona girerek okside-GSH (GSSG) oluşturabilir ve daha sonra GSH’ya NADPH-bağımlı bir GSH redüktaz ile indirgenebilir. GSSG, proteinlerdeki tiyol rezidülerinin tiyol-değişim reaksiyonlarını etkileyerek karışık disülfitlerin oluşumuna yol açar ve hücreSEL GSH havuzu GSSG’den tekrar oluşturulabilir (36, 153).

GSH’nın vücutta ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ile ROS ve serbest radikallerin antioksidasyonu, hücre büyümesi ve immun sistemdeki etkileri gibi önemli fonksiyonları vardır. GSH, ksenobiyotiklerin ve ROS’un detoksifikasyonunu katalizleyen GSH transferazların ve peroksidazların bir substratıdır. Oksijen

radikalleri patolojisinde glutasyon havuzu anahtar bir role sahiptir. Hücredeki ana antioksidanı olan GSH'nın tükenmesi, hücrelerin oksidatif strese karşı duyarlılığını artırır. Lipooksijenaz ve monoamin oksidaz aktiviteli peroksitler, GSH'nın tükendiği hücrelerin ölümünde oksidatif stres oluşturmuşlardır. GSH, peroksinitritleri okside GSH (GSSG) oluşumu ile temizler. GSH redüktaz sistemi, düsilfit kaynaklı peroksinitritleri yeniden oluşturur; fakat izole protein tiyollerini ile reaksiyona giren H₂O₂ ve peroksinitrit kaynaklı sülfür oksidasyonu fazla görülmez (36, 143).

Dokulardaki GSH seviyeleri sadece sentez enzimlerinden değil; aynı zamanda SİA sağlanması ve metabolizmadan da etkilenir. SİA'lar sisteinin, sistein katabolizması ile GSH sentezi arasında akışını belirler. GSH prekürsörleri sistein, N-asetilsistein, glutasyon monoetil ester ve okzotiyazolidinkarboksilatıdır. Sistein veya SİA'ların verilmesi GSH'yı eski düzeyine getirmede en etkili metottur (69).

GSH, hücrel redoks homeostazisinde önemli rol oynayan glutaredoksin ve tiyoredoksin (tiyol proteinler) ile ilişkilidir. GSH, NO ile nitrozotiyol forma indirgenir ve plazmada NO'nun taşınmasını sağlayarak, NO'ya ait biyolojik yarı ömrü artırır. Ayrıca, GSH vitamin C ve E üzerine indirgeyici bir ajan olarak koruyucu etki sağlar. GSH-bağımlı dehidroaskorbat redüktaz okside dehidroaskorbattan GSH'yı bir elektron vericisi olarak kullanarak askorbat oluşturur (36, 101).

İmmun hücrelerde GSH ve sisteinini içeren ve belirli bir aralıktaki tiyol bileşikleri en etkili şekilde fonksiyon gösterir. GSH buradaki etkisini antioksidan olarak göstermez. GSH, *in vivo* sitotoksik T hücrelerinin aktivasyonunu artırır (5, 36).

Genç bireylerde yapılan araştırmalar düşük GSH alımının yaşlanmayı hızlandırdığını göstermiştir. Bundan dolayı insanların yaşlanmayı geciktirmek için GSH almaları yararlıdır. GSH ile beslenme ve oksidatif stres arasında bir ilişki vardır (5, 69).

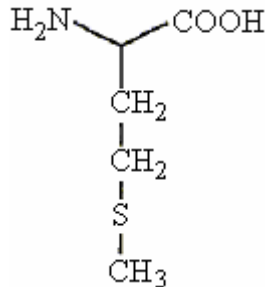
3.4.1.2. Sistein:

Sisteinin ekstraselüler indirgeyici bir ajan, protein sentezinde kritik bir substrat ve GSH ile taurinin miktarını ayarlama bir prekürsör olmak gibi önemli görevleri vardır. Transsülfürasyon yolunda; homosistein, serin ile kondanse olarak piridoksal-5-fosfat içeren sistatyonin β -sentaz enzimi ile geri dönüşümsüz olarak katalizlenerek sistatyonine dönüşür. Sistatyonin, piridoksal-5-fosfat içeren γ -sistatyonaz adlı ikinci bir enzimle sistein ve α -ketobütirata hidrolizlenir. Fazla sistein taurine

Sistein, ağız yoluyla GSH'yı arttırmak, eser elementlerle şelat oluşturup; bu eser elementlerin emilimini azaltmak amacı ile gut hastalığında kullanılır. Sistein çabuk nemlendiği ve okside olduğu için yerine daha stabil ve daha fazla absorbe olan NAC kullanımı önerilmektedir. Oral olarak alınan sistein karaciğer bakır deposunu azalttığından ratlar inorganik bakır ile beslenmelidir. Aşırı miktarda alınan bakır ise SİA'ların kullanımını bozar ve diyetdeki ihtiyaçlarını artırır. Kobalt ve selenyum zehirlenmeleri ağızdan sistein verilmesi ile düzeltilebilir (5, 8, 68).

3.4.1.3. Metiyonin:

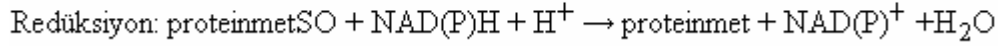
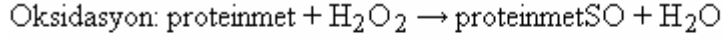
Metiyonin, SİA'lardandır ve vücudun ana sülfür kaynaklarından biridir. İnsanlar için metiyonin inorganik sülfürden sentezlenemediği için gıdalarla birlikte alınması zorunlu olan esansiyel bir amino asittir. Protein sentezinde metiyonin önemli bir metil vericisidir (5, 101). Proteinlerin rezidülerindeki oksidatif modifikasyonlar oksidazlar, ozon, H₂O₂, süperoksit, metal katalizli oksidasyon ve flavin ile ksenobiyotiklerin otooksidasyonu gibi çeşitli fizyolojik ve ekzojen sistemlerden kaynaklanır. Metiyonin rezidüleri endojen antioksidan olarak davranabilir. Bir protein içindeki metiyonin rezidüleri oksidasyona karşı duyarlılığı önler. Duyarlılık genellikle rezidülerin yüzeysel maruziyeti ile orantılıdır. Metiyonin rezidülerinin yüzeysel oksidasyonu sonucunda molekülün biyolojik fonksiyonu çoğunlukla korunurken, bu metiyonin okside ajanları yakalaması ile başarılmaktadır. H₂O₂'ye maruz kalan interferonun iki rezidüsünün ya da doku plazminojen aktivatörünün biyolojik aktivitesini kaybetmeden üç metiyonin rezidüsünün okside olduğu gösterilmiştir (5, 80, 129).



Şekil 7. Metiyoninin yapısı.

Proteinlerin tüm oksidatif modifikasyonlarında redüktazlar tarafından sadece sistein ve metiyonin rezidülerinin okside formları onarılabılır. Biyolojik sistemlerdeki dinamik dengenin devamlılığı, özellikle de metiyonin rezidüsünün oksidasyon ve redüksiyon dengesi, proteinlerin regülasyonunda önemlidir. Proteine bağlı veya serbest amino asit formunda okside metiyonin rezidüleri, metiyonin

sülfoksit redüktaz ile kolayca tekrar metiyonine indirgenir. Metiyonin rezidüleri oksidatif stres altında proteinleri oksidasyondan korumak için *son şans* antioksidan savunma sistemi olarak davranırlar (5, 78, 80, 129). Metiyonin rezidülerinin şematik siklik oksidasyon ve redüksiyon eşitliği aşağıda gösterilmiştir:



Homosistein ise protein olmayan SİA olup, metilasyon ve transsülfürasyon metabolik yollarının kesişme noktasındadır. Gıdalarla alınan homosisteinin kullanılması iki yolla düzenlenir. Gıda ile birlikte fazla miktarda metiyonin insana verildiğinde homosistein siklusu bazal seviyelere iner. Metiyonin metaboliti olan S-adenozilmetiyonin (SAM), homosistein moleküllerinin kaderinde belirleyicidir. Diyete bağlı olarak değişen hücre içi metiyonin konsantrasyonu metiyonin adenozil transferaz enzimlerinin aktivitesine bağlı olarak SAM sentezinin oranını etkiler (101, 137).

Metiyonin metabolizması folat ile düzenlenir. SAM'in karaciğerdeki üretiminde metiyonin, adenozil transferazın bir substratı; endojen metiyonin üretiminde ise metiyonin sentaz için vitamin B₁₂ kofaktör ve metiltetrahidrofolat ile homosistein de birer substrattır. Homosisteinden GSH oluşumunun altüst olduğu alkolik karaciğer hastalarında SAM, metiyonin siklik yollarını düzenler. Metiyonin, alkolün hasar yapıcı etkilerinin azaltılmasında etkilidir ve Parkinson hastalığı ve akut pankreatitin tedavisinde kullanılabilir. Metiyonin gibi SAM de sülfür gerektiren birçok metabolik olayda yer alır. Etanolla verilen SAM, babun maymunlarında GSH düzeylerinin azalmasını önlemiş ve mitokondrial enzimleri normale çevirmiştir. GSH prekürsörü olarak SAM verilmesinin, insanlarda etanol alımından sonra etanol ve asetaldehit klerensini arttırdığı ve SAM'in bu etkisinin hücrede GSH sentezini arttırmasına bağlı olduğu bildirilmiştir. Metiyoninin SAM prekürsörü olarak, 1500-9000 mg/gün (homosisteinin yükselmemesi için B₁₂ vitamini veya folat ile birlikte) kullanılabilir (101).

3.4.1.4. Taurin:

Protein olmayan bir SİA olan taurin vücutta en çok bulunan serbest amino asittir ve birçok biyolojik olayda önemli rol oynar. Diyetten kolayca alınabilir ve *in vivo* metiyonin ve sistein metabolizmasından elde edilir (5, 101). Taurin yeni doğanlar için esansiyel bir amino asittir ve alımı anne sütü ile olmaktadır. Taurinin metabolik etkileri arasında safra asidi konjugasyonu, detoksifikasyon, membran

stabilizasyonu ve hücre kalsiyum düzeylerinin düzenlenmesi bulunur (5, 52, 53, 62). Ayrıca taurin; nörotransmitter, ozmoregülatör, antikonvülzan, hücre koruyucusu ve tüm vücut dokularında antioksidan etkiye sahiptir (5, 62). Polimorf nükleer fagositler ve retinadaki yangı öncesi hücrelerde taurin yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Retina ve diğer membrandan zengin dokularda milimolar düzeyde bulunan taurin, hipokloröz ve süperoksidi temizleyerek, oksidatif stresi engeller (5, 101). Taurin kısmi olarak ROS'u temizler ve oksidan hasar sonucu oluşan membran permeabilitesini önler; fakat kurşunla şelat oluşturamaz (5, 52, 62).

Diyetlerinde taurin verilen ratlarda okside balık yağının uyardığı oksidatif strese bağlı artmış plazma AST, ALP ve ALT enzimatik aktivitesinin ve karaciğerde TBARS oluşumununun azaldığı ve GSH seviyesinin yükseldiği bildirilmiştir (5). Yine deneysel diabetik nöropatide diyetle taurin verilmesi, oksidatif stresi azaltmış; taurinin bu etkisinin ise vitamin C antioksidan savunma sistemi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (5, 101). Perkloroetilen ile oluşan lipit peroksidasyonu sonucu GSH seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir. Taurin ve vitamin E verilmesi ise GSH, GSH-Px, SOD ve katalaz seviyelerini arttırmış ve serbest radikallerin hücre hasarını azaltmıştır (5).

Klorotaurin (taurin kloramin), nötrofil ve makrofajlardaki solunum patlaması sırasında H_2O_2 'den myeloperoksidaz katalizi ile oluşan hipokloröz asitle, taurinin direk reaksiyonundan meydana gelen bir türevidir. Bu esnada taurin vücutta oluşan zararlı bir oksidan olan hipokloröz asidi temizlemektedir. Klorotaurinin tümör nekroz faktör (TNF) ve makrofajlardaki NO seviyelerini transkripsiyonel ve translasyonel değişiklikler ile azalttığı; ayrıca sülfosetaldehide dönüşerek süperoksit üretimini inhibe ettiği ve polimorf nükleer fagositlerle stimüle edilen yangısal yanıtı da katıldığı bildirilmiştir (5, 21).

3.4.1.5. Merkaptopropiyonilglisin (MPG):

Lipoik asit ile glisinin peptid bağı ile bağlanması sonucu oluşan MPG, -SH grubu taşıdığı için hücre içi boşlukta ve reperfüze kalpteki mitokondrilerde oluşan serbest radikalleri temizleyebilmektedir. MPG ayrıca, kasılma disfonksiyonu ile uyarılan iskemi-reperfüzyonuna karşı kalbi koruyucu etkilidir. Düşük ve toksik olmayan konsantrasyonlarda akciğerdeki iskemi-reperfüzyon hasarı ile ilgili doku tiyol, çözünebilir protein ve lipitlerin oksidasyonunu önemli derecede inhibe etmektedir. Akciğer dokusundaki oksidatif hasar -SH gruplarını azaltır ve iskemiyi neden olur. MPG verilmesi iskemik akciğerlerde normal sülfidril seviyesini devam

ettirir. Karaciğerde MPG ile detoksifikasyon yüksek redoks potansiyelinden kaynaklanır. MPG, güçlü bir süperoksit sentez inhibitörüdür ve normotermik iskemik-reperfüzyonlu karaciğer parankimi üzerine önemli koruyucu etkilidir (5).

3.4.1.6. Sarımsaktaki Organosülfür Bileşikler:

Sarımsak (*Allium sativum* L), binlerce yıldır halkın kullandığı ilaçlardan biridir. Birçok çalışmada sarımsak ve yapısındaki maddelerin tümör önleyici, yaşlanmayı geciktirici, trombosit degradasyonunu önleyici, bakteri ve mantar öldürücü etkilerinden dolayı antioksidan olduğu belirtilmiştir (5, 13, 107, 146).

Sarımsağın en önemli biyokimyasal özelliği antioksidan özellikte bileşikler içermesidir. Bu bileşikler SOD, katalaz, GSH-Px gibi hücrelerdeki antioksidan seviyelerini arttırmakta ve reaktif oksijen türlerini temizlemektedir (5, 13, 107, 146). Birçok çalışma sarımsağın allisin, S-allilsistein, diallilsülfid (DAS), diallildisülfid (DADS) ve dialliltrisülfid (DATS) gibi birçok antioksidan bileşik içerdiğini göstermiştir (5, 107). Allisin, DADS ve DATS'in stabilitesi HPLC ile analiz edilmiş ve DADS'in sarımsaktaki sülfür içeren bileşikler arasında en stabil antioksidan olduğu bulunmuştur. Ayrıca, α -tokoferol ve L-askorbilpalmitat ile sarımsaktaki allisin, DADS ve DATS'in antioksidatif süreçte sinerjistik etkisi incelenmiş ve DADS en iyi sinerjistik etkiyi göstermiştir (5, 13, 107, 146).

Sarımsak yağının organosülfür antioksidan bileşikleri arasında DAS, DADS ve DATS ana komponentlerdir. Bu bileşikler arasında yapı-fonksiyon karşılaştırması bakımından GSH-ilişkili antioksidan enzimlerin indüksiyonunda DATS, DADS, DAS sırasıyla etkili bulunmuştur. Yüksek enzim aktiviteleri ile ROS oluşumu ve birikimini önleyerek oksidatif hasara karşı etkili koruma sağlamıştır. Bu bileşiklerin etkileri yapılarındaki sülfür atomları ile ilişkilidir. GSH ilişkili antioksidan enzimler üzerine modülatör aktivitelerini sülfür atomlarının sayısı belirler. Bir organosülfid molekülündeki sülfür atomlarının ve allil gruplarının sayısı organ spesifitesinin ve kimyasal koruyucu gücün belirlenmesinde önemlidir. DADS ile DAS arasında yapılan karşılaştırmada bir monosülfid içeren DAS'a göre disülfid ve allil grubu içeren DADS'in benzo(a)piren ile indüklenmiş ön mide neoplazmasının önlenmesinde daha etkili olduğu bildirilmiştir (5, 13, 107, 146).

3.5. Kurşunun Hücresel Antioksidan Enzim Sistemlerine Etkileri:

Kurşuna maruz bırakılmış ratlarda ve insanlarda ALAD, G6PD, GSH, GSH-Px, katalaz ve SOD gibi bazı antioksidanların değişimleri üzerine birçok çalışma yapılmıştır (20, 34, 52, 62). Kurşun zehirlenmesinin biyokimyasal basamaklarının

bilinmesi kurşunun hücrelerin antioksidan komponentlerine etki ederek, prooksidan/oksidan oranında bozulma ile oksidatif hasar oluşturduğunu düşündürmektedir. Çünkü kurşun, civa ve kadmiyum gibi metaller; amino asitlerin az stabil yan zincirlerine, merkaptit, sülfidril gruplarına ve sisteinin -SH grubuna yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Kurşun, birçok enzimin -SH grubuna bağlanarak onları inhibe etmektedir (34, 52, 62). Hem sentezinde yer alan ALAD, bunlardan en çok bilinen enzimdir (20, 52, 62). Bir diğeri ise glukoz-6-fosfatı NADPH üzerinden okside ederek 6-fosfoglukonata dönüştüren ve pentoz fosfat yolunun ilk basamak enzimi glukoz-6-fosfat dehidrojenazdır (G6PD). G6PD, hücrenin mitokondri dışı reaksiyonlarının en önemli NADPH kaynağıdır. Bu NADPH, glutatyon disülfiti (GSSG) GSH'ya indirgeyen GR tarafından kullanılır. G6PD, eritrositler için önemlidir. Çünkü bu hücrelerde mitokondri bulunmamaktadır (34, 52, 62). Bazı *in vitro* denemelerde kurşunun G6PD'yi inhibe ettiği bildirilmiştir. Kurşun-sülfidril bileşiklerinin oluşarak bu etkinin ortaya çıkması muhtemeldir (34, 52). Lanchant ve ark. (74), kurşunla inkübe etmeden önce G6PD'nin aktivitesini, GSH ve merkaptotanol gibi bazı tiyol bileşikleri ile ortadan kaldırarak, kurşunun -SH ve GSH ile etkileşimlerini incelemişlerdir. G6PD için, glukoz-6-fosfat ve NADP ile kurşunun kinetik çalışmaları sonucunda nonkompetitif inhibisyon ile yarıştıklarını ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar, pentoz fosfat yolunun inhibisyonunun kurşunla oluşan oksidatif hasara karşı eritrositleri daha da hassaslaştırdığı sonucuna varmışlardır. Fakat *in vivo* çalışmalar kurşunun G6PD üzerine etkilerinin daha karmaşık olduğunu göstermiştir. Vücuttaki pentoz fosfat yolu kritik NADPH düzeyini sağlamak için yüksek depo kapasitesine sahiptir. NADP/NADPH oranının düzenlenmesinde oksidatif stres şartlarında durum okside form lehinedir. Bu şartlar altında normalde fosforile glukozun pentoz fosfat yoluna girmesi % 11 iken; oran % 92'ya kadar çıkabilmektedir (34, 52, 74). Kurşuna maruz kalmış rat, hayvan ve insanlardaki eritrositlerde G6PD'nin artmasıyla ilgili yukarıdaki uyum mekanizması son çalışmalarla gösterilmiştir (52). Fakat Calderon-Salinas ve ark. (16), aksine G6PD seviyesinin düştüğünü; Rogers ve ark. (112) ise kurşuna maruz kalmayı takiben eritrositlerdeki G6PD aktivitesinin değişmediğini göstermiştir. Özetle G6PD seviyesi; kurşuna maruziyet, alınan konsantrasyon, maruz kalma süresi ve oksidatif stresin hücrelerin içine ulaşmasına göre artmakta veya azalmaktadır (52).

GSH, -SH gruplarına sahip sistein içeren bir tripeptittir. Buna göre GSH hücreleri oksidatif strese karşı korumada hayati bir rol oynar. Bunu ya -SH grupları

sayesinde ROS ile ilişkiye girerek enzimatik olmayan antioksidan etkiyle ya da ROS'un detoksifikasyonunda koenzim veya kofaktör olarak enzimatik yolla gerçekleştirir (34, 52, 101). Metalleri bağlayacak bir amino grubu, bir sülfidril grubu, iki adet peptit bağı ile karboksilik asit grupları taşımaktadır. Kurşun, -SH grubuna bağlanarak, GSH'nın antioksidan aktivitesini ve seviyesini düşürmektedir. Antioksidan sistemin bir üyesi olan GR ise GSSG'yi GSH'ya dönüştürerek indirek etki yapar. Kurşun, bu enzimin aktif bölgesinde bulunan disülfite direk olarak bağlanarak inhibisyonuna sebep olmaktadır. Bu inhibisyon ise GSH/GSSG oranını düşürerek, hücreleri oksidatif hasara karşı daha duyarlı kılmaktadır (34, 52).

Diğer yandan; GSH-Px, katalaz ve SOD ise metalloproteinler olup, antioksidan etkilerini sırasıyla peroksitler, H₂O₂ ve O₂^{•-}'yi enzimatik olarak detoksifiye ederek gösterirler. Buraya kadar anlatılan enzimler aktiviteleri için eser elementlere ihtiyaç göstermekte; bu da kurşun toksisitesi için onların duyarlılıklarını arttırmaktadır (34, 52).

GSH-Px, selenyuma kofaktör olarak ihtiyaç duyar ve hücrelerin oksidatif hasara karşı savunmasını artırır. Selenyum ile kurşun arasında bir antagonizma vardır ve azalan selenyum alımı GSH-Px aktivitesini de düşürmektedir. Selenyumun kurşuna maruz kalma öncesi enjeksiyonu ile SOD, GR aktivitesi ve GSH miktarını arttırarak kurşuna karşı ratları koruduğu gösterilmiştir. Bu yararlı etkilerin, selenyum ile kurşunun protein, biyoligant ve aktif bölgelere yarışmalı olarak geri dönüşümlü bağlanmaları veya inaktif selenyum-kurşun bileşiğinin oluşması ile gösterildiği düşünülmektedir (62, 98).

Prostetik grup olarak Hem taşıyan katalaz da antioksidan etkiye sahip diğer bir enzimdir. Kurşunun gastrointestinal sistemden demir emilimini engellediği ve Hem sentezini inhibe ettiği; böylece katalaz aktivitesini düşürdüğü bildirilmiştir (52).

SOD ise dismutasyon reaksiyonlarını katalizleyerek, hücreleri O₂^{•-}'nin toksik etkilerinden korur. Enzimin aktivitesi için bakır ve çinko gerekir. Çinko iyonlarının oksidasyon ve redüksiyon olaylarında enzimin stabilitesini sağlayarak etkili olduğu düşünülmektedir (40, 85). Kurşuna maruz kalan ratlarla yapılan birçok çalışmada eritrosit-SOD aktivitesinin düştüğüne işaret edilmiştir (34, 52). Mylorie ve ark. (94), hayvanların kanında SOD ile bakır seviyelerinin yüksek korelasyonla düştüğünü; normal kan bakır konsantrasyonlarında yükselmiş kurşunun SOD'u etkilemediğini ve diyetle bakır verilmesinin SOD'un aktivitesinde kurşuna bağlı düşmeyi engellediğini göstermişlerdir. Böylece, kurşunla artan bakır yetersizliğine bağlı *in vivo* olarak

kurşunun SOD üzerine indirek inhibitör bir etkisinin olduğunu ileri sürmüşlerdir (94). *In vitro* ise kurşunun, SOD aktivitesini ROS bileşiklerini temizlemesini düşürerek oksidatif hasara yol açtığı bildirilmiştir (34, 52). Çeşitli enzimler üzerine kurşunun bu inhibitör etkileri sonucu antioksidan sistemin zarar görmesiyle hücreler oksidatif saldırılara açık hale gelmektedir (34, 52, 62).

3.6. Kurşun Zehirlenmesinin Tedavisinde Antioksidanların Kullanımı

Kurşun zehirlenmesinde kullanılan antioksidanlar kurşunun bağlandığı bileşiklerde onun yerine bağlanarak, dokulardan kurşunu uzaklaştırırlar ya da vücutta endojen olarak kurşunun oluşturduğu oksidatif hasara karşı koyarlar. Kurşunun oluşturduğu oksidatif stresin azaltılmasında antioksidanlar tek başlarına ya da şelatör maddelerle birlikte kullanılabilirler (34, 52, 62).

3.6.1. Kurşunla Oluşturulmuş Oksidatif Streste Antioksidanların Koruyucu Etkisi:

Kurşuna maruz kalan dokularda ROS oluşumu artmakta ve hücredeki antioksidan mekanizmalarının tüketilmesi ile prooksidan/antioksidan denge bozulmaktadır. Hücredeki kritik moleküllerin oksidatif hasara uğraması ile doku zedelenmesi oluşmaktadır. Oksidatif stresin kurşun zehirlenmesi ile olduğu hallerde, uzun süreli tedavide hücrelerin antioksidan kapasitesinin artırılması yoluna gidilebilir. Şelasyonla kan ve doku kurşun seviyelerinin düşürülmesi yerine; kurşunun kritik moleküllerle etkileşiminin dışarıdan antioksidanlar verilerek azaltılması tercih edilebilir ya da iki yöntem birlikte kullanılabilir. Kurşuna bağlı oksidatif streste, antioksidanların tek başlarına veya şelatör maddelerle birlikte kullanılması üzerine pratikte uygulamalar yoktur. Hayvanlarda kurşun zehirlenmesinde koruyucu ve tedavi edici olarak bazı moleküller çalışılmıştır. Bu ajanların kurşunun toksik etkilerini azalttığı bulunmuş, fakat prooksidan/antioksidan oranını geri çevirmedeki etkileri tam kesinlik kazanmamıştır (52, 62).

3.6.1.1. Vitamin B₆ (Tiamin):

Tandon ve ark. (133), vitamin B₆'nın kurşun intoksikasyonunda etkileri üzerine çalışmışlar; vitamin B₆ ve kurşun verilmesinin ALAD aktivitesi inhibisyonunu ve çinko-protoporfirin seviyesini azalttığını göstermişlerdir. Vitamin B₆ verilen ratlarda kan, böbrek ve karaciğer kurşun seviyelerinin düştüğü; beyin kurşun seviyesinde ise bir azalmanın olmadığı görülmüştür (133). Bu etkileri vitaminin pirimidin halkasındaki nitrojen atomu ile amino grubu ya da tiyazol halkasındaki sülfür atomu ve yan zincirdeki hidroksil grubunun kurşun ile şelat

oluşturması yoluyla veya kurşunun emilimini azaltarak yaptığı ileri sürülmüştür (62, 133). Vitamin B₆ ile yetersiz beslenen ve kurşuna maruz bırakılmış ratlarda kontrole göre GSH düzeyleri daha düşük bulunmuştur (86). Vitamin B₆'nın bu durumu GSH metabolizmasındaki transsülfürasyon yolunda kofaktör olmasıyla açıklanmıştır (52, 86). GSH'nın prekürsörü olan sisteinin çoğu, diyetle alınan metiyoninden sentezlenmektedir. Bundan dolayı vitamin B₆ alımındaki bir eksiklik metiyonine bağımlı sisteinden GSH sentezini önlemektedir. Bu sonuç kurşuna maruz kalan ratlarda vitamin B₆'nın GSH sentezini arttırarak indirek olarak antioksidan bir rol oynadığını ortaya çıkarmıştır (52). Ayrıca tiaminin dokulardan kurşunu ayırıp, atılabilir bileşikler oluşturarak etkisini gösterdiği de düşünülmektedir. CaNa₂EDTA ile birlikte tiamin verilmesi beyinin de arasında bulunduğu dokulardan kurşunun ayrılarak, idrarla daha fazla atılmasına ve kurşunun oluşturduğu biyokimyasal parametrelerde düzelmeye neden olmuştur (62).

3.6.1.2. Çinko:

Çinko ile kurşun *in vivo* olarak aktif bölgelere bağlanmada yarışmaktadır. Deneysel olarak kurşunla birlikte çinko verilmesi, ALAD gibi çinkoya bağımlı enzimlerin aktivitesini geri döndürmekte ve idrarla ALA atılımını da azaltmaktadır. Düşük dozda alındığında kurşun zehirlenmesine karşı koruyucudur ve etkisini gastrointestinal kanaldan kurşun emilimini önleyerek göstermektedir. Ayrıca böbrek ve karaciğerde metalotiyoninleri arttırarak da kurşunun etkilerini azaltmaktadır. Çinkonun ratlarda kurşun zehirlenmesinin tedavisi ve önlenmesinde tek başına ya da metiyonin veya tiamin ile birlikte kullanımının yararlı olduğu gösterilmiştir. Çinko, metiyonin, çinko+metiyonin verilerek yapılan rat çalışmasında GSH'nın prekürsörü olan metiyoninin tek başına ya da çinko ile birlikte karaciğer GSH düzeyini koruduğu tespit edilmiştir (62). Çinkonun antioksidan etkisini; oksidasyona karşı sülfidril gruplarını koruyarak ve geçiş metalleri ile ROS (OH[•] ve O₂^{•-}) oluşumunu önleyerek gösterdiği belirtilmiştir (14).

3.6.1.3. Vitamin E:

Vitamin E, kurşuna karşı koruyucu etkisini okside edici ajanlara karşı direk antioksidan özelliği ile göstermektedir (62). Kurşun, eritrositlerin mekanik kırılabilirliğini (frajilitesini) arttırarak daha deforme olabilir hale getirmekte ve oksidatif strese karşı daha duyarlı kılmaktadır. Kurşuna maruz kalan eritrositlerin filtre edilebilirliği polikarbonat filtreden gözlemlenerek tutularak saptanmıştır. Vitamin E bakımından eksik beslenen ratlarda eritrositlerin filtrasyon süresi vitamin

E ile beslenenlerden daha uzundur. Böylece, vitamin E bakımından eksik beslenen ratlarda eritrositlerin filtrasyon süresi ile lipit peroksidasyonu arasında güçlü bir korelasyon bulunmuştur. Bu sonuçlar insanlarda kurşun maruziyetinde yüksek dozda vitamin E alınmasının eritrositlerin deformite ve oksidatif hasara karşı dayanıklılığını arttıracaklarını göstermiştir (77). Bir başka çalışmada ise, vitamin E'nin koruyucu olarak verilmesinin; kurşuna maruz kaldıktan sonra hayvanların tedavisi esnasında verilmesine nazaran daha etkili olduğu gösterilmiş ve bu durum kurşun emiliminin vitamin E tarafından önlenmesinden kaynaklandığı şeklinde açıklanmıştır (25).

3.6.1.4. Vitamin C (Askorbik asit):

Diğer bir antioksidan molekül olan askorbik asit sulu fazlarda çok hızlı elektron transferi gerçekleştirerek, oksijen radikallerini temizlemektedir. Kurşuna karşı yararlı etkisini ise onunla bileşik oluşturması sayesinde göstermektedir. Hayvanlarda etkili olurken, insanlarda plasebo ile birlikte yapılan çalışmalarda etkili olamamıştır (62). Kurşuna maruz kalmış ratlarda askorbik asidin tek başına veya tiaminle birlikte verilmesi kurşunun idrarla eliminasyonunu arttırmakta, karaciğer ve böbrek kurşun düzeyini azaltmakta ve kan ALAD aktivitesinin inhibisyonunu önlemektedir. Askorbik asidin kurşunla bileşik oluşturabilmesi, bu yararlı etkisini açıklamaktadır (24). Simon ve ark. (121), Amerika'da yapmış oldukları taramada serum askorbik asit düzeyleri ile kurşun düzeyleri arasında ters bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. Kurşunla ilgili çalışma ortamına bağlı tehditte askorbik asidin fazla alınmasının kurşun zehirlenmesini önleyeceği tavsiye edilmiştir (24).

3.6.1.5. Etoksiquin:

Hayvan yemlerinde kullanılan koruyucu bir madde olan etoksiquinin kurşunun sistemik etkilerini ve lipit peroksidasyonunu normale çevirdiği bildirilmiştir. Kurşun toksisitesindeki peroksidatif olayları etoksiquinin güçlü bir şekilde inhibe ederek bunu gerçekleştirdiği ifade edilmiştir (29).

3.6.1.6. Selenyum:

Selenyum, hücrelerin antioksidan savunma sistemlerinde anahtar bir rol alan GSH-Px'in aktivitesinde elzem bir elementtir. Kurşun enjeksiyonu öncesi selenyum verilmesi; serum asit ve alkalın fosfatazlar, transaminazlar (GOT, GPT), total protein, trigliserit ve kolesterol seviyelerinde kurşunun yaptığı değişikliklere karşı koruyucu etki oluşturmuştur (98). Ayrıca oksidatif stres parametreleri ile ilişkili iki hedef organ olan karaciğer ve böbrekte erkek albino ratlara 100 mol/kg dozda kurşun uygulanmasından iki saat sonra 10 mol/kg kas içi sodyum selenit enjeksiyonu

sonrasında analizler yapılmıştır. Selenyumun SOD ile GR aktivitesini ve GSH miktarını arttırarak hücrelerin antioksidan kapasitesini geliştirdiği bulunmuştur. Selenyum bu koruyucu etkisini; inaktif selenyum-kurşun bileşiği oluşturarak, süperoksit radikalının temizlenmesinde görevli SOD'u stimüle ederek ve yeterli miktarda GSH bulunduğu glutasyon redüktazın antioksidan etkisini indirek olarak arttırarak gerçekleştirmektedir (62, 98).

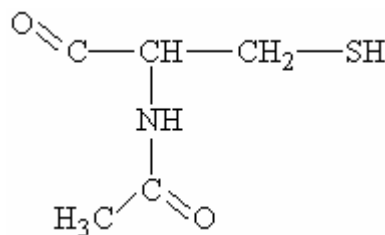
3.6.1.7. S-adenozil-L-metiyonin (SAM):

S-adenozilmetiyonin SİA'lardan metiyoninin bir metaboliti ve önemli bir metil vericisidir. SAM de metiyonin gibi vücudun sülfür gerektiren birçok metabolik yolunda gereklidir. Vücut tüm gerekli SAM'i metiyoninden sentezleyebilir; fakat metilasyondaki bir bozukluk ya da sentezi için gereken metiyonin, kolin veya folatın eksikliği vücudun SAM üretme yeteneğini azaltabilir. SAM, membranların akıcılığını sağlayan membran fosfolipitlerinin sentezindeki transmetilasyon reaksiyonunda metil vericisi olarak ana bir role sahiptir. SAM içeren diğer bir metabolik yol ise molekülden transsülfürasyonla bir metil grubunun ayrılması ile S-adenozil-homosistein oluşmasıdır. Bu bileşik homosisteine ve sonra glutasyonun öncülü olan sisteine dönüşür (5, 39, 101).

GSH'nın prekürsörü olan SAM'in kurşun-etanol verilen ratlardaki yararı Flora ve ark. tarafından araştırılmıştır (39). SAM'in beyin, kan ve karaciğerin kurşun+etanol maruziyeti süresince bazı biyokimyasal parametreleri (kan ALAD, GSH, beyin ve karaciğerdeki lipid peroksidasyonu ölçütleri, GSH miktarı) koruduğu görülmüştür. Bundan dolayı SAM'in, beyin ve karaciğerin kurşun+etanolle indüklenen oksidatif hasarın şelasyon tedavisinde, şelatör ilaçların adjuvantı (çözücüsü) olarak kullanılmasının yararlı olabileceği bildirilmiştir (39).

3.6.1.8. N-asetilsistein (NAC):

N-asetilsistein (NAC), sülfür içeren amino asitlerden sisteinin glutasyona dönüşümünde bir ara üründür (5, 101). Şekil 8'de N-asetilsisteinin yapısı görülmektedir:

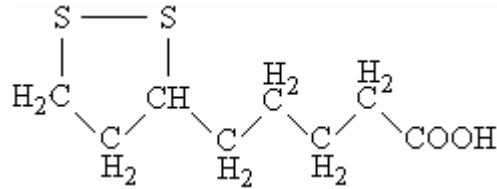


Şekil 8. N-asetilsisteinin yapısı (52).

Endojen olarak sentezlenen NAC da, sistein gibi serbest radikalleri sülfidril grubuyla bağlar. Oral NAC uygulanması, intraselüler sistein ve GSH düzeylerini arttırır. *İn vivo* N-asetilsistein; L-sistein, sistin, L-metiyonin ve glutatyondan oluşmaktadır (5, 101). NAC, yapısındaki tiyol bileşiği taşıyan bir antioksidan olmasından dolayı kurşunun yaptığı oksidatif strese karşı vücudu korumaktadır (52, 62, 125). Ercal ve ark.'nın (33) Çin hamsteri ovaryumunu (ÇHO) kullandıkları *in vitro* bir modelde hücrelerin kurşuna maruz bırakılmasıyla oksidatif hasar meydana getirilmiş; GSH/GSSG oranının azaldığı ve MDA ile katalaz seviyesinin yükseldiği belirlenmiştir. Kurşuna maruz kalan Çin hamsteri ovaryumuna GSH prekürsörü olan NAC verildiğinde oksidatif stresin minimuma indiği bulunmuştur (33). NAC'ın toksisite eşiğinin yüksek ve terapötik penceresinin geniş olması şeklinde iki yan etkisi vardır. Antioksidan etkisi direk ROS ile reaksiyona girmesi veya GSH sentezini uyarmasından kaynaklanmaktadır (49, 52). Bu avantajları sebebiyle kurşun zehirlenmesinin tedavi protokolüne eklenebilir. Antioksidan etkisinin yanı sıra kurşunla beraber verildiğinde ROS oluşumunu azaltır (32, 33, 49). Kurşuna maruz bırakılmış C57BL/6 farelerinin beyin ve karaciğerlerinde oluşan oksidatif stres, NAC kullanımı ile azaltılmıştır. Fakat ağızdan 5.5 mmol/kg olarak haftada bir verildiğinde kan, karaciğer ve beyin kurşun düzeylerini düşürmemiş; böylece oral yolla şelat yapma etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır (32). Gurer ve ark. (49), 5 hafta boyunca içme sularıyla 2000 ppm kurşun asetat verilen ratların kan kurşun düzeylerinin % 27.3 oranında düştüğünü belirlemişlerdir. NAC kuvvetli bir şekilde kurşun şelasyonu yapan succimerin (DMSA-dimetilsülfoksit) kanda kurşun temizleme oranını da oldukça (% 92.8) yükseltmiştir (49). Bu bulgulara göre NAC etkisini, kurşunu hedef dokulardan ayırmadan sadece serbest tiyol grubu sayesinde göstermektedir (32, 33, 52). Bundan dolayı NAC'ın kurşun zehirlenmesi tedavisinde şelat yapıcı ajanların çözücü kısmında kullanılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir (52). NAC'ın kurşun zehirlenmesi oluşturulmuş ratlardaki bir diğer yararlı etkisi ise ALAD'ın inhibisyonu sonucu ÇHO hücrelerinde biriken ALA'nın indüklediği oksidatif hasarı (GSH/GSSG oranını düşürmekte, MDA artmakta ve koloni oluşumu inhibe olmaktadır) geri çevirerek, GSH/GSSG oranını yükseltmesi ve koloni oluşumunun devamını sağlamasıdır. Bu çalışma sonucunda da NAC'ın etkisini direk olarak serbest sülfidril grubuyla oluşturduğu belirtilmiştir (96).

3.6.1.9. α -Lipoik asit (LA) (tiyoktik asit):

Alfa-lipoik asit, mitokondride enerji ile ilgili pirüvat ve α -ketoglutarat dehidrojenaz multienzim komplekslerinde kofaktör olarak rol alır (100, 122). Terapötik olarak serbest radikallerin hücelere vereceği zararların önlenmesinde, antioksidan etkisiyle oksidatif stresin azaltılmasında ve kan şekerinin düşürülmesinde yararlanılmaktadır (62, 100, 101, 122). Antioksidan olarak 20-100 mg/gün şeklinde insanların günlük kullanımına girmiştir (101). Aküöz ve hidrofobik ortamlarda yapılan çalışmalarda alfa-lipoik asidin koenzim Q₁₀ ve intraselüler GSH düzeylerini arttırdığı da görülmüştür. Oral verilmesinden sonra alfa-lipoik asit tamamen absorbe edilmekte ve indirgenerek dihidrolipoik aside (DHHLA) dönüşmektedir (100, 101, 122). Şekil 9'da alfa-lipoik asidin yapısı görülmektedir:



Şekil 9. Alfa-lipoik asidin yapısı (52).

Antioksidan etkisi ile LA, kurşunun bazı toksik etkilerini azaltmaktadır. İndirgenmiş formu olan dihidrolipoik asit (DHHLA) iki adet serbest sülfidril grubu içermektedir (131). LA ve DHHLA'nın ikisi de bazı ROS'ları temizleyebilir; vitamin E, vitamin C, GSH gibi bazı antioksidanları radikal ya da inaktif formundan yeniden oluşturur ve ağır metallerle şelat yapabilir (50, 52, 62, 100, 131). GSH'nın yeniden oluşturulmasında milimolar konsantrasyonlarda NAC gerekirken, LA'nın ise mikromolar düzeyleri yeterlidir. Ayrıca LA kurşunun hedef dokularından biri olan beyne, kan-beyin engelini aşarak geçebilmektedir (52, 62). Kurşunla oksidatif stres oluşturulmuş CHO hücreleri ile birlikte LA'nın inkübasyonu, koloninin canlı kalmasını sağlamış; MDA seviyeleri ile katalaz aktivitesini düşürmüş ve GSH içeriğini arttırmıştır. Aynı çalışmanın *in vivo* kısmında ise 2000 ppm kurşuna içme suları ile 5 hafta maruz bırakılmış ratlarda zehirlenmeyi takiben yapılan bir haftalık 25 mg/kg/gün LA uygulaması; eritrosit, beyin GSH seviyelerini yükseltmiştir. Eritrosit, beyin, böbrek MDA seviyelerini azaltmış; katalaz ve G6PD'yı ise normal değerlerine döndürmüştür (50). Bu ve benzer çalışmalarda kan, beyin ve böbrek kurşun düzeylerinde bir değişiklik tespit edilmediği için LA'nın kurşunla herhangi bir şelat yapma etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Bundan dolayı LA'nın kurşuna

karşı etkisini hedef hücrelerden ayırarak değil; bünyesindeki tiyol grubu nedeniyle var olan antioksidan kapasitesi ile gösterdiği ifade edilmiştir (50, 62).

3.6.1.10. Kaptopril:

Anjiotensin-dönüştürücü enzim inhibitörü olan kaptoprilin antihipertansif etkisinin yanısıra, antioksidan etkisi de vardır. Kaptoprilin yapısında bulunan terminal sülfidril grubunun ROS'ları temizlemedeki etkisi gösterilmiştir (51, 52, 138). Bu tiyol grubu muhtemelen ağır metallerle şelat oluşturmakta ve böylece itrahlarnı arttırmaktadır (51, 52). Bu özelliklerinden dolayı kaptoprilin kurşun zehirlenmesinde kullanılabilceği düşünölmüştür. Gürer ve ark.'nın (51) yapmış olduğu çalışmada kurşunla oluşturulmuş oksidatif stres altındaki ratların beyin, karaciğer ve böbreklerdeki GSH/GSSG oranı yükselmiş, MDA düzeyi hafif azalmış; katalaz aktivitesi etkilenmemiştir. Bu ratlara 1 hafta boyunca 10 µg/gün kaptopril verilmesinin kan kurşun düzeylerinin azaltması, kurşun zehirlenmesinin tedavisinde şelat yapıcı bir ajan olarak kullanılabilceğini göstermiştir. Kurşunla artan hipertansiyon ise endotelyum kaynaklı nitrik oksidin inaktivasyonunu arttırmasından ve ROS oluşturmasından kaynaklanabilir. Ding ve ark. (27), hipertansiyonun kurşunun oluşturduğu hidroksil radikallerinin endotelial disfonksiyona sebep vermesiyle oluştuğunu bildirmiştir. Sonuç olarak kaptoprilden kurşun zehirlenmesinde antihipertansif, şelat yapıcı ve muhtemel antioksidan etkileri nedeniyle yararlanılabilir (52).

3.6.1.11. Taurin:

Taurin, yapısındaki serbest sülfidril grubu ile ROS temizlenmesinde direk etkili ve oksidatif hasardan kaynaklanan membran permeabilitesinin önlenmesinde ise indirek etkili bir antioksidandır (53, 62). Taurin kurşunla indüklenen oksidatif hasar üzerine olan etkilerini lipit peroksidasyonunu azaltarak göstermektedir. İçme sularına 5 hafta boyunca 2000 ppm kurşun verilerek oluşturulan oksidatif hasar sonrası, ratlara bir hafta 1.1 g/kg/gün taurin verilmesi GSH miktarını arttırmakta; kurşunla artmış katalaz, G6PD aktiviteleri ile MDA seviyelerini ise düşürmekte ve CHO hücrelerinin yaşam süresini uzatmaktadır (53). Taurinin kan, beyin, karaciğer ile böbrek kurşun düzeylerini düşürmediği ve etkisini şelasyon ile değil de antioksidan etkisiyle gösterdiği bildirilmiştir. İnsanlar üzerine toksik etkisi bulunmamasından dolayı şelat yapıcı maddelerin (özellikle DMSA) enjeksiyon emülsiyonlarında çözücü kısım olarak kullanılabilir (53, 62).

3.7. Kurşunla Oluşturulmuş Oksidatif Strese Karşı Antioksidanların Koruyucu ve Tedavi Edici Etkisi:

Kurşuna maruz kalan dokularda, kurşunun ROS oluşumunu arttırması ve hücrelerin antioksidan mekanizmalarını tüketmesi ile prooksidan/antioksidan oranında bozulma oluşmaktadır. Böylece dokuların komponentlerinin oksidatif hasara uğraması ile doku zedelenmesi oluşmaktadır. Kurşun zehirlenmesinin tedavisinde kullanılan şelatör maddeler kurşunu, bağlandığı dokularda onun yerine bağlanarak uzaklaştırırlar. Oksidatif stresin kurşun zehirlenmesi ile oluştuğu hallerin uzun süreli tedavisinde hücrelerin antioksidan kapasitesinin arttırılması yoluna gidilebilir. Şelasyonla kan ve doku kurşun seviyelerinin azaltılması yerine; kurşunun kritik moleküllerle etkileşiminin dışarıdan antioksidanlar verilerek kesilmesine başvurulabilir. Kurşunla oksidatif stresin önlenmesinde antioksidanların tek başına veya şelatör maddeler ile birlikte kullanılması üzerine pratikte uygulamalar yoktur. Antioksidan etkili bazı moleküllerin koruyucu ve tedavi edici olarak, tek başlarına ya da şelatör maddelerle birlikte kullanılması üzerine hayvanlarda deneysel çalışmalar yapılmıştır (52, 62). Fakat bu maddelerin güvenliği ve etkilerinin incelenmesi için birçok çalışma yapılmalıdır.

Bu çalışmada oral yol ile kurşun asetat verilen ratlarda oksidatif stres oluşturulması ve kurşun asetat ile birlikte kükürt içeren L-metiyonin, α -lipoik asit, N-asetilsistein ve L- homosistein bileşiklerinin verilmesiyle oluşan oksidatif stresin ne kadar önlenebildiği ve antioksidan sisteme olan katkılarının incelenmesi amaçlanmıştır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma kapsamına dâhil edilen ağırlıkları 150-200 gram arasında değişen 60 adet Wistar-Albino cinsi erkek rat, Fırat Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Biriminden (FÜTDAM) temin edilmiştir. Ratlar aynı üniteye 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ve sıcaklık (20-22 °C) kontrolü olan odalarda; 6 hafta boyunca standart rat yemi ile beslenmiştir. Ratlara verilecek olan Pb-asetat (MA: 379.3 g) ve N-asetilsistein (MA: 163.19 g) Merck firmasından (Merck Chemical Co., Darmstadt, Germany); α -lipoik asit (MA: 206.3 g), metiyonin (MA: 149.21 g) ve homosistein (MA: 135.2 g) ise Sigma firmasından (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) temin edilmiştir. Denekler rastgele 6 gruba ayrılarak, çalışma grupları oluşturulmuştur. İlk hafta tüm gruplara hiçbir işlem yapılmadan ortama alışmaları sağlanmıştır. Grup I (n=10) kontrol grubu olup, bu gruba son 5 hafta boyunca sadece standart yem ve içme suyu verilmiştir. Grup II'ye (n=10) son 5 hafta boyunca standart yem ve 2000 ppm Pb-asetat içeren su verilmiştir. Grup III'e (n=10) son 5 hafta boyunca standart yem ve 2000 ppm Pb-asetat ve 100 mg/kg/gün olacak şekilde L-metiyonin içeren su verilmiştir. Grup IV'e (n=8) son 5 hafta boyunca standart yem ve 2000 ppm Pb-asetat içeren su ve 25 mg/kg/gün olacak şekilde α -lipoik asit (1:1 oranında etanol: serum fizyolojik karışımında çözülmüş olarak) periton içi verilmiştir. Deney bitimine yakın on rattan ikisi enjeksiyona bağlı peritonitten ölmüş ve bu grupta denek sayısı 8 adet kalmıştır. Grup V'e (n=10) son 5 hafta boyunca standart yem ve 2000 ppm Pb-asetat ve 800 mg/kg/gün olacak şekilde N-asetilsistein içeren su verilmiştir. Grup VI'ya (n=10) son 5 hafta boyunca standart yem ve 2000 ppm Pb-asetat ve 50 mg/kg/gün olacak şekilde L-homosistein içeren su verilmiştir.

Deneysel uygulamadan sonra bütün gruplardaki ratlardan dekapitasyon ile kanlar alınarak; kurşun içermeyen antikoagülsüz tüpler (6 ml) ile EDTA'lı (2 ml) ve heparinli tüplere (0,5 ml) konulmuştur. Daha sonra ratların çalışmada kullanılacak olan karaciğer, böbrek ve beyin dokuları çıkarılarak; serum fizyolojikle yıkanıp, alüminyum folyolara sarıldı. Serum, hemolizat ve plazmalar hazırlandı. Doku ve kan örnekleri derin dondurucuda -20 °C'de çalışma gününe kadar muhafaza edilmiştir.

4.1. Hemogloblin Ölçümü

Kontrol ve deney gruplarına ait tam kanda hemogloblin miktarları Drabkin ayırıcı kullanılarak siyanomethemogloblin yöntemi ile ölçüldü (76). Bu yöntemde ferrisiyanür, hemogloblindeki demiri oksitleyerek iki değerden üç değerli demire

çevirir ve methemoglobine dönüşmesini sağlar. Bunu takiben potasyum siyanid ile kararlı bir pigment olan siyanmethemoglobin meydana gelir ve absorbanı spektrofotometrede (TECHCOMP 8500, Çin) 546 nm’de okunur.

Ayrıçlar:

1. Drabkin ayrıçı: 50 mg KCN, 200 mg K₃Fe(CN)₆, 1.000 gr NaHCO₃ alınarak, az miktarda distile su ile çözüldükten sonra bir litreye tamamlanır.

2. Hemoglobin Standardı: Sigma-Aldrich 18 gr liyofilize hemoglobin standardı 100 ml distile suda çözüldü. Bu standart 18 gr/dl hemoglobin içermektedir.

İşlem:

	Kör	Standart	Örnek
Drabkin ayrıçı (ml)	5.0	5.0	5.0
Hemoglobin Std (µL)	---	20	---
Hemolizat (µL)	---	---	20

Tüpler iyice karıştırıldı ve oda ısısında 20 dakika bekletildikten sonra 546 nm’de spektrofotometrede (TECHCOMP 8500, Çin) ölçüldü (76).

Hesaplama:

$$\text{gr /dl Hemoglobin} = \frac{\text{Örnek Absorbansı}}{\text{Std Absorbansı}} \times 18$$

4.2. Serum Lipit Peroksit Düzeylerinin Ölçümü

Serum lipit peroksit düzeylerinin MDA olarak ölçümü, Satoh (116) ve Yagi’den (144) modifiye edilen bir yöntemle spektrofotometrik olarak gerçekleştirildi. Bu yöntemin prensibi, pH’nın 3.4 olduğu oksijenli bir ortamda serumun tiyobarbitürik asit (TBA) ile 95 ° C’de inkübasyonu sonucu oluşan ürünün renginin 532 nm’de ölçülmesidir. Oluşan renkli bileşik, lipit peroksidin sekonder ürünü olan MDA’ya aittir.

Ayrıçlar:

1. % 10’luk fosfotungustik asit (FTA).
2. 0.083 N Sülfürik asit (H₂SO₄).
3. Tiyobarbitürik asit (TBA) ayrıçı: Eşit hacim % 0.67 TBA ile glasiyel asetik asit karıştırılarak hazırlanır.
4. N-Bütanol.
5. 4.1 nmol/ml standart (1,1,3,4 tetrametoksiopropan) çözeltisi.

Deneyin yapılışı:

	Kör	Standart	Örnek
Serum veya plazma (ml)	-	-	0.3
0.083 N H ₂ SO ₄ (ml)	-	-	2.4
% 10 FTA (ml)	-	-	0.3

Tüpler iyice karıştırıldı ve oda ısısında 5 dakika bekletildikten sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra çökelek üzerine 1.5 ml distile su eklenerek iyice karıştırıldı ve tekrar 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant tekrar atıldı ve presipitat (çökelek) deneyin bundan sonraki aşamasında kullanıldı.

Saf su (ml)	4.0	3.0	4.0
TBA ayracı (ml)	1.0	1.0	1.0
Standart (4.1nmol/L) (ml)	-	1.0	-

Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra üzerine cam bilye konularak kaynar su banyosunda 60 dakika kaynatıldı. Bu süre sonunda ani soğutma yapıldı ve bütün tüplere 3.0 ml n-bütanol eklendi ve iyice karıştırıldıktan sonra tüpler 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra örnek ve standardın n-bütanol fazı 532 nm'de köre karşı spektrofotometrede (TECHCOMP 8500, Çin) okundu.

Hesaplama:

Serum MDA (nmol/ml) = 4.1 x [Örnek absorbansı/Standart absorbansı] x (1/0.3 ml)

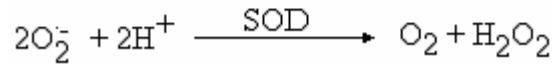
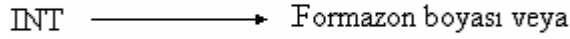
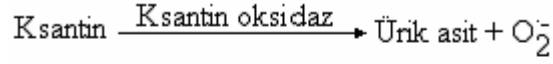
4.3. Enzimatik Antioksidanların Ölçümü

Eritrosit SOD ve GSH-Px aktivitelerinin ölçümü: Randox firmasına ait ticari kitler (Randox Laboratories, Diamond Road, Crumlin, Co. Antrim, United Kingdom, BT29 4QY) kullanılarak her iki enzimin ölçümü yapıldı.

4.3.1. SOD Enzim Aktivitesi Ölçümü

Oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan süperoksit radikalleri dismutasyona uğratarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürülür. Bu yöntemde, ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak oluşturulan süperoksit (O₂⁻) radikallerinin 2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenol]-5-feniltetrazolium klorür (p-iyodonitrozolium violet: INT) ile oluşturduğu kırmızı renkli formazon boyasının 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin okunması esas alınmaktadır. Örnekte bulunan SOD, süperoksit radikalini ortamdan uzaklaştırarak formazon reaksiyonunu inhibe

etmektedir. Sonuçta oluşan kırmızı renkteki azalmanın tespiti ile SOD aktivitesi ölçülmektedir. Kırmızı rengin şiddeti ile SOD aktivitesinin büyüklüğü arasında ters bir ilişki mevcuttur.



Örneğin hazırlanması

EDTA'lı kan örnekleri kullanıldı. Örneğin 0.5 ml'si 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra plazmaları ayrıldı. Kalan eritrositler her defasında 3 ml % 0.9'luk NaCl solüsyonu ile 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek dört kez yıkandı. Yıkamış eritrosit paketi soğuk saf su ile 2 ml'ye tamamlandıktan sonra karıştırıldı ve -20 ° C'de saklandı. Lizatlar çalışma öncesinde derin dondurucudan çıkartıldı ve oda ısısında çözünmeye bırakıldı (15-20 dakika). Daha sonra örneklerin % inhibisyonunu % 30 - % 60 arasına düşürmek için, 0.01 mmol/L fosfat tamponu (pH'sı 7.0) ile lizat 25 kat sulandırıldı ve hesaplamalarda sulandırma faktörü 100 olarak alındı.

Ayırıcıların hazırlanması:

1. Karma (mixed) substrat: Bir şişe substrat 1, tampon 2'nin 20 ml'si ile sulandırılarak hazırlanır ve 10 gün içinde kullanılmalıdır.
2. Tampon kullanım için hazırdır. 2-8 ° C'de saklandığında son kullanma tarihine kadar kararlılığını korur.
3. Ksantin oksidaz: Bir şişe ksantin oksidaz 3, 10 ml saf su ile sulandırılarak hazırlanır. 2-8 ° C'de saklandığında kararlılığını 2 hafta süresince korur.
4. Standart: Bir şişe standart 4, 10 ml saf su ile sulandırılarak hazırlanır. Bu standardın bundan sonraki sulandırmaları sulandırma ayıracı 5 ile yapılır, ev değerlendirme eğrisi bu son konsantrasyonlara göre hazırlanır.
5. Fosfat tamponu: Na₂HPO₄ (0.01 mol/L) ve KH₂PO₄ (0.01mol/L)'den pH'sı 7.0 olan 0.01 mol/L'lik tampon hazırlandı. Bu tampon aynı zamanda standart 1 olarak da kullanılır.

Standartların hazırlanması:

	Standart solüsyonu hacmi	Örnek sulandırıcı hacmi	Konsantrasyon
S6	Sulandırma yapılmamış standart	-	5.4
S5	5 ml of S6	5 ml	2.7
S4	5 ml of S5	5 ml	1.35
S3	5 ml of S4	5 ml	0.675
S2	3 ml of S3	6 ml	0.225
S1	0.01 mol/L fosfat tamponu	-	-

Sulandırılması yapılmış bütün standartlar 2-4 ° C'de 2 hafta saklanabilir.

Çalışma Prosedürü

	Çalışma körü	Standart (2-6)	Örnek
Örnek (ml)	-	-	0.05
Standart (ml)	-	0.05	-
Fosfat tamponu (S1) (ml)	0.05	-	-
Karma substrat (ml)	1.7	1.7	1.7
Bütün tüpler iyice karıştırılır.			
Ksantin oksidaz (ml)	0.25	0.25	0.25

Bütün tüpler tekrar karıştırıldıktan 30 saniye sonra çalışma körünün, standardın ve örneğin 37 ° C ve 505 nm'deki absorbansları (A1) havaya karşı alınır. Aynı anda kronometre çalıştırılır ve 3 dakika sonra son absorbansları alınır (A2).

Hesaplama:

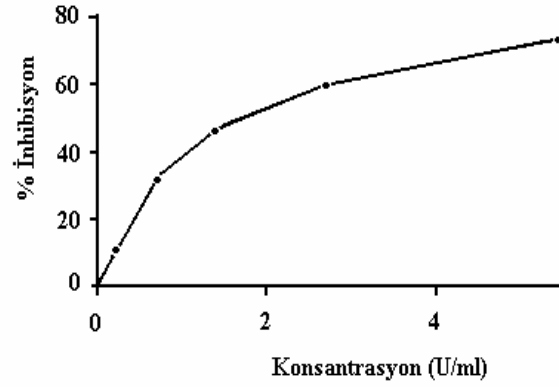
$$A/\text{dakika} = \frac{A_2 - A_1}{3 \text{ dakika}}$$

$$\text{Standartlar için \% inhibisyon} = 100 - \frac{\Delta A_{\text{Std./dakika}}}{\Delta A_{\text{Çalışma körü/dakika}}} \times 100$$

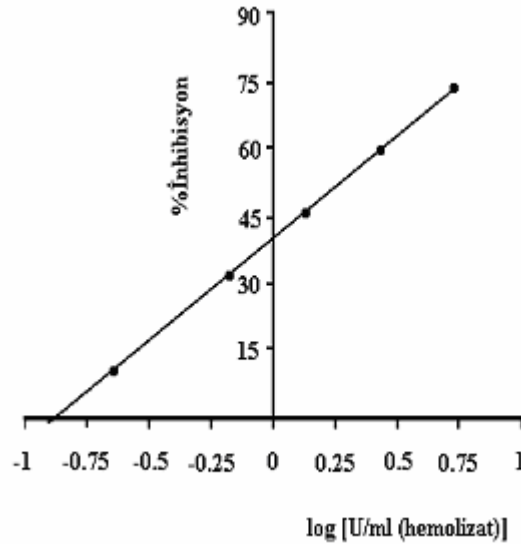
$$\text{Örnekler için \% inhibisyon} = 100 - \frac{\Delta A_{\text{Örnek/dakika}}}{\Delta A_{\text{Çalışma körü/dakika}}} \times 100$$

Çalışma körüne ait değer inhibisyona uğramamış olarak kabul edilir ve değeri % 100 olarak alınır. Tüm standartlar ve örnekler için % inhibisyon değeri yukarıdaki formüle göre hesaplanır.

Standart hazırlama tablosunda verilen tüm standart konsantrasyonlarına göre çalışma yapılarak, her standart için bulunan % inhibisyon değeri Y eksenine ve standart konsantrasyonlarının değerleri (U/ml) de X eksenine yerleştirilerek hiperbolik bir eğri elde edilir (Şekil 10). Standart hazırlama tablosunda verilen tüm standart konsantrasyonlarına göre çalışma yapılarak, her standart için bulunan % inhibisyon değeri Y eksenine ve standart konsantrasyonlarının logaritmik dönüşüm değerleri de X eksenine yerleştirilerek standart eğri grafiği çizilir (Şekil 11). Böylece değerlendirilmelerde bu doğru grafiği kullanılır.



Şekil 10. SOD için standartlara ait % inhibisyon-konsantrasyon eğrisi.

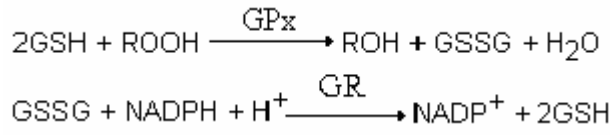


Şekil 11. SOD için standartlara ait % inhibisyon-log [konsantrasyon] eğrisi.

Örneklere ait % inhibisyon değerlerine karşılık gelen lizat SOD aktivitelerinin logaritmik değerlerinin antilogaritmaları alınarak eritrositlere ait SOD aktivitesi bulunarak dilüsyon faktörü ile çarpılır. U/ml olarak bulunan bu son değer örneğe ait hemoglobin değerine oranlanır ve U/grHb cinsinden enzim aktivitesi bulunur.

4.3.2. GSH-Px Enzim Aktivitesi Ölçümü

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), kümen peroksit (ROOH) varlığında indirgenmiş glutasyonun (GSH) yükseltgenmiş glutatyona (GSSG) dönüşmesini katalizler. Kümen peroksidin bulunduğu ortamda oluşan GSSG, glutasyon redüktaz (GR) ve NADPH yardımıyla GSH'ya indirgenir. GSH-Px aktivitesi, NADPH'ın NADP⁺'ye yükseltgenmesi sırasında absorbans farkının 340 nm'de okunması ile ölçülür.



Örneğin Hazırlanması:

GSH-Px ölçümü için heparinize tam kan kullanıldı ve diğer peroksidazların sebep olacağı yüksek sonuçların elde edilmemesi için, heparinize tam kan örneğine çift güçlü Drabkin ayırıcı ilave edildi. Bunun için 0.05 ml tam kan örneği 1.0 ml seyreltici solüsyon ile seyreltilerek GSH-Px indirgenmiş formda tutulur. Seyreltici ilavesinden 5 dakika sonra 1.0 ml çift güçlü Drabkin ayırıcı ilave edilir ve iyice karıştırıldıktan sonra ölçümler yapılır. Örneklere Drabkin ilavesinden sonra 20 dakika içinde tüm ölçümler yapılmış olmalıdır. GSH-Px aktivitelerinin ölçümleri Randox firmasına ait Ransel ticari kiti ile otoanalizörde (OLYMPUS AU 600, ABD) uyarlama ayarları gerçekleştirilerek yapıldı.

Ayıraçlar:

1. Çift güçlü Drabkin ayırıcı: Aşağıdaki kimyasal maddeler 1000 ml saf suda çözülür.

- A. Sodyum bikarbonat : 2 gram.
- B. Potasyum ferrisiyanid : 0.4 gram.
- C. Potasyum siyanid : 0.104 gram.

2. Glutasyon peroksidaz kitinin ayıraçlarının hazırlanması:

İçerik	Konsantrasyon
1. Ayıraç	Glutasyon 4 mmol/l, Glutasyon redüktaz \geq 0.5 U/l, NADPH 0.34 mmol/l
2. Tampon	Fosfat tamponu 0.05 mol/l ve pH 7.2, EDTA 4.3 mmol/l
3. Kumen hidroperoksid	0.18 mmol/l
4. Seyreltici solüsyon	

RANSEL Glutasyon Peroksidaz'ın OLYMPUS AU 600 cihazına uyarlanması

TEST NUMBER			*
TEST NAME			Ransel
SAMPLE TYPE			Whole blood
SAMPLE VOLUME		µL	5
DILUENT VOLUME		µL	10
REAGENT VOLUME (R1)		µL	200
DILUENT VOLUME		µL	10
REAGENT VOLUME (R2)		µL	50
DILUENT VOLUME		µL	0
WAVELENGTH MAIN		nm	340
WAVELENGTH SUB		nm	380
METHOD			Rate
REACTION			-
POINT 1	FIRST		15
	LAST		21
POINT 2	FIRST		-
	LAST		-
LINERITY	FIRST		-
	SEC		-
NO LAG TIME			NO
MINIMUM OD	L		0.2
MAXIMUM OD	H		2.0
REAGENT O.D. LIMIT	FIRST	L	0.7
		H	2.0
	LAST	L	0.7
		H	2.0
DYNAMIC RANGE	L		0
	H		840
CORRELATION FACTOR	A		1.0
	B		0.0
ON BOARD STABILITY PERIOD			1
CALIBRATION			
CALIBRATION TYPE			MB
FORMULA			1
COUNT			3
PROCESS			CONC
1 POINT CALIBRATION POINT			-
MB TYPE FACTOR			10784
CALIBRATOR STABILITY PERIOD			-

Ayıracıların hazırlanması:

1. Bir şişe ayıraç 1: 10 ml tampon 2 de çözülür ve bu son ayıraç oda ısısında 8 saat, 2–8 ° C’de ise 48 saat kararlılığını koruyabilir.
2. Tampon: Kullanıma hazır durumda olup, 2–8 ° C’de saklanırsa son kullanma tarihine kadar bozulmadan kalabilir.
3. Kumen hidroperoksid: 10 µl kumen hidroperoksid 52 ml saf suya ilave edilir. Kumen zor çözüldüğünden uzun süre ve güçlü bir şekilde karıştırılmalıdır. Bu çalışma ayıracı taze olarak hazırlanıp kullanılmalıdır. Ancak konsantr kumen hidroperoksid 2–8 ° C’de son kullanma tarihine kadar saklanabilir.
4. Seyreltici ayıraç: Bir şişe ayıraç 4, 200 ml saf su ile seyreltilir ve oda ısısında 3 gün, 2–8 ° C’de ise 4 hafta saklanabilir.

4.4. Vitamin A ve E Tayini

Deney ve kontrol gruplarının EDTA’lı tüplere alınan kanlarından ayrılan plazmalar analiz edilinceye kadar -20 ° C’de saklandı. Bu çalışma parametreleri için hazır ticari kitler kullanıldı. Vitamin A ve E düzeyleri, Recipe marka (Recipe Chemical and Instruments GmbH, Munich, Germany) ticari kitleri kullanılarak, SHIMADZU AVP 10 marka yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile tespit edildi. HPLC’de UV dedektörü kullanıldı ve 325 nm’de 3 dakika sonra 295 nm’de ölçüm yapıldı. Kolon sıcaklığı 30 ° C olarak ayarlandı ve bu vitaminler için ticari kitin özel C18 kolonu kullanıldı. Bu çalışmada flow rate 1.5 ml/min, injection volume 20 µL ve run time 8 dakika alınarak ölçüm yapıldı.

4.5. Total Antioksidan Kapasitelerinin Ölçümü

Karaciğer, böbrek ve beyin dokuları dekapitasyondan sonra çıkarılıp, soğuk serum fizyolojik ile yıkandı ve alüminyum folyolara sarıldı. 1/5 oranında (0.5 mg doku / 2 ml tampon çözeltisi) 140 mM soğuk fosfat tamponu (pH 7.4) kullanılarak, homojenatlar hazırlandıktan sonra örnekler analiz işlemine kadar -20 ° C’de saklandı. Dokulardaki total antioksidan kapasitelerinin ölçümü Erel’in modifiye ettiği 2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat (ABTS⁺) kolorimetrik tayin metodu ile gerçekleştirildi. Metotta renksiz redükte ABTS bileşiği okside edilerek mavi-yeşil renkli ABTS⁺ bileşiği radikal olarak kullanılmaktadır. ABTS⁺, okside olabilen herhangi bir madde ile karıştırıldığında, renksiz ABTS’ye tekrar redükte olmakta ve diğer yandan reaksiyona giren madde ise okside olmaktadır. Bu özellik ABTS kullanan metotların temel prensibidir. Bu metotta ABTS⁺ ile birlikte tek başına hidrojen peroksit kullanılmıştır (35).

Kimyasallar:

2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS), hidrojen peroksit, sodyum sitrat Sigma ve Merck'ten sağlandı. Suda çözünebilir vitamin E analogu (Troloks; 6-hidroksi-2, 5, 7, 8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) Sigma-Aldrich Chemical Company'den alındı. Tüm kimyasallar oldukça saftı ve Tip-I reaktif-ölçütünde deiyonize su kullanıldı.

Cihazlar: Isı kontrollü kuvvet taşıyıcısına sahip Cecil 3000 spektrofometre ve Abbott marka aeroset otoanalizör kullanıldı.

Ölçüm:

Ölçümler Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında gerçekleştirildi.

Redükte ABTS molekülü asidik ortamda (asetat tamponu 30 mmol/L, pH 3.6) tek başına hidrojen peroksit kullanılarak okside $ABTS^{\cdot+}$ ye çevrilir. Asetat tampon çözeltisinde konsantre (koyu yeşil) $ABTS^+$ molekülleri uzun süre stabil kalır. Yüksek pH değerli konsantre asetate tamponu (0.4 mmol/L, pH 5.8) ile çözüldüğünde, renk kendiliğinden ve yavaş bir şekilde beyazlaşır. Örnekte bulunan antioksidanlar kısmi konsantrasyonlarına göre bu beyazlaşmayı hızlandırır. Bu reaksiyon spektrofotometre ile izlenebilir ve beyazlanma oranı örneğin içerdiği total antioksidan kapasitesi ile ters orantılıdır. Reaksiyon oranı total antioksidan kapasitesi ölçüm metotlarında yaygın bir standart olarak kullanılan Troloks ile kalibre edilir. Troloks fosfat tamponunda (30 mmol/L, pH 7.4) çözdürülür. Ölçüm sonuçları mmol.troloks.Eq/ mg.protein olarak bulunur.

Ölçüm Reaktifleri:**Reaktif I:**

pH 5.8 olan 0.4 mol/L'lik asetate tampon çözeltisi hazırlamak için 32.8 gr CH_3COONa alınarak 1000 ml deiyonize suda çözülür (son konsantrasyon; 0.4 mol/L). Reaktif-ölçütü glasiyel asetik asit (22.8 ml), 100 ml deiyonize suda çözülür (son konsantrasyon; 0.4 mol/L). Sodyum asetat çözeltisi (940 ml) alınarak, 60 ml asetik asit çözeltisi ile pH metre kontrolünde tampon çözeltisi hazırlanır ve 4 ° C'de en az 6 ay stabil kalır.

Reaktif II:

pH 3.6 olan 30 mmol/L'lik asetate tampon çözeltisi için 2.46 gr CH_3COONa alınarak 1000 ml deiyonize suda çözülür (son konsantrasyon; 30 mmol/L). Sodyum asetat çözeltisi (75 ml) alınarak 925 ml asetik asit çözeltisi ile pH metre kontrolünde

tampon hazırlanır. Daha sonra 278 µl ticari H₂O₂ çözeltisi (% 35, Merck) 1000 ml tampon çözeltisi ile sulandırılır (son konsantrasyon; 2 mmol/L). 0.549 gr ABTS 100 ml hazır çözeltisi ile çözülür (son konsantrasyon; 10 mmol/L). 1 saat oda ısısında inkübasyondan sonra karakteristik ABTS⁺ rengi ortaya çıkar. Renkli reaktif 4 ° C’de en az 6 ay stabil kalır.

Otoanalizörde Ölçüm:

Elle spektrofometrenin optimizasyonundan sonra, metot otoanalizöre uygulanır. Ölçüm formatı aşağıdaki tabloda gösterilmiştir:

Reaktif 1 volüm	200 µl (Reaktif I: asetat tamponu 0.4 mol/L pH 5.8)
Örnek volüm	5 µL (Doku homojenatları)
Reaktif 2 volüm	20 µL (Reaktif II: asetat tamponunda ABTS ⁺ 30 mmol/L pH 3.6)
Dalgaboyu	660 nm
Okuma noktası	İlk absorbans RI ile RII karıştırmadan önce ve son absorbans inkübasyondan sonra (karıştırmadan 5 dk sonra)
Kalibrasyon tipi	Lineer

4.6. Dokularda Protein Tayini

Dokularda protein ölçümü Lowry yöntemi (79) ile gerçekleştirildi. Ölçümler Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında yapıldı. İlk basamakta Cu⁺²,nin Cu⁺¹’e indirgendiği biüret reaksiyonu, ikinci basamakta ise Folin-Ciocalteu reaktifinin (Fosfomolibdat ve fosfotungstat) Cu⁺¹ ile indirgenerek heteropolimolibden mavi renk oluşturması ve 660 nm’de spektrofometrik olarak ölçülmesi yer alır.

Reaktifler:

-Alkalın Reaktif: 1 litre için % 2 Na₂CO₃, % 0.5 Na Tartarat (K tuzu Na Dodesilsülfatı çöktürür), % 0.5 Na Dodesilsülfat alınır ve son hacim 1 litre deiyonize suda 0.1 M olacak şekilde NaOH hazırlanarak karıştırılır

-Bakır reaktif: 10 ml % 1’lik CuSO₄.5H₂O hazırlanır.

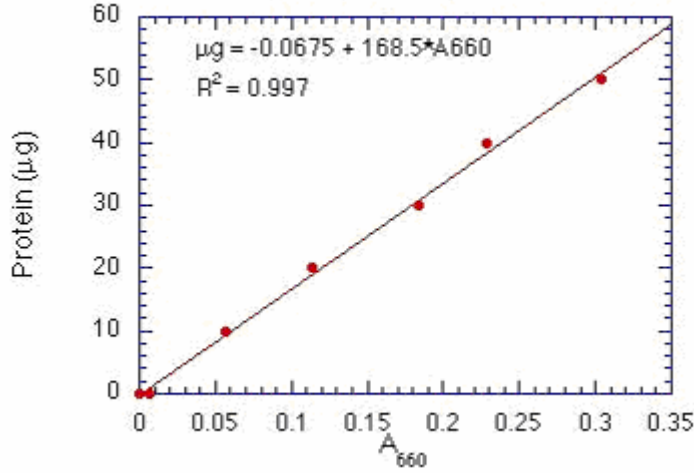
Günlük olarak 50 ml alkalın reaktif ile 0.5 ml bakır reaktif hazırlanarak iyice karıştırılır.

-Folin-Ciocalteu Reaktifi: Eşit hacimde distile su ile arzu edilen miktarda hazırlanır.

-Standart: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 µg/ml olacak şekilde sığır serum albumininden (Sigma, 1,5 mg/ml) hazırlanılır.

İşlem:

- 100 µg kadar doku örneği tartılarak tüplere konuldu.
- Tüm tüpler distile su ile 1 ml'ye tamamlanır. Blank olarak iki tüpe distile su konuldu (Ayrıca dokular tampona konulmuşsa, tampon blank olarak kullanılır).
- Alkalın-bakır reaktifi ile dilüe Folin-Ciocalteu reaktifi hazırlandı.
- Her bir tüpe 5 ml alkalın-bakır reaktif karışımından konuldu ve iyice karıştırıldı.
- Oda ısısında tüpler 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 0.5 ml dilüe Folin-Ciocalteu reaktifi eklenir ve hemen iyice karıştırıldı.
- Oda ısısında tekrar 30 dakika inkübe edildi.
- Tüpler vortekslenir, spektrofotometre blank ile sıfırlanarak 660 nm standart ve örneklerin absorbansları okundu (79).



Hesaplama:

Örneğin absorbansları grafikteki formüle yerleştirildi ve protein mg/ml'ye çevrilmek için 1000 ile çarpılarak sonuçlar elde edildi.

4.7. İstatistik Analizleri

Bu çalışmada istatistik analizlerinde SPSS 10 (Statistical Program for Social Sciences) paket programı kullanıldı. Bütün sonuçlar aritmetik ortalama \pm standart sapma şeklinde ifade edildi. Hesaplamalarda tek yönlü varyans analizi ve çoklu karşılaştırma yöntemleri kullanıldı. Anlamlılık derecesi $p < 0.05$ alınarak; gruplara ait ortalamalar için varyans analizi Oneway ANOVA ve gruplar arasında önem farkı post-hoc Tukey HSD testi ile yapıldı.

5. BULGULAR

5.1. Gruplardaki Hb Düzeyleri:

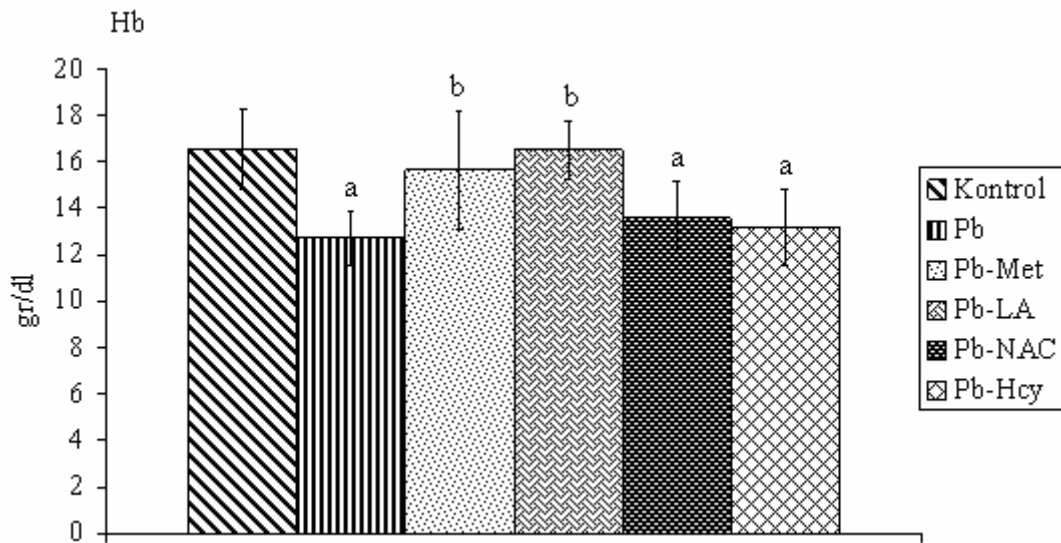
Kontrol grubuna göre kurşun, kurşun-asetilsistein ve kurşun-homosistein gruplarındaki Hb seviyelerindeki düşüklük anlamlı iken ($p<0.01$); kurşun-metiyonin ve kurşun-lipoik asit gruplarındaki azalış ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Kurşun grubuna göre kurşun-metiyonin ve kurşun-lipoik asit gruplarında Hb düzeylerindeki yükselme anlamlı ($p<0.01$); kurşun-asetilsistein ve kurşun-homosistein gruplarındaki yüksek seviyeler ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 12, Tablo 2).

Tablo 2. Grupların Hb düzeyleri.

Grup	N	Hb düzeyi (gr/dl) Ortalama \pm SD
1 Kontrol	10	16,52 \pm 1,72
2 Kurşun	10	12,71 \pm 1,16 ^a
3 Kurşun-metiyonin	10	15,65 \pm 2,54 ^b
4 Kurşun-lipoik asit	8	16,51 \pm 1,22 ^b
5 Kurşun-asetilsistein	10	13,58 \pm 1,55 ^a
6 Kurşun-homosistein	10	13,15 \pm 1,64 ^a

^a: Grup 1 ile karşılaştırıldığında, $p<0.01$; ^b: Grup 2 ile karşılaştırıldığında, $p<0.01$



Şekil 12. Grupların Hb düzeyleri. ^a: Grup 1 ile karşılaştırıldığında, $p<0.01$; ^b: Grup 2 ile karşılaştırıldığında, $p<0.01$

5.2. Gruplardaki Serum MDA Düzeyleri:

Kontrol grubuna göre serum MDA düzeyleri; kurşun ($p<0.01$) ve kurşun-lipoik asit gruplarında yüksekti ($p<0.05$). Kurşun-asetilsisteinin değerlerindeki yükseliş ile kurşun-metiyonin, kurşun-homosistein gruplarındaki azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

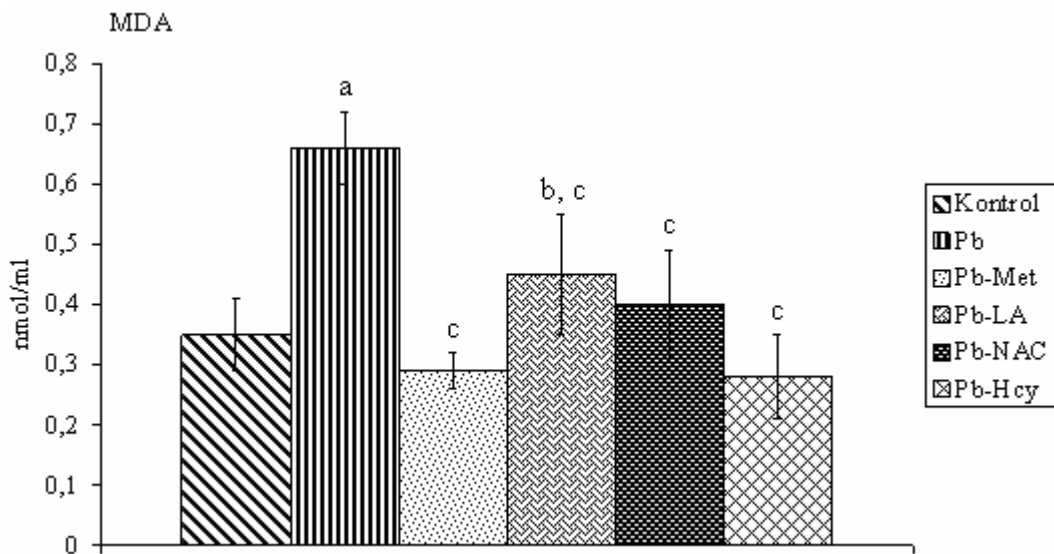
Kurşun grubu ile karşılaştırıldığında tüm sülfürlü antioksidan verilen gruplarda serum MDA düzeyleri düşük ($p<0.01$) bulundu (Şekil 13, Tablo 3).

Tablo 3. Grupların serum MDA düzeyleri.

Grup		N	Serum MDA düzeyi (nmol/ml) Ortalama \pm SD
1	Kontrol	10	0,35 \pm 0,06
2	Kurşun	10	0,66 \pm 0,06 ^a
3	Kurşun-metiyonin	10	0,29 \pm 0,03 ^c
4	Kurşun-lipoik asit	8	0,45 \pm 0,10 ^{b, c}
5	Kurşun-asetilsistein	10	0,40 \pm 0,09 ^c
6	Kurşun-homosistein	10	0,28 \pm 0,07 ^c

^a: Grup 1 ile karşılaştırıldığında, $p<0.01$; ^b: Grup 1 ile karşılaştırıldığında, $p<0.05$;

^c: Grup 2 ile karşılaştırıldığında, $p<0.01$



Şekil 13. Grupların serum MDA düzeyleri. ^a: Grup 1 ile karşılaştırıldığında, $p<0.01$;

^b: Grup 1 ile karşılaştırıldığında, $p<0.05$; ^c: Grup 2 ile karşılaştırıldığında, $p<0.01$

5.3. Gruplardaki Eritrosit SOD Düzeyleri:

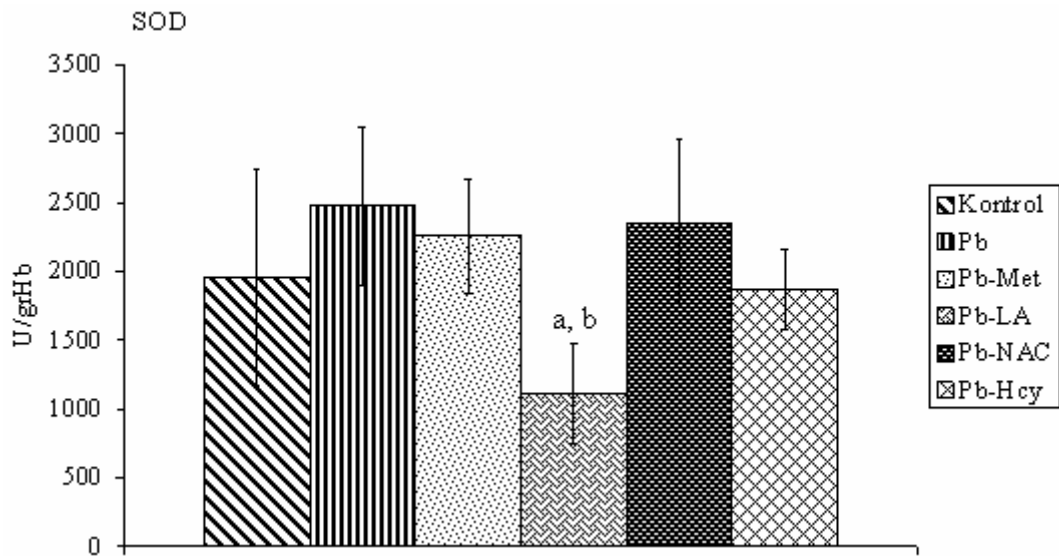
Yapılan analizlerde eritrosit SOD düzeyleri kontrol grubuna göre kurşun-lipoik asit grubunda anlamlı düşük ($p<0.05$) iken; kurşun, kurşun-metiyonin, kurşun-asetilsistein gruplarındaki yükseklik ile kurşun-homosistein grubunda azalma ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Kurşun grubuna göre kurşun-lipoik asit grubunda eritrosit SOD düzeyi anlamlı düşük ($p<0.01$) iken; diğer sülfürlü antioksidan verilen gruplarda ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı (Şekil 14, Tablo 4).

Tablo 4. Grupların eritrosit SOD düzeyleri.

Grup		N	Eritrosit SOD düzeyi (U/grHb) Ortalama \pm SD
1	Kontrol	10	1954,31 \pm 788,84
2	Kurşun	10	2476,58 \pm 573,97
3	Kurşun-metiyonin	10	2256,85 \pm 418,06
4	Kurşun-lipoik asit	8	1104,46 \pm 362,74 ^{a, b}
5	Kurşun-asetilsistein	10	2344,95 \pm 607,77
6	Kurşun-homosistein	10	1872,31 \pm 290,03

^a: Grup 1 ile karşılaştırıldığında, $p<0.05$; ^b: Grup 2 ile karşılaştırıldığında, $p<0.01$



Şekil 14. Grupların eritrosit SOD düzeyleri. ^a: Grup 1 ile karşılaştırıldığında, $p<0.05$;

^b: Grup 2 ile karşılaştırıldığında, $p<0.01$

5.4. Gruplardaki Eritrosit GSH-Px Düzeyleri:

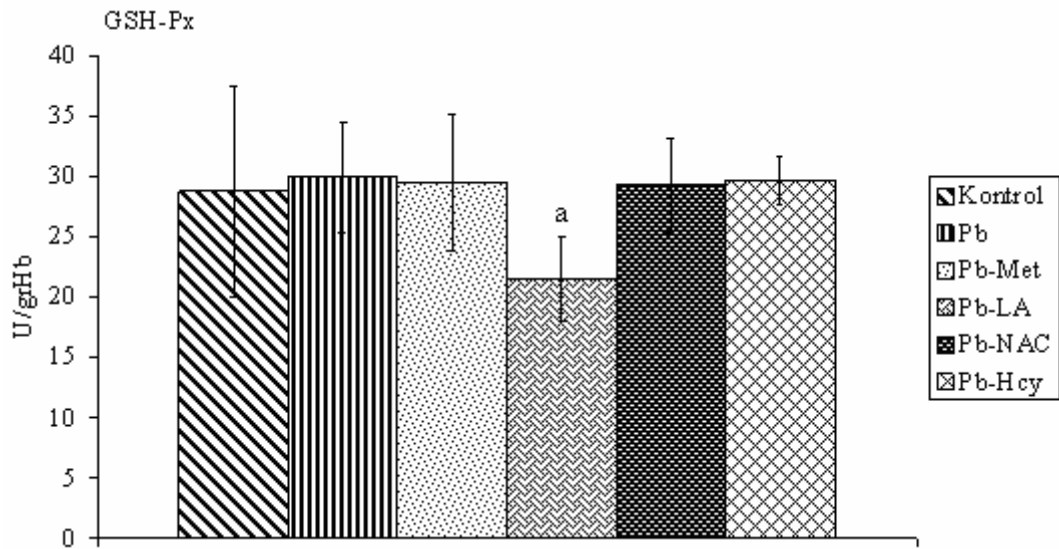
Yapılan çalışma sonucunda kontrol grubuna kıyasla eritrosit GSH-Px düzeylerindeki yükselme tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Kurşun grubuna göre eritrosit GSH-Px düzeylerindeki düşüklük kurşun-lipoik asit grubunda ($p<0.05$) anlamlı; diğer antioksidan verilen gruplardaki değerlerde ise azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 15, Tablo 5).

Tablo 5. Grupların eritrosit GSH-Px düzeyleri.

Grup	N	Eritrosit GSH-Px düzeyi (U/grHb)	
		Ortalama \pm SD	
1 Kontrol	10	28,78 \pm 8,7	
2 Kurşun	10	29,96 \pm 4,6	
3 Kurşun-metiyonin	10	29,51 \pm 5,6	
4 Kurşun-lipoik asit	8	21,58 \pm 3,5 ^a	
5 Kurşun-asetilsistein	10	29,27 \pm 3,9	
6 Kurşun-homosistein	10	29,65 \pm 2,0	

^a: Grup 2 ile karşılaştırıldığında, $p<0.05$



Şekil 15. Grupların eritrosit GSH-Px düzeyleri. ^a: Grup 2 ile karşılaştırıldığında, $p<0.05$

5.5. Gruplardaki Plazma Vitamin A Düzeyleri:

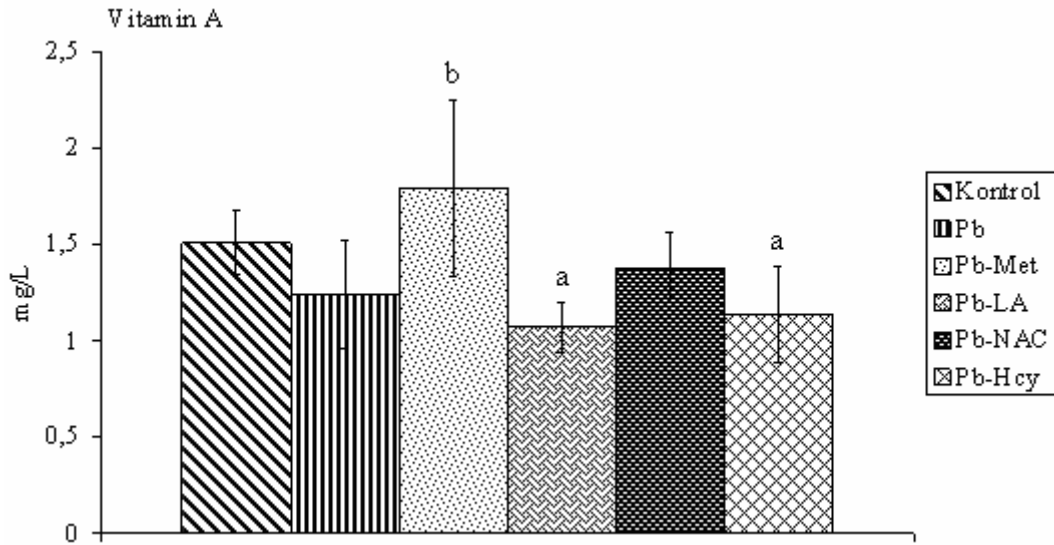
Plazma vitamin A düzeyleri kontrol grubuna göre kurşun-lipoik asit ve kurşun-homosistein gruplarında anlamlı düşük ($p<0.05$); kurşun ve kurşun-asetilsistein gruplarında ise hafif düşük bulundu. Kurşun-metiyonin grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan yüksek seviyeler elde edildi.

Kurşun grubuna göre plazma vitamin A düzeylerindeki yükselme kurşun-metiyonin grubunda anlamlıydı ($p<0.01$). Kurşun-asetilsistein grubundaki yükseliş ile kurşun-lipoik asit, kurşun-homosistein gruplarındaki azalış ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 16, Tablo 6).

Tablo 6. Grupların plazma vitamin A düzeyleri.

Grup	N	Vitamin A düzeyleri (mg/L) Ortalama \pm SD
1 Kontrol	10	1,51 \pm 0,17
2 Kurşun	10	1,24 \pm 0,28
3 Kurşun-metiyonin	10	1,79 \pm 0,46 ^b
4 Kurşun-lipoik asit	8	1,07 \pm 0,13 ^a
5 Kurşun-asetilsistein	10	1,38 \pm 0,18
6 Kurşun-homosistein	10	1,14 \pm 0,25 ^a

^a: Grup 1 ile karşılaştırıldığında, $p<0.05$; ^b: Grup 2 ile karşılaştırıldığında, $p<0.01$



Şekil 16. Grupların plazma vitamin A düzeyleri. ^a: Grup 1 ile karşılaştırıldığında, $p<0.05$; ^b: Grup 2 ile karşılaştırıldığında, $p<0.01$

5.6. Gruplardaki Plazma Vitamin E Düzeyleri:

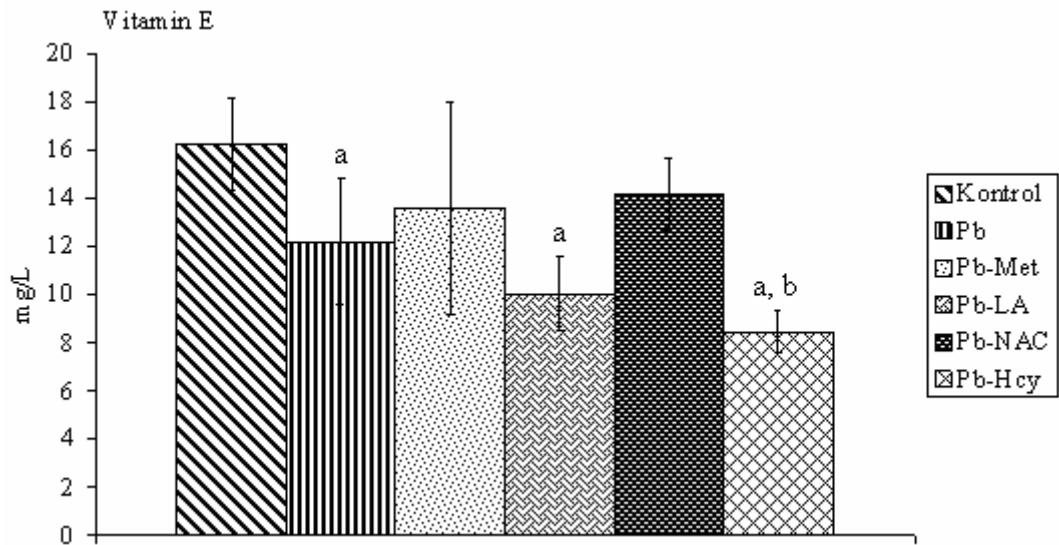
Ölçülen plazma vitamin E düzeylerindeki kontrol grubuna kıyasla düşüş kurşun, kurşun-lipoik asit ve kurşun-homosistein gruplarında anlamlı ($p<0.01$); kurşun-metiyonin ve kurşun-asetilsistein gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Kurşun grubuna göre plazma vitamin E düzeyleri kurşun-homosistein grubunda düşük ($p<0.05$) bulundu. Kurşun-metiyonin, kurşun-asetilsistein gruplarında tespit edilen yükselme ile kurşun-lipoik asit grubundaki azalış ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 17, Tablo 7).

Tablo 7. Grupların plazma vitamin E düzeyleri.

Grup	N	Vitamin E düzeyleri (mg/L)	
		Ortalama \pm SD	
1 Kontrol	10	16,27 \pm 1,9	
2 Kurşun	10	12,20 \pm 2,6 ^a	
3 Kurşun-metiyonin	10	13,58 \pm 4,4	
4 Kurşun-lipoik asit	8	10,05 \pm 1,5 ^a	
5 Kurşun-asetilsistein	10	14,18 \pm 1,5	
6 Kurşun-homosistein	10	8,46 \pm 0,9 ^{a, b}	

^a: Grup 1 ile karşılaştırıldığında, $p<0.01$; ^b: Grup 2 ile karşılaştırıldığında, $p<0.05$



Şekil 17. Grupların plazma vitamin E düzeyleri. ^a: Grup 1 ile karşılaştırıldığında, $p<0.01$; ^b: Grup 2 ile karşılaştırıldığında, $p<0.05$

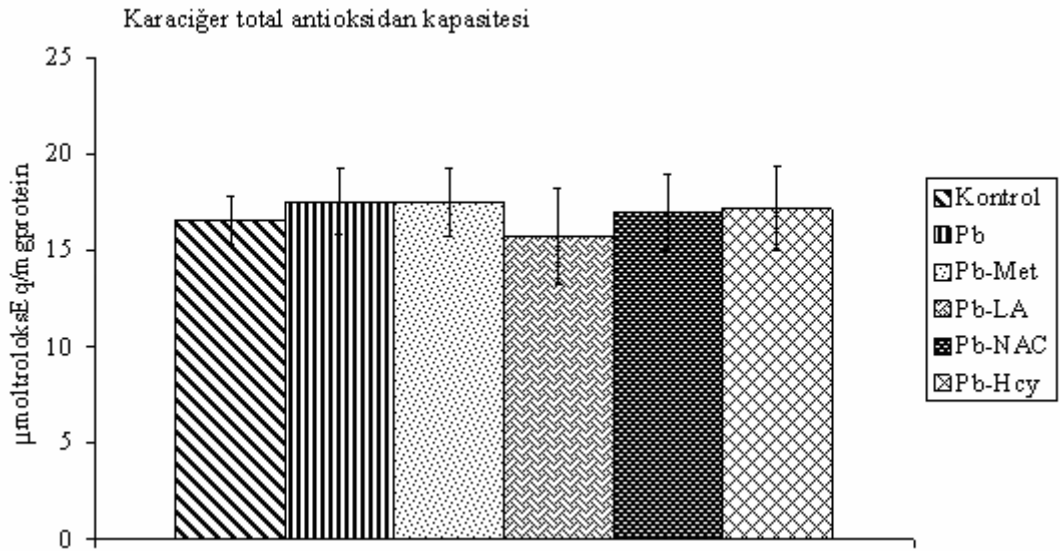
5.7. Grupların Karaciğer Total Antioksidan Kapasiteleri:

Karaciğer homojenatlarındaki total antioksidan kapasiteleri bakımından kontrol grubuna göre kurşun-lipoik asit grubundaki azalış ile diğer gruplardaki yükselme istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Kurşun grubuna göre karaciğer total antioksidan kapasitesi düzeyleri tüm sülfürlü antioksidan verilen gruplarda istatistiksel olarak anlamlı olmayan düşük bulundu (Şekil 18, Tablo 8).

Tablo 8. Grupların karaciğer dokularındaki total antioksidan kapasiteleri.

Grup		N	TAK ($\mu\text{mol.trolox.Eq/mg.protein}$) Ortalama \pm SD
1	Kontrol	10	16,60 \pm 1,27
2	Kurşun	10	17,52 \pm 1,70
3	Kurşun-metiyonin	10	17,49 \pm 1,73
4	Kurşun-lipoik asit	8	15,76 \pm 2,48
5	Kurşun-asetilsistein	10	16,98 \pm 1,99
6	Kurşun-homosistein	10	17,17 \pm 2,18



Şekil 18. Grupların karaciğer dokularındaki total antioksidan kapasiteleri.

5.8. Grupların Böbrek Total Antioksidan Kapasiteleri:

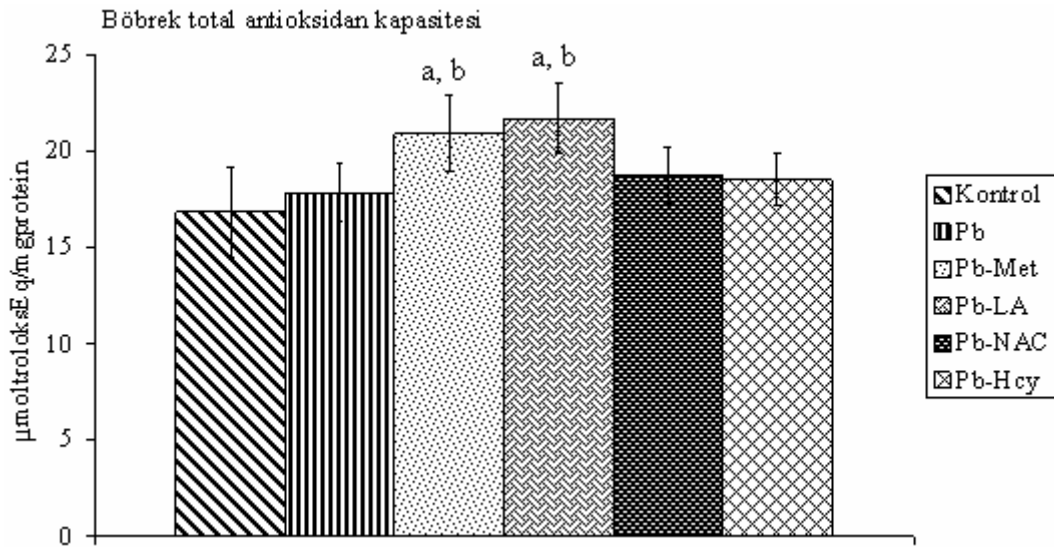
Kontrol grubu böbrek total antioksidan kapasitesi düzeyleri ile yapılan karşılaştırma sonucunda; kurşun-metiyonin ve kurşun-lipoik asit gruplarındaki veriler yüksek ($p<0.01$) bulundu. Kurşun, kurşun-asetilsistein ve kurşun-homosistein gruplarındaki yükselme ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Kurşun grubuna göre böbrek total antioksidan kapasitesi düzeyleri kurşun-metiyonin ve kurşun-lipoik asit gruplarında yüksek ($p<0.01$) bulundu. Kurşun-asetilsistein ve kurşun-homosistein gruplarındaki yükseliş ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 19, Tablo 9).

Tablo 9. Grupların böbrek dokularındaki total antioksidan kapasiteleri.

Grup		N	TAK ($\mu\text{mol.trolox.Eq/mg.protein}$) Ortalama \pm SD
1	Kontrol	10	16,85 \pm 2,33
2	Kurşun	10	17,87 \pm 1,54
3	Kurşun-metiyonin	10	20,91 \pm 1,98 ^{a, b}
4	Kurşun-lipoik asit	8	21,72 \pm 1,84 ^{a, b}
5	Kurşun-asetilsistein	10	18,75 \pm 1,50
6	Kurşun-homosistein	10	18,51 \pm 1,35

^a:Grup 1 ile karşılaştırıldığında, $p<0.01$; ^b: Grup 2 ile karşılaştırıldığında, $p<0.01$



Şekil 19. Grupların böbrek dokularındaki total antioksidan kapasiteleri. ^a: Grup 1 ile karşılaştırıldığında, $p<0.01$; ^b: Grup 2 ile karşılaştırıldığında, $p<0.01$

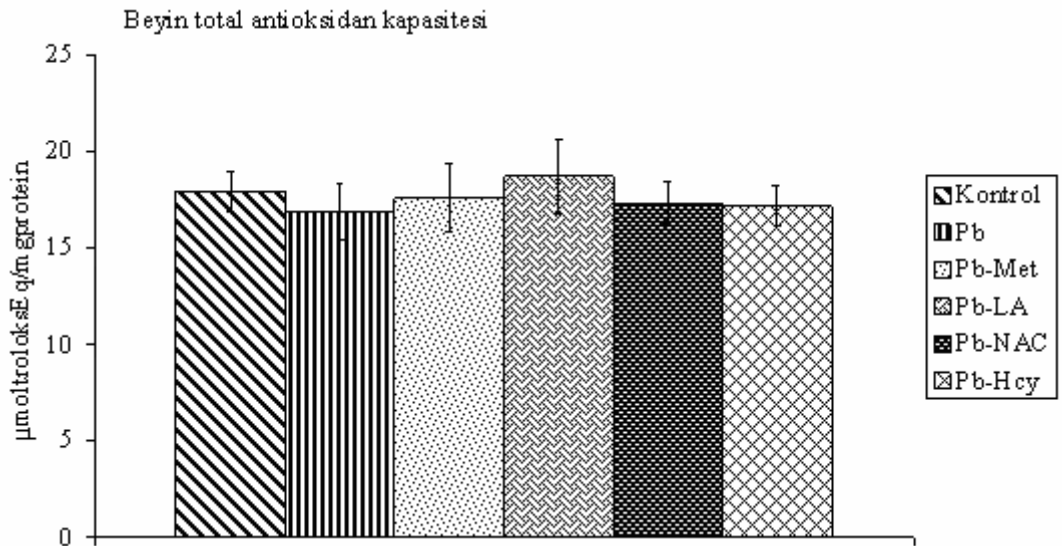
5.9. Grupların Beyin Total Antioksidan Kapasiteleri:

Kontrol grubuna ait beyin total antioksidan kapasitesi düzeylerine göre yapılan karşılaştırma sonucunda; kurşun, kurşun-metiyonin, kurşun-asetilsistein ve kurşun-lipoik asit gruplarındaki verilerdeki düşüş ile kurşun-homosistein grubundaki yükselme istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Kurşun grubuna göre beyin total antioksidan kapasitesi düzeylerindeki yükselme tüm sülfürlü antioksidan verilen gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 20, Tablo 10).

Tablo 10. Grupların beyin dokularındaki total antioksidan kapasiteleri.

Grup	N	TAK ($\mu\text{mol.trolox.Eq/mg.protein}$) Ortalama \pm SD
1 Kontrol	10	17,94 \pm 1,03
2 Kurşun	10	16,85 \pm 1,47
3 Kurşun-metiyonin	10	17,61 \pm 1,72
4 Kurşun-lipoik asit	8	18,70 \pm 1,97
5 Kurşun-asetilsistein	10	17,33 \pm 1,12
6 Kurşun-homosistein	10	17,18 \pm 1,05



Şekil 20. Grupların beyin dokularındaki total antioksidan kapasiteleri.

6.TARTIŞMA

Kurşun, birçok ülkede endüstride yaygın olarak kullanılmasından dolayı geniş ölçüde yayılarak; çevresel bir problem teşkil etmektedir. Pil, akümülatör, boya, pigment, plastik, seramik sanayi, dökümhane ve kaynak işlerinde çalışanlar için önemli birer mesleki tehdit oluşturmaktadır. Toplumun geneli ise gıdalar ve sular ya da endüstriyel baca dumanları veya benzin içindeki kurşunun havayı kirletmesi ile kurşuna maruz kalmaktadır.

Kurşunun laboratuvar hayvanları ile insanlarda merkezi ve periferik sinir sistemi, hemapoiyetik sistem, kalp-damar sistemi, kadın ve erkek üreme sistemi üzerine fizikokimyasal, biyokimyasal ve davranışsal fonksiyon bozukluklarına neden olduğu gösterilmiştir (20, 58, 65, 126, 141, 148).

Kurşun zehirlenmesinin en çok etkilediği hücreler eritrositlerdir. Eritrositler oksidatif hasara karşı; oksijene yüksek konsantrasyonda maruz kalmaları, yapılarındaki Hb'nin kolayca otooksidasyona uğraması, membranlarının lipit peroksidasyonuna duyarlı olması ve hasarlı komponentlerini tamir etme yeteneklerinin sınırlı olması nedeniyle oldukça duyarlıdır (110). Kurşun bu sistemi; Hem ve Hb sentezini önleyerek, eritrosit morfolojisini ve ömrünü değiştirerek etkiler. En göze çarpan etkisini Hem biyosentezine yapar (52, 140). Kurşun Hem sentezinde yer alan ALA sentaz, ferroşelataz ve ALA dehidrataz (ALAD) enzimlerinin aktivitesini engellemektedir (10, 34).

In vitro çalışmalarda kurşunun eritrositlerde de oksidatif stresi indüklediği gösterilmiştir (34, 52). Bu hipotez kurşuna maruz kalan işçilerin eritrositlerinde yapılan analizlerle de desteklenmiştir (81, 126). Kurşun zehirlenmesine bağlı oksidatif stres ile ilgili çalışmalar, kurşunla indüklenen zararlara karşı tedavi sürecinin antioksidanlarla destekleneceğini düşündürmektedir.

Solliway ve ark. (126), kurşuna mesleki olarak maruz kalmış bireylerdeki biyokimyasal ve hematalojik değerleri sağlıklı kontrollerle karşılaştırmışlardır. Eritrosit sayısı ve Hb konsantrasyonunun önemli derecede düşmüş; eritrosit GSH-Px ve idrar δ -ALA seviyelerinin ise yükselmiş olduğunu tespit etmişlerdir.

Othman ve ark. (98), kurşunla arttırılmış hematoksite üzerine melatoninin etkisini araştırmak için yaptıkları çalışmada ratlara kas içi olarak kurşun asetat uygulamışlar; eritrosit sayısı, hematokrit ve Hb içeriği bakımından kontrole göre önemli düşük değerler bulmuşlardır. İntragastrik olarak verdikleri melatoninin,

kurşun asetatın periferik kan parametrelerinde yaptığı değişiklere karşı ratları koruduğunu tespit etmişlerdir.

El-Missiry (30), kas içi kurşun asetat verdiği ratlarda Hem sentezindeki karaciğer delta-aminolevülinik asit sentetaz ile eritrosit delta-aminolevülinik asit dehidrataz enzim aktivitelerinin, kan Hb'inin, karaciğer demir içeriği seviyelerinin kontrole göre düştüğünü ortaya koymuştur. Bu etkilerin kurşunla birlikte melatonin verilmesiyle önlendiğini; melatoninin bu etkilerini hücrelerde koruyucu antioksidan kapasitesi ile ve serbest radikalleri temizleme yeteneği ile gerçekleştirdiğini bildirmiştir.

Gurer ve ark. (49), yapmış oldukları çalışmada kurşun asetat verilen ratlarda hematokrit ve Hb seviyelerinde önemli azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Kurşun ile birlikte verilen NAC ve succimer'in (DMSA) ise hematolojik değerleri koruduğu sonucuna varmışlardır. Yazarlara göre; NAC bu etkisini tiyol içeren bir antioksidan olması nedeniyle oksidatif strese karşı koyarak göstermiştir. Antioksidan etkisinin, glutasyon sentezini artırıp, hücre içi GSH seviyelerini yükseltmesinden ve direk olarak ROS'u temizlemesinden kaynaklandığını bildirmişlerdir. NAC'ın bor ve kadmiyum gibi bazı ağır metallere karşı şelat yapıcı etkisinin olduğunu da vurgulamışlardır. Tüm bu yararlı etkileri ile NAC'ın kurşun zehirlenmesinin bozduğu prooksidan/antioksidan dengesinin düzeltilmesinde yararlı olacağını ileri sürmüşlerdir.

Yaptığımız çalışmada içme suları ile beş hafta boyunca kurşun asetat verilen ratlarda Hb düzeyleri kontrole göre istatistiksel olarak önemli düşük bulundu. Kurşun ile birlikte metiyonin ve lipoik asit verilen gruplardaki Hb değerlerinin kurşun grubuna göre önemli yüksek; kurşun ile birlikte asetilsistein ve homosistein verilen gruplarda ölçülen Hb değerlerinin ise kurşun grubuna göre önemli olmayan yüksek olduğu tespit edildi. Metiyonin, hücre içi antioksidan etki göstererek hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan GSH'nın yapısında yer alan sisteinin sentezi için kükürt sağlamaktadır. Dolayısıyla metiyonin, küçük molekül ağırlığına sahip antioksidan etkili GSH için öncül bir moleküldür (62, 99). Bunun yanı sıra metiyonine ait tiyol grupları, dokularda kurşun ile şelat oluşturabilmektedir (101). Diğer taraftan lipoik asit bir, indirgenmiş formu olan dihidro-lipoik asit (DHLA) ise iki adet serbest sülfidril grubu içermektedir. LA ve DHLA ikisi de bazı ROS'ları temizleyebilir; vitamin E, vitamin C ve GSH gibi bazı antioksidanları radikal ya da inaktif formundan yeniden oluşturabilir (88). Yaptığımız çalışmada; sülfür içeren

bileşiklerin özellikle metiyonin ve lipoik asidin, kurşunun Hb düzeyleri üzerine azaltıcı etkisini geri çevirmeleri muhtemelen bu bileşiklerin antioksidatif etkileri ile radikalleri temizleme özelliklerine bağlanabilir.

Vücutta süperoksit, hidroksil, hidrojen peroksit ve lipit peroksitler gibi reaktif oksijen bileşiklerinin meydana gelmesi sonucu ağır metallerin iyonları değişir ve bunlar protein, membran lipidi ve nükleik asitler gibi hücre komponentlerine zarar verir (36, 153). Geçiş metalleri, biyolojik sistemlerde ROS meydana getirerek; kurşun ise hücrelerdeki pro-oksidan/oksidan dengesini bozarak; lipit peroksidasyonu ile DNA hasarı oluşturur ve böylece hücrenin antioksidan savunma sistemlerini tüketir (34, 52). *İn vitro* çalışmalar kurşun uygulanmasının ardından ROS üretiminin arttığını göstermiştir (33, 50, 57, 152). *İn vivo* çalışmalar ise hayvanlarda ve işçilerde kurşun maruziyetinin ROS oluşumu ile antioksidan savunma sistemlerini değiştirdiğini göstermiştir (20, 65, 98, 126, 130).

İki değerlikli Co^{+2} , Mn^{+2} , V^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} ; linoleik ve linolenik asit emülsiyonlarındaki oksidatif hasarı arttırmaktadır. Kurşunun da böyle bir prooksidan etkisi görülmüştür (34, 52). Yiin ve Lin (152), linoleik, linolenik ve araşidonik asidi kurşun ile inkubasyona bırakmışlar ve MDA miktarını arttırdığını belirlemişlerdir. El-Sokkary ve ark. (31), kurşuna maruz bırakılan ratların beyin homojenatlarında; Sandhir ve Gill (115) karaciğerde lipit peroksidasyonunun (TBARS) arttığını ve antioksidanların azaldığını tespit etmişlerdir. Somashekaraiah ve ark. (128), tavuk embriyolarının karaciğer, mitokondri ve lizozom membranlarında kurşuna bağlı lipit peroksidasyonunun arttığını göstermişlerdir.

Attri ve ark. (6), ratlara verdikleri kurşunun kan basıncını, plazma lipit peroksidasyonu göstergesi olan MDA seviyelerini önemli derecede arttırdığını; NO metabolitlerini ise önemli derecede azalttığını tespit etmişlerdir. Kurşun ile birlikte verdikleri vitamin C'nin ROS inaktivasyonu ile lipit peroksidasyonunu azalttığını; NO salınımını ve böylece NO'nun etkisiyle artan hipertansiyonu ise normale çevirdiğini açıklamışlardır.

Mousa ve ark. (92), dişi keçilere ağız yoluyla iki hafta boyunca kurşun vermişler ve 14 gün sonunda kurşun grubunda önemli derecede lipit peroksit düzeylerinin arttığını tespit etmişlerdir.

Patra ve Swarup (102), dişi ineklerde kurşunun 28 gün oral olarak uygulanmasının ardından; eritrosit hemolizatlarında yaptıkları lipit peroksit

analizlerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı yükselme olduğunu bulmuşlardır.

El-Missiry (30), ratlarda kurşuna bağlı hepatik lipit peroksidasyonunda kontrole göre önemli artış olduğunu ölçmüştür. Kurşun ile birlikte vitamin C verilen grupta ise lipit peroksidasyonun normal seviyelerde olduğunu göstermiştir.

Gurer ve ark. (50) yapmış oldukları çalışmada; kurşun asetat verilen ratlarda kontrol grubuna göre eritrositler ile beyin ve böbrek dokularındaki lipit peroksidasyonuna bağlı MDA seviyelerini önemli derecede yüksek bulmuşlardır. Kurşunla birlikte LA verilen grupta ise MDA düzeyleri önemli derecede azalmış ve kontrol değerlerinin biraz üzerinde olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada kullanılan Çin hamsteri ovaryum hücrelerinde ise kurşuna maruz bırakılan hücrelerde MDA seviyeleri, % 205 oranında artmış; kurşunla birlikte SOD+katalaz veya LA ile birlikte inkübe edilen grupta ise kontrol düzeylerine inmiştir.

Patra ve ark. (103), ratlara 4 hafta boyunca kurşun asetat vermiş ve takip eden 5. hafta boyunca oral yolla askorbik asit, α -tokoferol ve L-metiyonin vermişlerdir. Dene bitiminde kurşun asetat verilen grubun kan kurşun düzeyleri ortalama 70 $\mu\text{g}/\text{dl}$ iken, metiyonin verilen grupta 46 $\mu\text{g}/\text{dl}$ olarak bulunmuştur. Lipit peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyleri, kurşun grubunun karaciğer ve beyinlerinde kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek olarak ölçülmüştür. Böbrekte ise hafif derecede bir artış olduğu görülmüştür. Metiyonin verilen gruptaki MDA düzeyleri, kontrol grubuna göre hafif yüksek; fakat kurşun grubuna göre ise önemli derecede düşük bulunmuştur.

Gurer ve ark. (49), kurşun asetat verilen ratlarda eritrosit MDA içeriğinin kontrole göre önemli derecede arttığını tespit etmişlerdir. Bu durum yazarlar tarafından; kurşunla artırılan lipit peroksidasyonunun *in vivo* aldehidik ürünlerin oluşmasına neden olması ve buna bağlı olarak aldehit-GSH konjugatlarının meydana gelmesi sonucu hücre içi redükte glutatyon içeriğinin azalması ile açıklanmıştır. Ayrıca kurşunun, GSH'nın sülfidril ve glisinin karboksilik gruplarına bağlanarak hücre içi redükte GSH miktarının azalmasına yol açtığı fikri de belirtilmiştir. Araştırmacılar etkilerini araştırdıkları tiyol içeren NAC ve LA gibi antioksidanların ve şelat yapıcı maddelerin uygulanmasının *in vivo* kurşuna bağlı artan MDA seviyelerini inhibe ettiğini ve GSH miktarını arttırdığını bildirmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada; kurşun verilen ratlarda lipit peroksidasyonuna bağlı serum MDA düzeyleri kontrol grubuna göre önemli yüksek bulundu. Bu durum;

muhtemelen kurşun tarafından Hem sentezinde yer alan ALAD enziminin inhibe edilmesi sonucunda potansiyel bir serbest radikal kaynağı olan amino levülünik asidin birikmesi, kurşunun biyolojik membranlar üzerine direk etkisi sonucunda lipit peroksidasyonunu arttırması, hücre içi kalsiyum düzeylerini arttırarak mitokondriyel fonksiyonları bozması ve kurşunun serbest radikalleri etkisizleştirmede görevli enzimler ile GSH düzeylerini azaltması nedeniyle vücutta oksidatif stresin artması sonucunda meydana gelmektedir (55, 114, 130).

Çalışmamızda kurşun ile birlikte verilen metiyonin, α -lipoik asit, asetilsistein ve homosistein gibi sülfür içeren antioksidan bileşikler, kurşunun yaptığı lipit peroksidasyonuna karşı hücreleri koruyarak ve serbest radikalleri temizleyerek; tek başına kurşun verilen gruba göre serum MDA konsantrasyonlarının istatistiksel olarak anlamlı düşük çıkmasına neden olmuştur.

Metiyonin, antioksidan etkiye sahip olan GSH için öncül bir moleküldür (62, 99). Böylece GSH, kurşunun oluşturduğu ROS'u temizleyerek; MDA konsantrasyonlarının daha düşük çıkmasına neden olmaktadır. Bunun yanı sıra metiyonine ait tiyol grupları, dokularda kurşun ile şelat da oluşturabilmektedir (103).

In vitro ve *in vivo* sistemlerde LA ve DHLA'nın antioksidan potansiyelinin olduğu gösterilmiş ve bu özellikleri nedeniyle oksidatif strese bağlı oluşan hastalıklarda kullanılabileceği düşünülmüştür (88). Kurşun toksisitesi esnasında da proksidan/antioksidan denge bozulmakta ve bu toksik etkinin antioksidanlarla aşılabilceği düşünülmektedir (52). Antioksidan etkili α -lipoik asit, yapısında disülfid ihtiva eder ve bunlarla ROS'u etkisizleştirir. Ayrıca metal şelatör özelliğinden dolayı kurşunun kan ve dokulardaki düzeyini azaltarak etkili olur (50, 62). LA'nın sülfidril grubu taşımasına bağlı nükleofilik etkisiyle, GSH'nın ROS etkisizleştirmesi esnasında GSSG'ye oksidasyonunu azaltmakta olduğu da ileri sürülmüştür (50). Diğer yandan LA ve DHLA'nın da direk antioksidan etkileri ile kurşun zehirlenmesindeki lipit peroksidasyonunun önlenmesinde etkili olacağı düşünülebilir. Bu kanıya bileşik çiftinin oksidasyon ile oluşan ROS'u temizleyebilmesinden; radikal veya inaktif formlarından vitamin E ve C ile GSH'yı yeniden oluşturabilmesinden ve kurşun ile şelat oluşturabilmesinden dolayı varılır (100). Kurşunla birlikte lipoik asit verilen gruptaki serum MDA seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olarak bulunmasına muhtemelen periton içi yapılan enjeksiyon sırasında meydana gelen stres ve bu grupta ölümler olması nedeniyle deney sonunda diğer gruplara göre oluşan örnek sayısındaki azalma neden olmuştur.

N-asetilsistein, oksidatif stresin etkisini azaltmak için kullanılan tiyol içeren diğler bir antioksidandır. Kabul edilen görüŖe göre, NAC bu etkisini glutasyon sentezini stimüle ederek göstermektedir (5, 49, 52). Oral olarak verilen NAC ince barsakta hızla deasetile olarak sisteine dönüŖtürülmekte, hücre membranını aşarak sistein havuzuna katılmakta ve sonuç olarak GSH sentezini arttırmaktadır. Bu durum sonucunda hücrelerin antioksidan savunma gücü daha da kuvvetlenmektedir (33). Glutasyon ise hücreleri oksidatif hasara karşı koruyarak, detoksifikasyon işleminde önemli rol oynamaktadır (102, 108). Çalışmamızda serum MDA düzeylerini NAC, tek başına kurşun asetat verilen gruptan daha aşağı seviyelere indirerek, kontrol değerlerine yaklaştırmıştır.

Homosistein, kükürt içeren bir amino asittir. Metiyonin düzeyinin azaldığı durumlarda, metillenerek metiyonine dönüşmektedir (5, 101). Böylece metiyonin amino asidi de yukarıda belirtildiği gibi kurşunun etkilerini tolere etmektedir (103). Çalışmamızda homosistein diğler sülfür içeren bileşiklerden daha güçlü bir antioksidan etki ile lipit peroksidasyonuna karşı koymuş ve kurşun grubuna göre anlamlı düşük MDA seviyeleri oluşturmuştur. Homosistein normalde oksidan bir bileşik olmasına rağmen yapısal olarak kurşun tedavisinde kullanılan bir bileşik olan penisilamine (b,b dimetilsistein) olan benzerliğinden dolayı muhtemelen kurşun ile şelasyon yaparak onun peroksidatif etkilerini önlemiştir (63, 156).

SOD, süperoksidi hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çeviren reaksiyonu katalizleyen bir metalloenzimdir. GSH-Px ise hidrojen peroksit ve büyük molekülü lipit hidroperoksitlerinin indirgenmesinden sorumludur (117, 153). Bu iki enzim reaktif oksijen türlerini içeren normal ve patolojik durumların incelenmesinde biyokimyasal bir gösterge olarak kullanılmıştır.

Kurşunla uyarılan oksidatif stresin mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen; kurşun, geçiş metalleri (demir, bakır vs.) gibi redoks reaksiyonları verebilen bir metal değildir. Fakat diğler taraftan kurşun sülfidril gruplarına afiniteye sahiptir (55). Kurşun, ROS oluşumunu arttırarak ve hücrelerin antioksidan mekanizmalarını tüketerek; prooksidan/antioksidan oranında bozulma sonucu oksidatif hasara neden olmaktadır. Hücre içi çözünebilir özellikteki glutasyon, sistein ve gama-glutamilsistein gibi indirgenmiş sülfidril grupları taşıyan tiyol bileşikleri hücredeki fonksiyonlarını sürdürebilmek için indirgenmiş formda bulunmak zorundadırlar. Kurşunun GSH gibi tiyol bileşiklerine bağlanması sonucunda tiyol oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları aksamaktadır (49). Kurşun zehirlenmesi esnasında

ALAD'ın inhibisyonu Hem prekürsörü olan ALA'nın birikmesine, oksihemoglobinin methemoglobine otooksidasyonunun arttırılmasına ve böylece süperoksit ve hidrojen peroksit formasyonuna neden olmaktadır (49, 90).

Kurşunun en çok etki gösterdiği bölümlerden biri de kan yapıcı sistemlerdir. RBC üzerine olan etkileri bu hücrelerin yüksek afinite ile kurşunu bağlamaları ve kurşuna kan dolaşımı esnasında daha fazla maruz kalmaları sonucu oluşmaktadır (126). Kurşunla yapılan deneysel ve klinik çalışmalar sonucunda elde edilen kan SOD düzeyleri ile ilgili bulgular iki uçludur.

Mousa ve ark. (92), dişi keçilere ağız yoluyla iki hafta boyunca kurşun asetat vermişler; GSH-Px, SOD, katalaz, total tiyol grupları, plazma TAK ve lipit peroksit düzeylerini tespit etmişlerdir. 7. gün sonunda eritrositlerin hemolizatlarındaki GSH-Px, SOD, katalaz, total tiyol grupları önemli derecede artmış; 14. gün ise tüm parametrelerde önemli derecede azalma meydana gelmiştir. Bu azalmanın 14. güne kadar olan lipit peroksit seviyelerindeki artışa bağlı olduğunu savunmuşlardır.

Patra ve Swarup (102), dişi sığırlara 28 gün boyunca içme suyu ile kurşun asetat vermiş; eritrosit hemolizatlarında lipit peroksit seviyeleri ile SOD ve katalaz aktivitelerini ölçmüşlerdir. SOD ve katalaz aktivitesi, kurşun verilen grupta düşmüş; lipit peroksit seviyeleri ise yükselmiştir. Kurşuna maruz kalma sonucunda eritrositlerde antioksidan savunma sistemi gerilemiştir.

Sivaprasad ve ark. (122), toksisite oluşturmak amaçlı kurşun asetatı beş hafta boyunca ratlara içme suları ile birlikte vermişlerdir. LA ve DMSA'yı tek başlarına ya da kombine olarak altı hafta boyunca kurşunla birlikte periton içi uygulamışlardır. Karaciğerde kurşun hasarı sonucu lipit peroksidasyonu önemli oranda artmış; hepatic ALT, AST, ALP ve GSH miktarları ile antioksidan enzimlerden katalaz, SOD ve GSH-Px; glutatyon metabolize eden enzimler olan glutatyon redüktaz, G6PD ve glutatyon-S-transferaz aktiviteleri ise azalmıştır. LA ve DMSA kombinasyonunun kurşunla indüklenen oksidatif stresi tamamen; LA'nın ise tek başına kurşun hasarını kısmen engellediğini belirtmişlerdir.

Monteiro ve ark. (89), kurşuna maruz kalan iki farklı fabrikadaki işçiler ile kontrol grubu üzerinde yaptıkları çalışmada SOD enzim aktivitesini önemli oranda yüksek ve kan kurşun düzeyinin 40 µg/dl'nin üzerinde olan bireylerde ise kurşunla paralel artış gösterdiğini tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada GSH-Px enzim aktivitelerinin ise birinci fabrika işçilerinde üç kat artış; ikinci fabrika bireylerinde istatistiksel olarak önemli olmayan azalma gösterdiğini tespit etmişlerdir. SOD

enzimindeki artışı oksihemoglobinin methemoglobine oksidasyonu sonucunda ortamda meydana gelen süperoksit iyonlarının SOD enzim biyosentezini kemik iliğindeki eritroblastlarda indüklemesine; GSH-Px'deki artışını ise kurşunun uyardığı oksidatif strese karşı vücudun gösterdiği savunma yanıtına bağlamışlardır.

Costa ve ark. (20), kurşun bazlı boya kullanan çömlek imalatı işçilerinde MetHb (% total Hb), SOD, protoporfirin-IX, ALA, kan kurşun düzeylerini kontrol grubuna göre önemli oranda yüksek bulmuşlardır. ALA ile tüm parametreler arasında pozitif bir ilişki tespit etmişlerdir. SOD enzim aktivitesindeki artışı, dokularda ALA oksidasyonu sonucunda oluşan oksiradikallerin zararlı etkilerine karşı vücudun koruyucu yanıtına ve kurşunun antioksidan savunma sistemlerini uyarmasına bağlamışlardır.

Skoczynska ve ark. (124), yedi hafta boyunca haftada bir farklı dozlarda intragastrik olarak kurşun asetat verdikleri ratları kontrol grubu ile karşılaştırmaları sonucunda kan kurşun düzeylerinin önemli derecede yüksek, serum SOD düzeylerinin ise anlamlı olmayan düşük olduğunu bulmuşlardır.

Solliway ve ark. (126), kurşuna mesleki olarak maruz kalmış bireylerdeki biyokimyasal ve hematalojik değerleri sağlıklı kontrollerle karşılaştırmışlardır. Eritrosit sayısı ve Hb konsantrasyonunun önemli derecede düşmüş; eritrosit GSH-Px ve idrar δ -ALA seviyelerinin ise yükselmiş olduğunu tespit etmişlerdir.

Kasperczyk ve ark. (65), deneysel çalışmalar sonucunda iki uçlu SOD sonuçları olmasından dolayı bu durumu incelemek için yapmış oldukları çalışmada kurşuna uzun süreli maruz kalmış çelik işçilerini 35 μ l/dl'nin altında ve üzerinde kan kurşun düzeyi taşıyanlar olmak üzere iki gruba ayırmışlardır. Araştırmada plazma ve eritrosit SOD (CuZn-SOD) düzeylerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğunu tespit etmişlerdir ve kan kurşun düzeyi ile SOD arasında pozitif korelasyon saptamışlardır. Kanda oluşan SOD aktivitesindeki artışın kurşunla artmış reaktif oksijen türlerine karşı adapte olma mekanizması olarak geliştiğini ileri sürmüşlerdir. Bu durumu kurşunun ALAD enzimini engellenmesi sonucunda ortamda biriken ALA'nın peroksidatif etkisine bağlı olarak artan süperoksit radikali nedeniyle SOD enzim aktivitesindeki yükselişe bağlamışlardır. Benzer olarak çalışmamızda olgun eritrositlerde yer alan CuZn-SOD'u ölçmüş olduk ve bu nedenle bazı çalışmalarda düşük çıkan plazma SOD düzeylerine göre farklı sonuçlar elde ettik.

Çalışmamızda eritrosit SOD düzeylerinde kontrol grubuna göre kurşun, kurşun-metiyonin ve kurşun-asetilsistein gruplarında istatistiksel olarak hafif

yükseklik tespit edildi. Kurşun-lipoik asit grubunda anlamlı ve kurşun-homosistein grubunda ise anlamlı olmayan düşük seviyelerde bulundu.

Kurşun grubuna göre ise kurşun-lipoik asit grubundaki eritrosit SOD düzeylerindeki azalışın anlamlı düşük olduğu görüldü. Kurşunla birlikte diğer antioksidanların verildiği gruplarda ise kurşuna göre anlamlı olmayan düşük eritrosit SOD seviyeleri elde edildi ve bu antioksidan bileşiklerin kurşunun uyardığı SOD seviyelerine etki ederek, yukarıdaki çalışmalara benzer olarak azalttığı görüldü.

Eritrosit GSH-Px düzeyleri çalışmanın sonunda yapılan analizlerde kontrol grubuna göre; kurşun-lipoik asit grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan düşük bulundu. Diğer gruplardaki yükselmenin ise hafif yüksek olduğu edildi.

Kurşun grubuna göre eritrosit GSH-Px düzeyleri kurşun-lipoik asit grubunda anlamlı düşük; kurşunla birlikte diğer antioksidan verilen gruplarda hafif düşük tespit edildi. Bu sonuç da yukarıdaki çalışmalara paralel olarak sülfürlü antioksidan bileşiklerin kurşunla yükselmiş GSH-Px seviyelerine karşı etkili olduğunu göstermektedir.

Kurşun, amino asitlerin az stabil yan zincirlerine, merkaptit, sülfhidril ve sisteinin -SH grubuna yüksek afinite ile bağlandığından dolayı antioksidan enzimlerin arasında bulunduğu birçok enzimin -SH grubuna bağlanarak da onları inhibe etmektedir (52, 62). Kandaki kurşunun % 70'i eritrositlerde ALAD'a bağlanıp onu inhibe etmekte (11, 42) ve ancak kurşunun kalan % 30'u koproporfirinojen oksidaz, ferroselataz, katalaz, G6PDH ve SOD ile GPx gibi enzimlere bağlanarak onları inhibe edebilmektedir. ALAD, sekiz benzer alt ünitelerden oluşmakta ve sekiz adet -SH grubu taşımaktadır. ALAD'ın kurşunu yüksek oranda bağlaması vücudu kurşuna bağlı oksidatif strese korumaktadır (45). G6PD de birçok -SH grubu taşımakta ve o da fazla miktarda kurşun bağlamaktadır (58).

Ayrıca ratlar ve insanlarda yapılan analizlerde kurşun inhibisyonuna cevap olarak ALAD enziminde kompenzasyon için bir artış olduğu da gösterilmiştir (41, 43). İlk olarak bu artış dolaşımdaki eritrositlerde gerçekleşmekte; 5-7 gün sonra ise kemik iliğindeki eritroblastlarda kurşun maruziyetine bağlı olarak uyarılan genlerin etkisiyle enzim indüksiyonu gerçekleşmektedir (43, 44). Hücre dışı gerçekleştirilen bir analiz de kurşunun ALAD'ın *de novo* sentezini indüklediğini desteklemektedir (42). Muhtemelen benzer şekilde dolaşımdaki ve kemik iliğindeki eritrositlerde SOD ve GSH-Px de kurşuna bağlı enzim indüksiyonuna uğramaktadır. Kurşun ile ilgili işlerde çalışanlarda kurşun maruziyeti senelerle ifade edilen uzun sürelerde

gerçekleşmektedir. Deneysel olarak ratlar üzerinde yapılan çalışmaların çoğunda çalışmamızdan farklı olarak 4-6 haftalık kurşun asetat maruziyetini takiben kurşun verilmesi kesilerek bir hafta boyunca ya kurşun grubuna fizyolojik tuzlu su ya da koruyucu değil de tedavi amaçlı olarak antioksidan bileşikler verilmiştir (49, 50, 103, 122). Çalışmamızda ise kontrol grubu dışındaki tüm gruplara deney bitimine kadar sürekli kurşun asetat ve/veya koruyucu olarak antioksidan bileşikler verilmiştir.

Soltaninejad ve ark. (127), subkronik kurşun maruziyetine bağlı olarak beyindeki ultrastrüktrel değişiklikler ile oksidatif stres arasındaki ilişkiyi araştırmak için yapmış oldukları çalışmada 30 gün boyunca oral olarak % 0,05 (w/v) ile % 0,01 (w/v) miktarında kurşun asetat verilen ratlarda önemli olmayan eritrosit-SOD ve kan katalaz artışı; % 0,1 (w/v) miktarında verilenlerde ise önemli oranda ($p < 0.01$) eritrosit-SOD ve kan katalaz artışı tespit etmişlerdir. Çalışmamızda ratlara 2000 ppm (2 g/L = % 0,2 w/v) miktarında kurşun asetat verdik. Yukarıdaki çalışmaya paralel olarak beş hafta boyunca sürekli % 0,2 (w/v) gibi yüksek düzeylerde verdiğimiz kurşun asetat muhtemelen kan kurşun düzeylerini arttırmış ve buna bağlı olarak indüksiyon sonucu eritrosit SOD ve GSH-Px düzeyleri yükselmişlerdir.

Kasperczyk ve ark. (66), yaptıkları çalışmada kurşuna uzun süreli maruz kalmış çelik işçilerini incelemeye almışlar ve kan kurşun düzeylerine paralel olarak ALA düzeylerinin arttığını tespit etmişlerdir. MDA, eritrosit GSH-Px ve GR düzeylerinde kontrole göre artış tespit etmişlerdir. GSH-Px düzeylerindeki artışın doza bağımlı olduğunu ve düşük dozlarda aktivasyonun daha fazla gerçekleştiğini belirtmişlerdir. GSH-Px ile kurşun arasındaki ilişkinin GST ile benzerlik taşıdığını ve GST'nin Dock'un (28) yapmış olduğu çalışma ile ortaya koyduğu şekilde karaciğer ve böbrekte kurşun ile indüklendiğini ve bu durumu Suzuki ve ark.'nın (132) kurşun asetat verilmesinin GST mRNA düzeylerini arttırdığını ve bunu kurşunun α_2 -mikroglobuline bağlanarak; oluşan kompleksin çekirdeğe taşınarak transkripsiyonu stimüle etmesiyle gerçekleştirdiğini bildirdikleri çalışmayla da ilişkilendirmişlerdir. Benzer şekilde kurşuna bağlı olarak eritroblastik sistemde de gerçekleşecek yukarıda mekanizma ile GST ve GSH-Px düzeylerinin eritrositlerde arttırmış olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Çalışmalarında buldukları eritrosit GSH-Px ile idrar ALA düzeyleri arasındaki pozitif korelasyonu, artan ALA düzeylerinin yükselttiği oksidatif strese yanıt olarak GSH-Px düzeyinin yükselmesine bağlamışlardır. Benzer bir ilişki Bechara (10) tarafından ALA'nın metal katalizli aerobik oksidasyonu ile

artan reaktif oksijen türleri nedeniyle artmış lipit peroksidasyonu ile kurşun zehirlenmesinde yükselmiş eritrosit SOD ve GSH-Px düzeyleri arasında kurulmuştur.

Gurer ve ark. (50), yaptıkları çalışmada kurşun maruziyetine bağlı olarak Çin hamsteri ovaryumu ve ratlarda yükselmiş olan prooksidan/antioksidan oranına lipoik asit etkisini araştırmışlardır. Çin hamsteri ovaryumu hücrelerine 20 saat, 500 µM kurşun asetat ve ratlara beş hafta boyunca 2000 ppm kurşun asetat uygulamışlar ve 6. hafta ise ratlara su ya da lipoik asit veya DMSA vermişlerdir. Yapılan analizler sonucunda kurşun grubu CHO hücreleri ile ratların eritrosit ve beyinlerinde MDA miktarı ile katalaz aktivitesinin kontrole göre arttığını tespit etmişlerdir. Yine eritrosit G6PD aktivitesinde de artışla karşılaşılmıştır. Katalaz aktivitesindeki artışı, kurşuna bağlı lipit peroksidasyonuna bağlamışlardır. Yazarlar pentoz fosfat yolunun ilk enzimi ve hücrelerin mitokondri dışı NADPH kaynağı olan G6PD'nin özellikle mitokondrisi olmayan eritrositlerde önemli olduğunu belirtmişlerdir. GSH'nın redükte forma çevrilmesini katalizleyen glutatyon redüktaz enziminin bu esnada NADPH'ya ihtiyaç göstermesine dikkat çekmişler ve ortamda oksidatif stres sonucunda meydana gelen hidrojen peroksidin GSH-Px tarafından etkisizleştirilmesi esnasında GSSG miktarında artış olduğunu vurgulamışlardır. G6PD aktivitesindeki artışı ise GSH sentezi için NADPH tüketimindeki artışa bağlamışlardır. Muhtemelen artan hidrojen peroksidin etkisizleştirilmesine bağlı olarak GSH-Px aktivitesi de artmaktadır.

Çalışmamızda kurşun verilen gruba göre SOD ve GSH-Px, kurşunla birlikte lipoik asit verilen grupta anlamlı düşük olarak bulundu. Bu durum lipoik asidin hidroksil radikali, hipokloröz asit ve singlet oksijen temizleme özelliği ile sistinin sisteine dönüşümünü sağlayarak glutatyon seviyelerini arttırması (50, 62) sonucunda gerçekleşmiş olabilir.

Kurşunla birlikte metiyonin, NAC ve homosistein verilen gruplarda ise tek başına kurşun verilen gruba göre hafif düşük SOD ve GSH-Px değerleri bulunmuştur. Bu sonuç metiyoninin GSH öncülü olması nedeniyle kazandığı antioksidan özelliğiyle (5, 99, 101) ve bünyesindeki tiyol grubu ile dokularda kurşun ile şelat oluşturması sayesinde (52, 103) ortaya çıkmıştır. NAC ise etkisini yapısındaki tiyol bileşiği taşıyan bir antioksidan olmasından dolayı kurşunun yaptığı oksidatif strese karşı hücre içi sistein ve GSH düzeylerini arttırarak ya da serbest radikalleri sülfidril grubuyla bağlaması ile göstermiştir (5, 49, 52, 62, 101). Homosistein, sülfidrilli bir amino asit olup, vücutta sisteine ya da metiyonine

dönüştürülmektedir (38). Zappacosta ve ark. (155), yapmış oldukları *in vitro* çalışmada oksidan bir molekül olan H₂O₂'nin bir molünün üretimi için 4000 mol homosisteinin gerektiğini ve böylece pro-oksidan etki ile kalp-damar hastalıklarına neden olacağı ileri sürülen homosisteinin vücutta ürettiği H₂O₂'nin önemli miktarda olmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca luminol ile dihidrorodamin bileşiklerinin hipoklorit veya peroksinitrite ve metmyoglobinin ferrilmyoglobine oksidasyonunun homosistein ile inhibe edildiğini de göstermişlerdir (154). Bundan dolayı, homosisteinin mikromolar konsantrasyonlarda hücrel ve kimyasal sistemlerde prooksidan etki yerine antioksidan etki gösterdiği sonucuna ulaşmışlardır. Bizim çalışmamızda da homosistein kurşunun yükselttiği antioksidan enzim düzeylerini muhtemelen yukarıdaki antioksidan etki mekanizmaları ile daha düşük çıkmasına yol açmış olabilir.

β -karoten, lipit peroksidasyonunu engelleyerek; kanser, ateroskleroz, yaşlanmayla ilişkili makular dejenerasyon ve multipl skleroza yakalanma riskini azaltmaktadır (153). Kurşun zehirlenmesine karşı antioksidan etkisi, zengin β -karoten ve SOD enzimi içeren bir mavi yeşil alg olan *Spirulina fusiformis* verilen Swiss farelerinde incelenmiş ve farelerin sadece kurşun verilenlerden daha uzun süre yaşadıkları görülmüştür (120). Bu durumda endojen olarak vitamin A ve E, kurşuna bağlı olarak artan oksidatif stres ile ortaya çıkan ROS'un etkisizleştirilmesinde kullanılmaktadır. Çalışmamızda kullanılan sülfürlü antioksidan bileşiklerin kurşunun etkisiyle harcanan vitamin A ve E seviyelerine karşı ne kadar koruyucu etki gösterdikleri incelenmiştir.

Attri ve ark. (6), kurşunla uyarılmış deneysel hipertansiyon modelinde vitamin C'nin etkisini araştırmışlardır. Kurşun verilen grupta kontrole göre plazma lipit peroksidasyonunun (MDA) arttığını tespit etmişlerdir. Kurşun asetat verilen ratlarda plazma vitamin A (retinol) ve vitamin E (α -tokoferol) seviyeleri, kontrol ve vitamin C verilen gruptaki ratlardan önemli oranda düşük bulunmuştur. Ayrıca vitamin E ve A düzeylerinin vitamin C verilen grupta önemli şekilde yükseldiğini görmüşlerdir.

Farombi tarafından yapılan çalışmada (37); ağız yoluyla kloramfenikol verilen ratlarda oksidatif strese bağlı olarak karaciğerde sitozolik SOD seviyesi % 63 artarken, GSH-Px aktivitesi % 57 ve katalaz aktivitesi % 44 oranında düşmüş bulunmuştur. Kloramfenikol verilmesinin ardından serum vitamin A, C ve β -karoten seviyeleri önemli derecede düşmüş, mikrozomal lipit peroksidasyonu ise önemli

oranda artmış olarak ölçülmüştür. Bu durumda yazar, kloramfenikolün oluşturduğu oksidatif hasarın tedavisinde antioksidanlarla desteklemenin yararlı olacağını belirtmiştir.

Çalışmamızda plazma vitamin A düzeyleri kontrol grubuna göre kurşun-metiyonin grubunda hafif yüksek tespit edildi. Kurşun-lipoik asit ve kurşun-homosistein gruplarında anlamlı; kurşun ve kurşun-asetilsistein gruplarında ise anlamlı olmayan düşük seviyeler bulundu.

Kurşun grubuna göre plazma vitamin A düzeylerinin, kurşun-metiyonin grubunda anlamlı yükseldiği görüldü. Kurşun-lipoik asit ve kurşun-homosistein gruplarındaki düşük seviyelerin düşük seviyeler var iken; kurşun-asetilsistein grubundaki yükselmenin ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi.

Metiyonin tiyol grupları ile dokularda kurşun ile şelat oluşturarak ya da organizmada sisteine dönüştürülerek GSH sentezine katılmakta; GSH kurşunun oluşturduğu ROS'u temizleyerek antioksidan etki göstermektedir (5, 52, 62, 101). Bu durum yaptığımız çalışmada vitamin A seviyelerinin metiyonin verilen grupta daha yüksek çıkmasına neden olmuştur. Ayrıca vücutta oluşan β -karoten radikalinin daha sonra vitamin E tarafından tekrar β -karotene redüklendiği de belirtilmiştir (91). Muhtemelen buna bağlı olarak çalışmamızda E vitamini seviyeleri düşük; A vitamini seviyeleri yüksek olarak çıkmıştır.

Vitamin E, α -tokoferol biyolojik etkisinde olan 8 farklı bileşiğin ortak ismidir ve biyolojik membranlar ile lipoproteinleri oksidatif strese karşı koruyan yağda çözünebilen zincir kıran bir antioksidandır. Bilinen en önemli özelliği antioksidan etkisi ile peroksitleri ve serbest oksijen radikallerini nötralize edebilmesidir. Vitamin E, A vitamininin barsaktan absorpsiyonunu ve dokulardaki düzeyini artırır. Bu durum büyük bir olasılıkla, A vitamininin oksidasyonla kaybının azaltılmasına bağlıdır (87).

Vitamin E'nin ana biyolojik fonksiyonu, hücrelerin oksidatif strese yanıtlarını hücrel haber yollarını uyararak arttırmaktır. Bir diğer koruyucu etkisi ise kurşunla uyarılmış lipit peroksidasyonun arttırılmasının ve SOD ile katalaz aktivitelerinin inhibisyonunun engellenmesidir. Vitamin E ile diğer antioksidanlar arasındaki etkileşim, kurşun toksisitesine karşı daha güçlü bir koruyucu etki sağlamaktadır. Vitamin E ve C birlikte membranları lipit peroksidasyonuna karşı korumaktadır. Vitamin E membranların lipit fazına, vitamin C ise sulu faza yerleşmesine rağmen; vitamin C okside olan vitamin E'yi geri dönüştürmektedir (153).

Roughead ve ark. (113), dişi ratlarda farklı konsantrasyonlardaki demir, çinko ve bakır içeren diyetlerin antioksidan sistemler üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada; yüksek demir içeren diyetlerle besledikleri ratlarda karaciğer lipit peroksidasyonunun (TBARS) arttığını görmüşlerdir. Biyolojik membranlardaki lipit peroksidasyonuna karşı serbest radikalleri zincir kırıcı reaksiyonla elimine eden vitamin E'nin düzeylerini de vücudun antioksidan kapasitesinin bir ölçütü olarak tespit etmişlerdir. Karaciğer vitamin E düzeylerinin diyetlerinde yüksek oranda demir bulunan ratlarda kontrole göre önemli derecede azaldığını bulmuşlardır. Bu durumu lipit peroksidasyonu sonucu artan serbest radikalleri etkisizleştiren vitamin E'nin tükenmesine bağlamışlardır.

Nandhini ve ark. (95), fruktoz ile oksidatif stres oluşturulan ratların kalp ve böbreklerinde lipit peroksidasyonunun TBARS, konjuge dien, lipofuskin ve hidroperoksit düzeyleri olarak yükselmiş olduğunu tespit etmişlerdir. Kontrole göre vitamin E düzeylerini kalp ve böbrekte düşük bulmuşlardır. Bu düşüşün *in vivo* antioksidan olan vitamin E'nin lipit peroksit ürünleri nedeniyle azalmasıyla meydana geldiğini düşünmüşlerdir.

Çalışmamızda plazma vitamin E düzeylerindeki kontrol grubuna göre azalış kurşun, kurşun-lipoik asit ve kurşun-homosistein gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Kurşun-metiyonin ve kurşun-asetilsistein gruplarındaki düşmenin ise hafif düşük olduğu tespit edildi.

Kurşun grubuna göre plazma vitamin E düzeyleri kurşun-homosistein grubunda anlamlı düşük bulundu. Kurşun-metiyonin ve kurşun-asetilsistein gruplarındaki seviyelerdeki yükselme ile kurşun-lipoik asit grubundaki düşmenin anlamlı olmadığı tespit edildi.

Metiyonin ve NAC çeşitli koşullarda oksidatif stresi azaltan tiyol (-SH) içeren bir antioksidanlardır. Antioksidan etkilerini GSH sentezini uyararak, hücre içi GSH seviyelerini arttırarak ve ROS'u temizleyerek göstermektedirler (5, 49, 52, 62, 101). Ayrıca metiyoninin dokularda şelatör etkisi de bulunmaktadır (52, 62). Yaptığımız çalışmada da buna paralel olarak metiyonin ve NAC, serbest radikallerin plazmada oluşumunu azaltarak ya da onları etkisizleştirerek; vitamin E düzeyini kurşun verilen ratlara göre daha yüksek seviyede tutmuştur.

İn vitro çalışmalar kurşun uygulanmasının ardından ROS üretiminin arttığını göstermiştir (33, 50, 57, 152). *İn vivo* çalışmalar ise hayvanlarda ve işçilerde kurşun maruziyetinin ROS oluşumu ile antioksidan savunma sistemlerini değiştirdiğini

göstermiştir (20, 65, 97, 126). E vitamini, hücre membran fosfolipitlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikallerden korur ve lipit peroksil radikallerini yıkarak, lipit peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırır (15, 97, 117, 153). Patra ve ark. (103), tarafından vitamin E'nin ratlarda karaciğer ve beyinde kurşunun indüklediği lipit peroksidasyon seviyelerini azalttığı gösterilmiştir. Çalışmamızda yukarıdaki çalışmalara paralel şekilde kurşuna bağlı artmış lipit peroksidasyonuna bağlı olarak harcanan vitamin E seviyeleri, kurşun-lipoik asit ve kurşun-homosistein gruplarında düşük bulunmuştur. Ayrıca yukarıda daha önce belirtildiği gibi vücutta oluşan β -karoten radikalinin daha sonra vitamin E tarafından tekrar β -karotene redüklendiği de belirtilmiştir (91). Muhtemelen buna bağlı olarak da çalışmamızda E vitamini seviyeleri düşük; A vitamini seviyeleri yüksek olarak çıkmıştır.

Kurşunla indüklenen oksidatif stresin tam mekanizması günümüzde halen bilinmemektedir. Demir ve bakır gibi geçiş metallerinin aksine kurşun redoks aktif bir metal değildir. Fakat kurşun sülfidril grupları için yüksek afinite göstermektedir. GSH, sistein ve gama glutamilsistein gibi hücre içinde çözünebilir tiyol bileşikleri hücre proteinleri indirgenmiş halde tutma görevini yerine getirmek için redükte sülfidril grupları içermektedir. Kurşun bu sülfidril gruplarına bağlanarak, tiyol oksidasyon/redüksiyon reaksiyonlarını değiştirmekte ve GSH gibi redükte tiyollerin kaybı ile hücre fonksiyonları bozmaktadır. Kurşunla indüklenen oksidatif stres esnasında vücuttaki total antioksidanların durumunu inceleyen birçok çalışma yapılmıştır (34, 52).

Mousa ve ark. (92), dişi keçilere ağız yoluyla iki hafta boyunca kurşun asetat vermişler; GSH-Px, SOD, katalaz, total tiyol grupları, plazma TAK ve lipit peroksit düzeylerini tespit etmişlerdir. 7 gün sonunda eritrositlerin hemolizatlarındaki GSH-Px, SOD, katalaz, total tiyol grupları önemli derecede artmış; 14. gün ise tüm parametrelerde önemli derecede azalma meydana gelmiştir. Bu azalmanın 14. güne kadar olan lipit peroksit seviyelerindeki artışa bağlı olduğunu savunmuşlardır.

Patra ve Swarup (102), 28 gün erkek sığırlara içme sularıyla kurşun vermiş; eritrosit hemolizatlarında lipit peroksitler, SOD ve GSH-Px gibi enzimatik antioksidanlar ile total, proteine bağlı olan ve olmayan tiyol gruplarını ölçmüştür. Eritrosit SOD düzeylerinin ve plazmadaki total, proteine bağlı olan ve olmayan tiyol gruplarının istatistiksel olarak önemli derecede azaldığını, lipit peroksit düzeylerinin

ise arttığını bulmuşlardır. Sonucu kurşunun indüklediği oksidatif strese bağlamışlardır.

Abdollahi ve ark. (1), kurşun asetat verilen ratların tükürük salgıları ve çene altı tükürük bezinde tek başına ya da sildenafil veya teofilin gibi fosfodiesteraz inhibitörleri ile birlikte etkilerini incelemişlerdir. Kurşunun tükürük bezi ve salgılarında önemli derecede lipit peroksidasyonunu arttırdığını; total tiyol gruplarının miktarını ve antioksidan kapasitelerini düşürdüğünü tespit etmişlerdir. cAMP ve cGMP inhibitörleri olan teofilin ve sildenafilin kullanılması; kurşunla indüklenmiş oksidatif stres sonucu meydana gelen lipit peroksidasyonundaki artışı, total tiyol gruplarının miktarındaki ve antioksidan kapasitelerindeki azalışı geri çevirmiştir. Sonuç olarak yazarlar; kurşunun tükürük bezlerinde uyardığı oksidatif stresi cAMP ve cGMP seviyelerini arttırarak meydana getirdiğini bildirmişlerdir.

Polo-Romero ve ark. (104), ratlarda gliserolle indüklenen oksidatif strese bağlı akut böbrek yetmezliğinde NAC'ın total antioksidan düzeyi üzerine etkilerini incelemişlerdir. NAC'ın serum total antioksidan aktivitelerinde önemli olmayan ve glutatyon redüktazda ise önemli artış meydana getirdiğini tespit etmişlerdir.

Skrzydewska ve Farbiszewski (125), ratlara verdikleri metanolün karaciğer, eritrosit ve serum lipit peroksidasyonu ürünlerini arttırdığını; karaciğer GSH-Px, GR aktiviteleri ve GSH içeriği ile total antioksidan düzeylerini azalttığını saptamışlardır. Metanolün oluşturduğu oksidatif stresin ardından NAC verilmesinin lipit peroksidasyonunu azalttığını; eritrositler ve karaciğerdeki GSH düzeyi ile serum, eritrositler ve karaciğerdeki GSH-ilişkili enzimlerin aktivitelerini arttırdığını; TAK düzeyinde ise önemli derecede bir artışa neden olmadığını bildirmişlerdir.

Demasi ve ark. (23), ALA'nın vücutta oluşturduğu oksidatif stresi ve plazma antioksidan kapasitesi ile oksidatif stres arasındaki ilişkiyi incelemek için yaptıkları çalışmada akut (bir ve iki doz) ve uzamış (sekiz doz) şekilde ALA'yı (bir doz: 40 mg/kg) ratlara uygulamışlardır. İki doz uygulama sonrasında beyinde beş kat, karaciğerde % 50 ve soleus kasında ise dört kat kemiluminesans yoğunluğunda artış meydana gelmiştir. Dokulardaki kemiluminesans bir ve iki doz uygulama sonrasında artmış, sekiz doz uygulama sonrasında ise azalmıştır. Luminol/2-amidinopropan sistemi ile ölçülen plazma antioksidan kapasitesi de benzer bir şekilde iki doz uygulama sonrasında maksimum düzeyde artış göstermiş; uzamış uygulama sonrasında ise azalmıştır. Bu çalışma sonrasında yazarlar plazma antioksidan

sisteminin ALA uygulaması ile indüklendiğini ve doku kemiluminesansın ALA ile pozitif korelasyon gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

Yaptığımız çalışmada karaciğerde total antioksidan kapasitesi düzeyleri kontrol grubuna göre kurşun, kurşun-metiyonin, kurşun-asetilsistein ve kurşun-homosistein gruplarında hafif yüksek olarak; kurşun-lipoik asit grubunda ise anlamlı olmayan düşük seviyelerde tespit edildi.

Kurşun grubuna göre karaciğer total antioksidan kapasitesi düzeyleri tüm sülfürlü antioksidan verilen gruplarda istatistiksel olarak anlamlı olmayan düşük bulundu.

Kontrol grubuna göre böbrek total antioksidan kapasitesi düzeylerindeki yükselmenin kurşun-metiyonin, kurşun-lipoik asit gruplarında anlamlı; kurşun, kurşun-asetilsistein ve kurşun-homosistein gruplarında ise anlamlı olmayan yüksek olduğu bulundu.

Kurşun grubuna göre böbrek total antioksidan kapasitesi düzeyleri kurşun-metiyonin ve kurşun-lipoik asit gruplarında anlamlı yüksek sonuçlar verdi. Kurşun-asetilsistein ve kurşun-homosistein gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan yüksek bulundu.

Kontrol grubuna göre beyin total antioksidan kapasitesi düzeyleri kurşun, kurşun-metiyonin, kurşun-asetilsistein ve kurşun-homosistein gruplarında hafif düşük bulundu. Kurşun-lipoik asit grubunda ise hafif yüksek seviyelerde tespit edildi.

Kurşun grubuna göre beyin total antioksidan kapasitesi düzeyleri tüm sülfürlü antioksidan verilen gruplarda istatistiksel olarak anlamlı olmayan yüksek bulundu.

Yaptığımız çalışmada kurşunun dokuları etkileme düzeylerine göre karaciğer ve böbrekte oluşan oksidatif strese yanıt olarak total antioksidan düzeylerinde kontrol grubuna göre bir artış yaşanmıştır. Beyinde ise bu durum kurşunun kan-beyin bariyerinden yavaş geçmesi nedeniyle perdelenmiştir (67, 141, 148). Karaciğerde sitokrom P₄₅₀'nin sentezlenmesi için Hem gerekmekte; Hem biyosentezi esnasında ALAD enzimi ise kurşun tarafından engellendiği için ortamda ALA birikmektedir (93, 105). Ayrıca kurşunun karaciğerde yaptığı oksidatif strese bağlı olarak AST ve ALT düzeylerinde de artış görülmektedir (141, 148). Kurşun ve ALA'nın vücuttan başlıca itrah yeri böbreklerdir (67, 141, 148). Goyer ve Ryne (48) böbreklerin nefronlarının özellikle proksimal tubuluslarının kurşuna duyarlı olduğunu belirtmişlerdir. Böbrek tubulus epitel hücreleri kurşunu bazolateral kısımdan aktif

transport ile serbest iyon şeklinde alırlar (136). Yukarıda mekanizma ile proksimal tubuluslar ve süzülme esnasında glomerüllerin kurşuna maruz kalması sonucunda glomerüler filtrasyon, böbrek klerensi ve tubular reabsorpsiyon etkilenir. Gelişen böbrek yetmezliğine bağlı olarak idrardaki üre, ürik asit, kreatinin, protein, fosfor miktarları ve idrar ile böbrekteki ALP, ACP, γ -GT, β -glukuronidaz aktiviteleri yükselir (123). Karaciğerde kurşunun uyardığı oksidatif strese bağlı olarak ve Hem sentezinin engellenmesi ile ortamda ALA birikmesi ile böbreklerin ise kurşun ve ALA'nın başlıca vücuttan uzaklaştırıcı organ olması nedeniyle bu organlarda ALA'nın indüklemesi ile total antioksidan kapasitesinde bir artış gözlenmiştir. Ayrıca karaciğer ve böbrek TAK seviyeleri, kurşunun muhtemelen uyarıcı etkisiyle eritrosit SOD seviyelerinde de meydana getirdiği gibi kontrole göre yüksek sonuçlar vermiştir.

SONUÇ

Kurşun maruziyetine bağlı olarak reaktif oksijen türlerinin meydana gelmesi hücrelerin antioksidan elemanlarının salınımına ve sonrasında tükenmesine neden olur. Kurşunun sebep olduğu oksidatif stresin ana nedeni hücrelerin prooksidan/antioksidan dengesini bozmasıdır. Birçok araştırmacının da hemfikir olduğu gibi kurşunla arttırılmış oksidatif hasar; metiyonin, α -lipoik asit, N-asetilsistein ve homosistein gibi sülfür içeren antioksidan bileşiklerin hayvan ve insanlara koruyucu olarak verilmesi ile azaltılabilir. Sülfür içeren antioksidanlardan metiyonin ve α -lipoik asit verilmesiyle kurşuna bağlı azalan Hb seviyeleri yükseltilmiş; etkisi incelen tüm antioksidan bileşikler ile kurşunla artmış serum MDA seviyeleri düşürülmüş; kurşunla indüklenerek artan eritrosit SOD ve GSH-Px α -lipoik asit ile düşürülmüş; kurşunla azalan plazma vitamin A seviyeleri metiyonin ile yükseltilmiştir. Gelecekte çeşitli dozlarda kurşun maruziyeti sonrasında ya da yukarıdaki bileşiklerin kombine kullanıldığı deneysel çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Abdollahi M, Fooladian F, Emami B, Zafari K, Bahreini-Moghadam A. (2003). Protection by sildenafil and theophylline of lead acetate-induced oxidative stress in rat submandibular gland and saliva. *Hum Exp Toxicol.* 22: 587-592.
2. Akkuş İ. (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza yayınları, Konya.
3. Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Suzuki K, et al. (2004). In vivo role of myeloperoxidase for the host defense. *Jpn J Infect Dis.* 57: 15.
4. Arner ESJ, Holmgren A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* 267: 6102-6109.
5. Atmaca G. (2004). Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids. *Yonsei Med J.* 45: 776-788.
6. Attri J, Dhawan V, Mahmood S, Pandhi P, Parwana HK, Nath R. (2003). Effect of vitamin C supplementation on oxidative DNA damage in an experimental model of lead-induced hypertension. *Ann Nutr Metab* 47: 294-301.
7. Baker DH. (1986). Utilization of isomers and analogs of amino acids and other sulfur-containing compounds. *Prog Food Nutr Sci* 10: 133-178.
8. Baker DH, Czarnecki-Maulden GL. (1987). Pharmacologic role of cysteine in ameliorating or exacerbating mineral toxicities. *J Nutr* 117: 1003-1010.
9. Barlas A, Cevik H, Arbak S, Bangir D, Sener G, Yegen C, et al. (2004). Melatonin protects against pancreaticobiliary inflammation and associated remote organ injury in rats: role of neutrophils. *J Pineal Res* 37: 267-275.
10. Bechara EJH. (1996). Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid. *Braz J Med Biol Res* 29: 841-851.
11. Bergdahl IA. (1997). Lead binding to δ -aminolevulinic acid dehydratase in human erythrocytes. *Pharmacol. Toxicol.* 81: 153-158.
12. Bloodsworth A, O'Donnell VB, Freeman BA. (2000). Nitric oxide regulation of free radical- and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20: 1707-1715.
13. Borek C. Antioxidant health effects of aged garlic extract. (2001). *J Nutr.* 131: 1010-1015.
14. Bray TM, Bettger WJ. (1990). The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radic Biol Med* 8: 281-291.
15. Burton GW. (1994). Vitamin E: molecular and biological function. *Pro Nutr Sco* 53: 251-262.
16. Calderon-Salinas JV, Hernandez-Luna C, Maldonado M, Saenz DR. (1993). Mechanisms of the toxic effect of lead. I. Free lead in erythrocyte. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 3: 153-164.

17. Can G, Yapıcı G, Şahin Ü, Kızılar AR, Demirci Ç, Toprak S, et al. (1997). Tekirdağ ili merkezinde yaşayan 1-6 yaş grubu çocuklarda kan kurşun düzeylerinin değerlendirilmesi, I.Ulusal Çevre Hekimliği Kongresi, Ankara, 9.
18. Charles HW, Arscott LD, Muller S, Lennon BW, Ludwig ML, Wang PF, et al. (2000). Thioredoxin reductase: Two modes of catalysis have evolved. *Eur J Biochem* 267: 6110-6117.
19. Coffey MD, Cole RA, Colles SM, Chisolm GM. (1995). In vitro cell injury by oxidized low density lipoprotein involves lipid hydroperoxide-induced formation of alkoxyl, lipid, and peroxy radicals. *J Clin Invest.* 96: 1866-1873.
20. Costa CA, Trivelato GC, Pinto AMP, Bechara EJ. (1997). Correlation between plasma 5- aminolevulinic acid concentrations and indicators of oxidative stress in lead-exposed workers. *Clin Chem.* 43: 1196-1202.
21. Cunningham C, Tipton KF, Dixon HB. (1998). Conversion of taurine into N-chlorotaurine (taurine chloramine) and sulphoacetaldehyde in response to oxidative stress. *Biochem J.* 330: 939-945.
22. De Grey AD. (2002). HO₂[·] : the forgotten radical. *DNA Cell Biol* 21: 251-257.
23. Demasi M, Costa CA, Pascual C, Llesuy S, Bechara EJ. (1997). Oxidative tissue response promoted by 5-aminolevulinic acid promptly induces the increase of plasma antioxidant capacity. *Free Radic Res.* 26: 235-243.
24. Dhawan M, Kachru DN, Tandon SK. (1988). Influence of thiamine and ascorbic acid supplementation on the antidotal efficacy of thiol chelators in experimental lead intoxication. *Arch Toxicol* 62: 301-304.
25. Dhawan M, Flora SJS, Tandon SK. (1989). Preventive and therapeutic role of vitamin E in chronic plumbism. *Biomed Environ Sci* 2: 335-340.
26. Dickey LE, Weihrauch JL. (1988). Nutrition Monitoring Division. Human Nutrition Information Service, USDA Superintendent of Documents, Washington DC: US Government Printing Office, P 194.
27. Ding Y, Gonick HC, Vaziri ND. (2000). Lead promotes hydroxyl radical generation and lipid peroxidation in cultured aortic endothelial cells. *Am J Hypertens* 13: 552-555.
28. Dock L. (1989). Induction of rat liver glutathione transferase isoenzyme 7-7 by lead nitrate. *Biol. Trace Element Res* 21: 283-288.
29. Donaldson WE. (1991). Interaction of dietary lead with fish oil and antioxidant in chicks. *Biol Trace Elem Res* 31: 215-222.
30. El-Missiry MA. (2000). Prophylactic effect of melatonin on lead-induced inhibition of heme biosynthesis and deterioration of antioxidant systems in male rats. *J Biochem Mol Toxicol* 14: 57-62.
31. El-Sokkary GH, Kamel ES, Reiter RJ. (2003). Prophylactic effect of melatonin in reducing lead-induced neurotoxicity in the rat. *Cell Mol Biol Lett.* 8: 461-470.

32. Ercal N, Treeratphan P, Hammond TC, Matthews RH, Granneman NH, Spitz DR. (1996). In vivo indices of oxidative stress in lead-exposed C57BL/6 mice are reduced by treatment with meso-2,3-dimercaptosuccinic acid or N-acetylcysteine. *Free Radic Biol Med* 21: 157-161.
33. Ercal N, Treeratphan P, Lutz P, Hammond TC, Matthews RH. (1996). N-acetylcysteine protects Chinese hamster ovary (CHO) cells from lead-induced oxidative stress. *Toxicology*. 108: 57-64.
34. Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. (2001). Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem*. 1: 529-539.
35. Erel O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*. 37: 277-285.
36. Fang YZ, Yang S, Wu G. (2002). Free Radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18: 872-879.
37. Farombi EO. (2001). Antioxidant status and hepatic lipid peroxidation in chloramphenicol-treated rats. *Tohoku J Exp Med* 194: 91-98.
38. Finkelstein JD, Martin JJ, Harris BJ. (1988). Methionine metabolism in mammals. The methionine-sparing effect of cystine. *J Biol Chem*. 263: 11750-11754.
39. Flora GJ, Seth PK. (1999). Beneficial effects of S-adenosyl-L-methionine on aminolevulinic acid dehydratase, glutathione, and lipid peroxidation during acute lead-ethanol administration in mice. *Alcohol*. 18: 103-108.
40. Fridovich I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol*. 201: 1203-1209.
41. Fujita H, Orii Y, Sano S. (1981). Evidence of the increased synthesis of δ -aminolevulinic acid dehydratase in lead poisoned rats. *Biochim. Biophys. Acta* 678: 39-50.
42. Fujita H, Sato K, Sano S. (1982). Increase in amount of erythrocyte δ -aminolevulinic acid dehydratase in workers with moderate exposure to lead. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 50: 287-297.
43. Fujita H, Bishop TR, Ishida N. (1994). Toxicology and molecular biology of δ -levulinic acid dehydratase. In: regulation of heme protein synthesis, edited by H. Fujita, Alphen, OH, Pp 27-39.
44. Fujita H, Ishihara N. (1988). Evidence of the induction of de novo synthesis of δ -aminolevulinic acid dehydratase by lead. *Br. J. Indust. Med*. 45: 710-712.
45. Fujita H. (1999). Measurement of ALA dehydratase activity. In: Current protocols in toxicology, edited by M. Maines, LG Costa, E Hodgson DJ Reed & IG Sipes, John Wiley & Sons, New York, Pp 8.6.1-8.6.11.
46. Fujita H, Nishitani C, Ogawa K. (2002). Lead, chemical porphyria, and heme as a biological mediator. *Tohoku J Exp Med*. 196: 53-64.

47. Girotti, AW. (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 39: 1529-1542.
48. Goyer RA, Ryne B. (1973). Pathological effects of lead. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 12: 1-77.
49. Gurer H, Ozgunes H, Neal R, Spitz DR, Ercal N. (1998). Antioxidant effects of N-acetylcysteine and succimer in red blood cells from lead-exposed rats. *Toxicology.* 128: 181-189.
50. Gurer H, Ozgunes H, Oztezcan S, Ercal N. (1999). Antioxidant role of alpha-lipoic acid in lead toxicity. *Free Radic Biol Med* 27: 75-81.
51. Gurer H, Neal R, Yang P, Oztezcan S, Ercal N. (1999). Captopril as an antioxidant in lead-exposed Fischer 344 rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 18: 27-32.
52. Gurer H, Ercal N. (2000). Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Rad and Biol* 29: 927-945.
53. Gurer H, Ozgunes H, Saygin E, Ercal N. (2001). Antioxidant effect of taurine against lead induced oxidative stress. *Arch Environ Contam Toxicol* 41: 397-402.
54. Guzik TJ, Korbut R, Adamek-Guzik T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol.* 54: 469-487.
55. Hermes-Lima M, Pereira B, Bechara, EJH. (1991). Are free radicals involved in lead poisoning? *Xenobiotica* 21: 1085-1090.
56. Hermes-Lima M, Valle VGR, Vercesi AE, Bechara EJ. (1991). Damage to rat liver mitochondria promoted by d-aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species: connections with acute intermittent porphiria and lead poisoning. *Biochim Biophys Acta* 1056: 57-63.
57. Hsu JM. (1981). Lead toxicity related to glutathione metabolism. *J. Nutr.* 111: 26-33.
58. Hsu PC, Guo YL. (2002). Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology.* 180: 33-44.
59. Işıklı B, Demir TA, Berber A, Kalyoncu C. (1998). Yol kenarı toprak ve bitkilerinde kurşun birikimi. VI. Ulusal Halk Sağlığı Kongresi Adana, 414.
60. Jackson MJ. (1999). An overview of methods for assessment of free radical activity in biology. *Proc Nutr Soc* 58: 1001.
61. James MF, Hift RJ. (2000). Porphyrins. *Br J Anaesth.* 85: 143-153.
62. Kalia K, Flora SJS. (2005). Strategies for safe and effective therapeutic measures for chronic arsenic and lead poisoning. *J. Occup. Health* 47: 1-21.
63. Kang AH, Trelstad RL. (1973). A collagen defect in homocystinuria. *J. Clin. Invest.* 52: 2571- 2578.
64. Karakaya A, Ilko M, Uluşu T, Akal N, Karakaya AE. (1996). Deciduous teeth of children from Urban and Suburban regions in Ankara (Turkey). *Bull Environ Contam Toxicol* 56: 16-20.

65. Kasperczyk S, Birkner E, Kasperczyk A, Zalejska-Fiolka J. (2004). Activity of superoxide dismutase and catalase in people protractedly exposed to lead compounds. *Ann Agric Environ Med* 11: 291-296.
66. Kasperczyk S, Kasperczyk A, Ostalowska A, Dziwisz M, Birkner E. (2004). Activity of glutathione peroxidase, glutathione reductase, and lipid peroxidation in erythrocytes in workers exposed to lead. *Biol. Trace Element Res* 102: 611-72.
67. Kaya S, Akar F. (1998). *Metaller ve diğer inorganik ve radyoaktif maddeler*. Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A. (editörler). *Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji*. 2. Baskı. Ankara: Medisan Yayınları. Sayfa 134-138.
68. Kim YG, Kim SK, Kwon JW, Park OJ, Kim SG, Kim YC, et al. (2003). Effects of cysteine on amino acid concentrations and transsulfuration enzyme activities in rat liver with protein calorie malnutrition. *Life Sci* 72: 1171-1181.
69. Kleinman WA, Richie JP Jr. (2000). Status of glutathione and other thiols and disulfides in human plasma. *Biochem Pharmacol* 60: 19-29.
70. Knowles SO, Donaldson WE. (1990). Dietary modification of lead toxicity: effects on fatty acid and eicosanoid metabolism in chicks. *Comp Biochem Physiol C* 95: 99-104.
71. Kocabıyık N, Doğan F. (1993). İzmir'de trafiğin yoğun olduğu kavşaklarda çalışan genç trafik polislerinde egzoz kurşununa maruziyet. III. Halk Sağlığı Günleri: Sayfa 374-378.
72. Köse K, Doğan P. (1992). Lipid peroksidasyonu. *Erciyes Tıp Dergisi Ek-1*: 340-350.
73. Kumar SK, Rowse C, Hochstein P. (1978). Copper-induced generation of superoxide in human red cell membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 83: 587-592.
74. Lachant NA, Tomoda A, Tanaka KR. (1984). Inhibition of the pentose phosphate shunt by lead: a potential mechanism for hemolysis in lead poisoning. *Blood* 63: 518-524.
75. Lawton LJ, Donaldson WE. (1991). Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. *Biol Trace Elem Res*. 28: 83-97.
76. Leong WI, Bowlus CL, Tallkvist J, Lonnerdal B. (2003). DMT1 and FPN1 expression during infancy: developmental regulation of iron absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 285: 1153-1161.
77. Levander OA, Morris VC, Ferretti RJ. (1977). Filterability of erythrocytes from vitamin E-deficient lead-poisoned rats. *J Nutr* 107: 363-372.
78. Levine RL, Berlett BS, Moskovitz J, Mosoni L, Stadtman ER. (1999). Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech Ageing Dev*. 107: 323-332.
79. Lowry OH, Rosebrough MJ, Farr L, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin's phenol reagent. *J Biochem*. 193: 265-275.
80. Lu C, Yao S, Lin N. (2001). Studies on reactions of oxidizing sulfur-sulfur three-electron-bond complexes and reducing alpha-amino radicals derived from OH reaction with methionine in aqueous solution. *Biochem Biophys Acta* 525: 89-96.

81. Machartova V, Racek J, Kohout J, Senft V, Trefil L. (2000). Effect of antioxidant therapy on indicators of free radical activity in workers at risk of lead exposure. *Vnitr Lek* 46: 444-446.
82. Machlin LJ, Bendich A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* 1: 441-445.
83. Marnett LJ, Riggins JN, West JD. (2003). Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin Invest.* 111: 583-593.
84. May JM. (1999). Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? *Faseb J.* 13: 995-1006.
85. Mayes P. (2000). Abiologic Oxidation. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. (editors). *Harper's Biochemistry.* 25. Baskı. Stamford: Appleton & Lange. Pp 130-137.
86. McGowan C. (1989). Influence of vitamin B6 status on aspects of lead poisoning in rats. *Toxicol Lett.* 47: 87-93.
87. Meram İ, Köylüoğlu O, Tarakçıoğlu E. (2001). E vitamini ve klinik önemi. *İbni Sina Tıp Dergisi.* 6: 1-5.
88. Moini H, Packer L, Saris NE. (2002). Antioxidant and prooxidant activities of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol Appl Pharmacol* 182: 84-90.
89. Monteiro HP, Abdalla DSP, Arcurl AS, Bechara EHJ. (1985). Oxygen toxicity related to exposure to lead. *Clin. Chem.* 31: 1673-1676.
90. Monteiro HP, Abdalla DS, Faljoni-Alario A, Bechara EJ. (1986). Generation of active oxygen species during coupled autoxidation of oxyhemoglobin and delta-aminolevulinic acid. *Biochim Biophys Acta.* 881: 100-106.
91. Mortensen A, Skibsted LH. (1997). Relative stability of carotenoid radical cations and homologue tocopheroxyl radicals. A real time kinetic study of antioxidant hierarchy. *FEBS Lett.* 417: 261-266.
92. Mousa HM, Al-Qarawi AA, Ali BH, Abdel Rahman HA, ElMougy SA. (2002). Effect of lead exposure on the erythrocytic antioxidant levels in goats. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 49: 531-534.
93. Murray RK. (2000). Porphyrins and Bile Pigments. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. (editors). *Harper's Biochemistry.* 25. Baskı. Stamford: Appleton & Lange. Pp 359-373.
94. Mylorie AA, Collins H, Umbles C, Kyle J. (1986). Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicol. Appl Pharmacol* 82: 512-520.
95. Nandhini AT, Thirunavukkarasu V, Ravichandran MK, Anuradha CV. (2005). Effect of taurine on biomarkers of oxidative stress in tissues of fructose-fed insulin-resistant rats. *Singapore Med J* 46: 82-87.

96. Neal R, Yang P, Fiechtl J, Yildiz D, Gurer H, Ercal N. (1997). Pro-oxidant effect of δ -aminolevulinic acid on Chinese hamster ovary cells. *Toxicol. Lett.* 91: 169-178.
97. Nordberg J, Arner ES. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants and mammalian thierodoxin systems. *Free Radical Biol Med* 31: 1287-1312.
98. Othman AI, El-Missiry MA. (1998). Role of selenium against lead toxicity in male rats. *J Biochem Mol Toxicol* 12: 345-349.
99. Önel P. (2002). Amino asitlerin özel metabolizmaları. Onat T, Emerck K (editörler). *Temel Biyokimya, Birinci baskı, Ankara, Palme yayıncılık; Sayfa 199-214.*
100. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. (1995). Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 19: 227-250.
101. Parcell S. (2002). Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Altern Med Rev.* 7: 22-44.
102. Patra RC, Swarup D. (2000). Effect of lead on erythrocytic antioxidant defence, lipid peroxide level and thiol groups in calves. *Res Vet Sci* 68: 71-74.
103. Patra RC, Swarup D, Dwivedi SK. (2001). Antioxidant effects of alpha tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. *Toxicology.* 162: 81-88.
104. Polo-Romero FJ, Fernandez-Funez A, Broseta Viana L, Atienza MP, Sanchez Gascon F. (2004). Effect of N-acetylcysteine on antioxidant status in glycerol-induced acute renal failure in rats. *Ren Fail* 26: 613-618.
105. Ponka P. (1997). Tissue-specific regulation of iron metabolism and Heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. *Blood* 89: 1-25.
106. Pryor WA, Porter NA. (1990). Suggested mechanism for the production of 4-hydroxy-2-nonenal from the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biol Med* 8: 541-543.
107. Qi R, Wang Z. Pharmacological effects of garlic extract. (2003). *Trends Pharmacol Sci.* 24: 62-63.
108. Reed DJ. (1990). Glutathione: toxicological implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 30: 603-631.
109. Reiter RJ, Tan DX, Gitto E, Sainz RM, Mayo JC, Leon J, et al. (2004). Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage. *Pol. J Pharmacol.* 56: 159-170.
110. Ribarov SR, Benov LC. (1981). Relationship between the hemolytic action of heavy metals and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 640: 721-726.
111. Rinaldi R, Eliasson E, Swedmark S, Morgenstern R. (2002). Reactive intermediates and the dynamics of glutathione transferases. *Drug Metab Dispos* 30: 1053-1058.
112. Rogers LE, Battles ND, Reimold EW, Sartain, P. (1971). Erythrocyte enzymes in experimental lead poisoning. *Arch Toxikol* 28: 202-207.

113. Roughead ZK, Johnson LK, Hunt JR. (1999). Dietary copper primarily affects antioxidant capacity and dietary iron mainly affects iron status in a surface response study of female rats fed varying concentrations of iron, zinc and copper. *J Nutr.* 129: 1368-1376.
114. Sandhir R, Julka D, Gill KD. (1994). Lipoperoxidative damage on lead exposure in rat brain and its implications on membrane bound enzymes. *Pharmacol. Toxicol.* 74: 66-71.
115. Sandhir R, Gill KD. (1995). Effect of lead on lipid peroxidation in liver of rats. *Biol Trace Elem Res* 48: 91-97.
116. Satoh K. (1978). Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chem Acta* 90: 37-43.
117. Seven A, Candan G. (1996). Antioksidan savunma sistemleri. *Cerrahpaşa J Med* 1996; 27: 41-50.
118. Sevinç E, Kösecik M, Koçyiğit A, Soran M, Bazı MT, Ertuş T, et al. (2004). Şanlıurfa ilinde oto tamir atölyelerinde çalışan çıraklarda saç ve kan kurşun düzeyleri ve hematolojik değerler üzerine etkileri. *Harran Tıp Fak Der* 1: 33-38.
119. Shafiq-Ur-Rehman. (1984). Lead-induced regional lipid peroxidation in brain. *Toxicol Lett.* 21: 333-337.
120. Shastri D, Kumar M, Kumar A. (1999). Modulation of lead toxicity by *Spirulina fusiformis*. *Phytother Res* 13: 258-260.
121. Simon JA, Hudes ES. (1999). Relationship of ascorbic acid to blood lead levels. *JAMA* 281: 2289-2293.
122. Sivaprasad R, Nagaraj M, Varalakshmi P. (2004). Combined efficacies of lipoic acid and 2,3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver. *J Nutr Biochem.* 15: 18-23.
123. Sivaprasad R, Malarkodi SP, Varalakshmi P. (2004). Therapeutic efficacy of lipoic acid in combination with dimercaptosuccinic acid against lead-induced renal tubular defects and on isolated brush-border enzyme activities. *Chem. Biol. Interact.* 147: 259-271.
124. Skoczynska A, Smolik A, Jelen M. (1993). Lipid abnormalities in rats given small doses of lead. *Arch. Toxicol.* 67: 200-204.
125. Skrzydlewska E, Farbiszewski R. (1999). Protective effect of N-acetylcysteine on reduced glutathione, reduced glutathione-related enzymes and lipid peroxidation in methanol intoxication. *Drug Alcohol Depend* 57: 61-67.
126. Solliway BM, Schaffer A, Pratt H, Yannai S. (1996). Effects of exposure to lead on selected biochemical and hematological variables. *Pharmacol Toxicol.* 78: 18-22.
127. Soltaninejad K, Kebriaeezadeh A, Minaiee B, Ostad SN, Hosseini R, Azizi E, et al. (2003). Biochemical and ultrastructural evidences for toxicity of lead through free radicals in rat brain. *Hum. Exp. Toxicol.* 22: 417-423.

128. Somashekaraiah B, Padmaja K, Prasad AR. (1992). Lead-induced lipid peroxidation and antioxidant defense components of developing chick embryos. *Free Radic Biol Med* 13: 107-114.
129. Stadtman ER, Van Remmen H, Richardson A, Wehr NB, Levine RL. (2005). Methionine oxidation and aging. *Biochem Biophys Acta* 1703: 135-140.
130. Sugawara E, Nakamura K, Miyake T, Fukumura A, Seki Y. (1991). Lipid peroxidation and concentration of glutathione in erythrocytes from workers exposed to lead. *Br J Ind Med* 48: 239-242.
131. Suzuki YJ, Tsuchiya M, Packer L. (1993). Antioxidant activities of dihydrolipoic acid and its structural homologues. *Free Radic Res Commun.* 18: 115-122.
132. Suzuki T, Morimura S, Diccianni MB, Yamada R, Hochi S, Hirabayashi M, et al. (1996). Activation of glutathione transferase P gene by lead requires glutathione transferase P enhancer I. *J. Biol Chem* 271. 1626-1632.
133. Tandon SK, Flora SJS, Singh S. (1987). Influence of pyridoxine (vitamin B6) on lead intoxication in rats. *Ind Health* 25: 93-96.
134. Tarimci N, Sener S, Kilinc T. (1997). Topical sodium sulfacetamide/sulfur lotion. *J Clin Pharm Ther.* 22: 301.
135. UN/ECE Task Force to Phase Out Leaded Petrol in Europe. (1998). Country Assessment Report. Arhus, Denmark.
136. Vander AJ, Mouw DR, Cox J, Johnson B. (1979). Lead transport by renal slices and its inhibition by tin. *Am. J. Physiol.* 236: 373-378.
137. Varela-Moreiras G. (2001). Nutritional regulation of homocysteine: effects of drugs. *Biomed Pharmacother* 55: 448-453.
138. Vavrinkova H, Tutterova M, Stopka P, Divisova J, Kazdova L, Drahota Z. (2001). The effect of captopril on nitric oxide formation and on generation of radical forms of mitochondrial respiratory chain compounds in ischemic rat heart. *Physiol Res.* 50: 481-489.
139. Verhoef P, Stampfer MJ, Buring JE, Gaziano JM, Allen RH, et al. (1996). Homocysteine metabolism and risk of myocardial infarction: relation with vitamins B₆, B₁₂, and folate. *Am J Epidemiol.* 143: 845-859.
140. Warren MJ, Cooper JB, Wood SP, Shoolingin-Jordan PM. (1998). Lead poisoning, haem synthesis and 5-aminolaevulinic acid dehydratase. *Trends Biochem Sci.* 23: 217-221.
141. WHO. (1995). World Health Organisation. International Programme on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 165. Inorganic lead. Geneva.
142. WHO. (2000). Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. WHO Food Additives Series 44. Geneva.
143. Wlodek L. (2002). Beneficial and harmful effects of thiols. *Pol. J Pharmacol* 54: 215-223.

144. Yagi K. (1984). Assay of blood plasma or serum for serum. *Methods Enzymol.* 105: 328-331.
145. Yalçın AS. (1998). Antioksidanlar. *Klinik gelişim* 11: 342-346.
146. Yang CS, Chhabra SK, Hong JY, Smith TJ. (2001). Mechanisms of inhibition of chemical toxicity and carcinogenesis by diallylsulfide (DAS) and related compounds from garlic. *J Nutr.* 131: 1041-1045.
147. Yapıcı GE. (1999). Silivri merkezde yaşayan 6 ay-6 yaş arası çocuklarda asemptomatik kurşun zehirlenmesi prevalansı–Bir epidemiolojik çalışma. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Uzmanlık Tezi. İstanbul.
148. Yapıcı G, Can G, Şahin Ü. (2002). Çocuklarda asemptomatik kurşun zehirlenmesi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 33: 197-204.
149. Yapıcı G, Can G, Kiziler AR, Aydemir B, Timur IH. (2005). Childhood lead and cadmium exposure in a coal mining area in Yatagan, Turkey. *CEHCA-2005 Children's Environmental Health in Central Asia, Almaata, Kazakistan*, 216-217.
150. Yardim-Akaydin S, Ozkan Y, Ozkan E, Torun M, Simsek B. (2003). The role of plasma thiol compounds and antioxidant vitamins in patients with cardiovascular diseases. *Clin Chim Acta.* 338: 99-105.
151. Yılmaz B, Aydın M, Kaya H, Kutlu S, Dorucu M, Cosan H, et al. (2005). Environmental lead contamination and blood lead levels in children and adults in Keban district. *CEHCA-2005 Children's Environmental Health in Central Asia, Almaata, Kazakistan*, 217.
152. Yiin SJ, Lin TH. (1995). Lead-catalyzed peroxidation of essential unsaturated fatty acid. *Biol Trace Elem Res* 50: 167-172.
153. Young IS, Woodside JV. (2001). Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 54: 176-186.
154. Zappacosta B, Mordente A, Persichilli S, Giardina B, De Sole P. (2000). Effect of homocysteine on polymorphonuclear leukocyte activity and luminol-dependent chemiluminescence. *Luminescence* 16: 165-168.
155. Zappacosta B, Mordente A, Persichilli S, Minucci A, Carlino P, Martorana GE, et al. (2001). Is homocysteine a pro-oxidant? *Free Radic Res.* 35: 499-505.
156. Zhou J, Moller J, Danielsen CC, Bentzon J, Ravn HB, Austin RC, et al. (2001). Dietary supplementation with methionine and homocysteine promotes early atherosclerosis but not plaque rupture in apoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21: 1470-1476.

8. ÖZGEÇMİŞ

1977'de Denizli'de doğdum. İlk, orta öğrenimimi Denizli'de; lise öğrenimimi Antalya Aksu Anadolu Öğretmen Lisesi'nde tamamladım. 2000 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden İkincilikle mezun oldum. 2000 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalında Doktora öğrenimime başladım. Halen Tekirdağ İli Marmara Ereğlisi İlçesi Yeniçiftlik Belediyesi'nde Veteriner Hekim olarak çalışmaktayım. Evliyim.