T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PARAQUAT MARUZİYETİNE BAĞLI OLUŞACAK AKCİĞER HASARINDA N-ASETİLSİSTEİN AMİD'İN OLASI KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

NESRİN AYDOĞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

MALATYA
TEMMUZ 2011

Tezin Başlığı: **Paraquat Maruziyetine Bağlı Oluşacak Akciğer Hasarında N-Asetilsistein Amid'in Olası Koruyucu Etkisinin Araştırılması**

Tezi Hazırlayan: **Nesrin Aydoğan**

Sınav Tarihi:14.07.2011

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi Üyeleri

Prof. Dr. İsmet YILMAZ ……

Doç. Dr. Burhan ATEŞ (Danışman) ……..……...

Yrd.Doç. Dr. İlknur ÖZDEMİR ...……..

Prof. Dr. Asım KÜNKÜL
Enstitü Müdürü

ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum "**Paraquat Maruziyetine Bağlı Oluşacak Akciğer Hasarında N-Asetilsistein Amid'in Olası Koruyucu Etkisinin Araştırılması**" başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Nesrin Aydoğan

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PARAQUAT MARUZİYETİNE BAĞLI OLUŞACAK AKCİĞER HASARINDA N-ASETİLSİSTEİN AMİD'İN OLASI KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Nesrin AYDOĞAN

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

xiii + 65 sayfa

2011

Danışman: Doç. Dr. Burhan ATEŞ

N-Asetilsistein Amid (NACA), N-asetilsistein'in (NAC) karboksil grubu nötralize edilerek yeni sentezlenmiş güçlü antioksidan özellikleri öne çıkan bir moleküldür. Bu çalışmada paraquat (PQ) maruziyetine bağlı akciğerde oluşacak hasara karşı NACA'nın koruyucu etkilerinin biyokimyasal ve histolojik analizlerle karşılaştırılmalı araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada 30 adet erkek erişkin Wistar cinsi sıçan 3 gruba ayrıldı. Grup 1: Kontrol(n:10), Grup 2: Paraquat (10 mg/kg) (n:10), Grup 3: Paraquat (10 mg/kg) + NACA (100 mg/kg/gün) (n:10), gruplara NACA uygulaması intraperitonal olarak Paraquat uygulamasından 30 dakika önce gerçekleştirildi. Paraquat uygulaması haftada iki kez olmak üzere subkutan olarak uygulandı. Uygulama suresi 28 gün olarak gerçekleştirildi. Bu sürenin sonunda sıçanlar sakrifiye edilerek akciğer dokuları alındı. Dokularda birincil antioksidan enzimlere, malondialdehit (MDA), toplam glutatyon (tGSH) ve nitrik oksit (tNO) düzeylerine bakıldı. Ayrıca dokular histolojik olarak da incelendi. Elde edilen veriler One Way ANOVA yöntemine göre istatiksel olarak değerlendirildi.Biyokimyasal verilerimize göre MDA, PQ grubunda kontrole göre anlamlı *($p<0.05$)* bir yükseliş sergilerken NACA uygulanan grubunun anlamlı *($p<0.01$)* bir düşüş sergilenmesi önemlidir. Ayrıca tGSH düzeyinin NACA ilavesiyle PQ grubunun tersine anlamlı bir şekilde yükselişi *($p<0.001$)* öne çıkan diğer bir sonuçtur. Histolojik verilerimiz biyokimyasal veriler ile NACA'nın koruyucu özelliği açısından paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak NACA, PQ'ın akciğer dokusunda oluşturduğu oksidatif stres süreci sonrası meydana gelebilecek hasarı önemli ölçüde azaltmıştır. Ayrıca NACA'nın bu iyileştirici etkisinde, PQ ile bozulan GSH metabolizmasındaki düzenleyici rolünün önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: N-Asetilsistein Amid, Paraquat, Akciğer, Oksidatif stres

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF POTENTIAL PROTECTIVE EFFECT OF N-ACETYLCYSTEINE AMIDE AGAINIST LUNG INJURY UPON PARAQUAT EXPOSURE

Nesrin AYDOGAN

Inonu University
Institute of Natural Sciences
Department of Chemistry

xiii + 65 pages

Advisor: Burhan ATES, Assoc. Prof

N-acetylcysteine amide (NACA) is a new molecule with powerful antioxidant properties, synthesized after neutralizing the carboxyl group of N-acetylcysteine (NAC). The aim of this study was to investigate protective effects of NACA against lung injury upon PQ exposure with biochemical and histological analysis.

In the study, thirty Adult Wistar Albino rats were divided three groups as group 1: control (n=10), group 2: Paraquat (10 mg/kg) (n=10) and group 3: Paraquat (10 mg/kg) + NACA (100 mg/kg) (n=10). NACA was administrated by intraperitoneal 30 min before paraquat injection. Paraquat administration was carried out by subcutaneous injection twice a week. Performance was planned for a period of twenty eight days. At the end of this period, rats were sacrificed and lung tissues were taken. In the tissues, primary antioxidant enzymes, malondialdehyde (MDA), total glutathione (tGSH) and nitric oxide (tNO) levels were measured. In addition, the tissues were examined histologically. The obtained data were evaluated statistically by One Way ANOVA test. According to biochemical data, MDA levels exhibited significant increase *($p < 0.01$)* when PQ group was compared to the control group, whereas NACA-treated group showed significant decline *($p < 0.05$)*. In addition, significant increasing *($p < 0.001$)* of tGSH level in NACA administration group is another outstanding result compared with the PQ group. Our histological data are consistent with the protective properties of NACA in terms of biochemical data.

As a result, NACA significantly reduced lung damage that may have occured after the process of oxidative stress with PQ exposure. In addition, the curative effect of NACA was concluded to have an important regulatory role in GSH metabolism which was impaired with PQ.

Keywords: N-Acetylcysteine Amide, Paraquat, Lung, Oxidative stress.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında yardım, öneri ve desteğini esirgemeden beni yönlendiren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Burhan ATEŞ'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezin deneysel aşamasında bana yardımcı olan İnönü Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalından Arş. Grv. Ali ERDOĞAN'a sevgili arkadaşım Merve Gökşin KARAASLAN ve Sevgi BALCIOĞLU'na ,

Ayrıca hayvan deneylerinde yardımlarını gördüğüm İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Hakan PARLAKPINAR'a ve histolojik incelemeleri gerçekleştiren İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Doç. Dr. Nigar VARDI'ya,

Çalışmalarımızda kullandığımız N-Asetilsistein Amid (NACA)'i temin ettiğimiz Prof.Dr. Nuran ERCAL(Missouri University of Science and Technology)'a

Yüksek Lisans çalışmalarım süresince benden desteklerini esirgemeyen değerli AİLEM'e ve özellikle kardeşlerim Jale, Kübra, Büşra ve Gizem'e

Teşekkür ederim.

"2010-108 nolu proje kapsamında bu çalışmayı destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederim"

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLOLAR DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Pestisitler	3
1.2. Paraquat	3
1.3. Serbest Radikaller	6
1.3.1. Süperoksit radikali($O_2^{-\cdot}$)	8
1.3.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	8
1.3.3. Hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$)	9
1.3.4. Nitrik oksit ($NO^{\cdot}$)	9
1.3.5. Singlet oksijen ($^1O_2$)	10
1.4. Serbest Radikallerin Biyolojik Hedeflere Etkileri	12
1.4.2. DNA ve Nükleik Asitlere Etkileri	13
1.4.3. Karbonhidratlara Etkileri	14
1.4.4. Lipidlere Etkileri	14
1.4.5. Serbest Oksijen Radikalleri ve Akciğer	17
1.5. Akciğer Hastalıkları	18
1.5.1. Astım	18
1.5.2. Kronik Obsküsif Akciğer Hasarı (KOAH)	18
1.5.3. Pulmoner Fibrozis	19

1.6. Antioksidanlar 19

1.7. Antioksidan Etki Mekanizmaları 21

1.8. Antioksidan savunmayı sağlayan birincil antiksidan enzimler 22

1.8.1. Superoksit Dismutaz (SOD) 22

1.8.2. Katalaz (CAT) 22

1.8.3. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) 23

1.8.4. Glutatyon redüktaz (GSH-Rd) 23

1.9.1. Glutatyon (GSH) 25

1.9.2. Metiyonin 26

1.9.3. S-adenozil-L-metiyonin (SAM) 27

1.9.4. Homosistein (Hcy) 27

1.9.5. α-Lipoik asit (LA) (tiyoktik asit) 28

1.9.6. Taurin 28

1.9.7. N-Asetilsistein (NAC) 29

1.9.8. N-Asetilsistein Amid (NACA) 31

2. KAYNAK ÖZETLERİ 32

3. MATERYAL VE YÖNTEM 35

3.1. Deneysel Modelinin Uygulanması 35

3.2. Biyokimyasal Analizler 35

3.2.1. Dokuların Homojenizasyonu 35

3.2.2. Katalaz Aktivite Tayini 36

3.2.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini 36

3.2.4. Se-Bağımlı glutatyon peroksidaz aktivite tayini 37

3.2.5. Total Glutatyon (GSH) Ölçümü 38

3.2.6. NO ölçümü 39

3.2.7. Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi 39

3.2.8. Protein Tayini 40

3.3. Histolojik Değerlendirme 40

3.4. İstatiksel Analiz 40

4. ARAŞTIRMA BULGULARI 41

4.1. Biyokimyasal Bulgular 41

4.2. Histolojik Bulgular 47

5. TARTIŞMA SONUÇ 52

6. KAYNAKLAR 55

ÖZGEÇMİŞ 64

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Paraquatın molekül şekli	4
Şekil 1.2.	Paraquat toksisitesi için önerilen mekanizma	5
Şekil 1.3.	Moleküler oksijenden reaktif ara ürünlerin oluşumu	7
Şekil 1.4.	Hücredeki reaktif oksijen türleri ve antioksidan sistem	11
Şekil 1.5.	Serbest radikal hasarının oluşturduğu ürünler	12
Şekil 1.6.	Serbest radikallerin yol açtığı hücre hasarı	17
Şekil 1.7.	Dokulardaki birincil antioksidan enzim sistemi ve bağlı yollar	21
Şekil 1.8.	Tiyol antioksidan döngüsü	24
Şekil 1.9.	GSH molekül yapısı	25
Şekil 1.10.	GSH redoks döngüsü	25
Şekil 1.11.	Metiyoninin molekül şekli	26
Şekil 1.12.	SAM molekül şekli	27
Şekil 1.13.	Homosistein molekül şekli	27
Şekil 1.14.	α-Lipoik asidin molekül şekli	28
Şekil 1.15.	Taurinin molekül şekli	29
Şekil 1.16.	NAC molekül şekli	29
Şekil 1.17.	NAC'ın hücredeki metabolik yolları	30
Şekil 1.18.	NACA molekül şekli	31
Şekil 3.1.1.	PQ ile oluşturulmuş deneysel modelde NACA'nın akciğer dokusunda CAT enzim aktivitesi üzerine etkisi	41
Şekil 3.1.2.	PQ ile oluşturulmuş deneysel modelde NACA'nın akciğer dokusunda SOD enzim aktivitesi üzerine etkisi	42
Şekil 3.1.3.	PQ ile oluşturulmuş deneysel modelde NACA'nın akciğer	43

dokusunda GPx enzim aktivitesi üzerine etkisi

Şekil 3.1.4. PQ ile oluşturulmuş deneysel modelde NACA'nın akciğer dokusunda tGSH enzim aktivitesi üzerine etkisi 44

Şekil 3.1.5. PQ ile oluşturulmuş deneysel modelde NACA'nın akciğer dokusunda MDA enzim aktivitesi üzerine etkisi 45

Şekil 3.1.6. PQ ile oluşturulmuş deneysel modelde NACA'nın akciğer dokusunda tNO enzim aktivitesi üzerine etkisi 46

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Serbest oksijen radikallerini oluşturan kaynaklar 7
Tablo 1.2. Çözünürlüklerine göre antioksidanların sınıflandırılması 20
Tablo 1.3. Yapılarına göre antioksidanların sınıflandırılması 20
Tablo 1.4. Kaynaklarına göre antioksidanların sınıflandırılması 21

RESİMLER DİZİNİ

Resim 3.2.1. Kontrol grubunun histoloji analizi 48

Resim 3.2.2. PQ grubunun histoloji analizi 48

Resim 3.2.3. PQ grubunun histoloji analizi 49

Resim 3.2.4. PQ grubunun histoloji analizi 49

Resim 3.2.5. PQ+NACA grubunun histoloji analizi 50

Resim 3.2.6. PQ+NACA grubunun histoloji analizi 50

Resim 3.2.7. PQ+NACA grubunun histoloji analizi 51

SEMBOL VE KISALTMALAR

NACA	N-Asetilsistein Amid
NAC	N-Asetilsistein
PQ	Paraquat
SOD	Süperoksid Dismutaz
CAT	Katalaz
GSH	Glutatyon
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
GSH-Rd	Glutatyon redüktaz
NO	Nitrikoksit
GİS	Gastrointestinal Sistem

1. GİRİŞ

Son zamanlarda dünya nüfusu hızla artarken tarım alanlarının yüzölçümü azalmaktadır. Bu da birim alandan elde edilen ürün miktarının arttırılmasını zorunlu kılmakta ve bu amaçla çok çeşitli zirai mücadele planlamaları yapılmaktadır. Zirai mücadelede en çok kullanılan yöntemlerden biri kimyasal mücadele yöntemidir. Bu nedenle zirai mücadelede kullanılan ilaçların geliştirilmesi ve biyolojik özelliklerinin ortaya konması uzun yıllardan beri yoğun ilgi çekmektedir. Kimyasal mücadele kesin sonuçlar ortaya koymakla beraber zirai mücadeleyi yapan kişiler açısından birçok sakıncalar doğurabilmektedir. Özellikle de bilinçsiz yapılan zirai mücadele ve kullanılan kimyasalın uygulama dozlarına riayet edilmemesi tarım işçileri açısından büyük risk taşımaktadır. Yine uygun olmayan yüksek dozlarla yapılan zirai mücadele sonrası soframıza gelen tarım ürünlerindeki ilaç kalıntıları, tüketiciler içinde büyük bir tehlike oluşturmaktadır. Bu riskleri ile birlikte kimyasal zirai mücadele yapılmakta ve bu alanda kullanılan kimyasal maddelere pestisit denilmektedir. Pestisitlerin en büyük kısmını zararlı bitkilere karşı geliştirilen herbisitler oluşturmaktadır. Herbisitler hücre bölünmesi, hücre haberleşmesi, protein sentezi ve solunum gibi bitki metabolizmasını ve hormonal dengeyi bozarak istenmeyen bitkilerin yok edilmesinde kullanılmaktadır [1,2].

Paraquat ise otları öldürmek için yaygın bir şekilde kullanılan herbisittir. Paraquatın herbisit özelliği 1955 ‘de keşfedilmiş olup 1958‘den beri sık olarak kullanılmaktadır [3]. Özellikle bitkilerin fotosentez yapan yeşil bölgelerinde ortaya çıkan elektron hareketliliği nedeniyle kolaylıkla paraquat radikali oluşumu gerçekleşir. Paraquat radikali bitkilerde moleküler oksijeni hidrojen peroksit ve süper oksit radikaline dönüştürerek lipid membranda peroksidasyona yol açıp, hücrenin dolayısıyla dokunun ve bitkinin ölümüne neden olur [4]. Ayrıca atmosferdeki oksijen konsantrasyonunun artması herbisit etkisinin ortaya çıkmasında pozitif rol oynamaktadır [5].

Paraquat ile yapılan zirai mücadele sırasında gerek tarım alanı çevresinde yaşayanlar insanlar gerekse paraquat kalıntısı içeren meyve ve sebzeleri tüketenler paraquat toksititesine maruz kalabilirler. Paraquat yüksek elektron afinitesi nedeniyle sistemik etki gösterir ve oksijen konsantrasyonunun yüksek olduğu dokularda daha büyük hasar oluşturur. Bu nedenle paraquattan en çok etkilenen organ akciğerlerdir

[3]. Paraquat, akciğer hücrelerinde toplanır ve bir elektron kaybederek serbest radikal haline dönüşebilir. Moleküler oksijen ile etkileşir ve süper oksit anyonunu oluşturur. Süperoksit anyonu iki değerlikli demir varlığında H_2O_2'ye ve devamındaki süreçlerle de $OH^{-\bullet}$ radikaline dönüşebilir. Oluşan oksijen radikalleri hücreyi oksidatif stres hasarına sürüklemekte ve hücrenin ölümüne yol açan süreçleri doğurabilmektedir [6]. Bu özellikleri ile paraquat, akciğer dokusu için önemli oksidatif stres indükleyici bir ajandır. Bu kapsamda kullanılabilecek yeni güçlü antioksidanların ortaya konması ilaç çalışmaları açısında oldukça önemlidir.

N-Asetilsistein Amid (NACA), N-Asetilsistein'in (NAC) karboksil grubunun nötralize edilerek, hücre membranından geçişi kolaylaştırmayı mümkün kılmak için dizayn ve sentez edilmiştir. Yapılan çalışmalarda NACA'nın kırmızı kan hücrelerinde NAC'dan daha etkin bir şekilde hücre içine geçtiği ve hücre içi glutatyon düzeyini arttırdığı tespit edilmiştir. NACA hidrolize edilerek endojen glutatyon üretiminin temelinde yer alan sisteine dönüştürülür. Sisteinin GSH sentezinde temel rol oynadığı ve GSH sentezi için hız belirleyici bir enzim olan γ-glutamat sistein ligaz enzimini indüklediği, aynı zamanda serbest radikal süpürücü özelliği ve metalleri şelatlama özelliği ortaya konmuştur [7]. NAC, akciğer inflamasyonlarında yaygın şekilde tercih edilen bir ilaçtır. NACA hücre membranından yüksek mobilitesi, düşük toksisitesi ile NAC'ın yerini alacağı düşünülmektedir. Bu nedenle NACA'nın olası mümkün kullanım alanlarının ortaya konması için çalışmaların yapılması önemli faydalar doğuracaktır.

Bu kapsamda tezin amacı paraquat maruziyetinin neden olabileceği akciğer hasarına karşı NACA'nın olası koruyucu etkilerinin biyokimyasal ve histolojik parametreler ile araştırılmasıdır. NACA'nın *in vitro* bazı antioksidan özelliklere sahip olduğu ortaya konmuştur. Bu çalışma NACA'nın *in vivo* kullanılabilirliği açısından önemlidir ve bu yönüyle NACA'nın ileride ilaç olarak kullanılabilinirliğine önemli katkılar sağlayacağı aşikârdır.

1.1. Pestisitler

Tarım ürünlerinin verim ve kalitesini artırmak için modern tarım tekniklerinin kullanılması kaçınılmazdır. Bitki koruma ürünleri içerisinde yer alan pestisit kullanımı da modern tarım tekniklerinden biridir. 1940'lı yıllardan beri pestisit kullanımı tarım ürününü hastalık, zararlı ve yabancı otların zararından koruyabilmek, kaliteli üretimi güvence altına alabilmek ve üretimi arttırmak için kullanılan bir tarımsal mücadele şeklidir. Kısa sürede etki göstermesi ve kullanımının kolay olması nedeniyle, pestisit kullanımı en çok tercih edilen yöntemdir [8].

Pestisitlerin sınıflandırılmasında;

- Fiziksel yapı ve formülasyon şekilleri,
- İçerdikleri aktif maddenin cins ve grubu,
- Zehirlilik derecesi
- Etkiledikleri zararlı ve hastalık grubu ile bunların biyolojik dönemi,
- Kullanım tekniği

yer almaktadır.

Ancak, pestisitlerin kullanımı insan sağlığı ve çevreyi olumsuz etkilemekte ve birçok sorunu da beraberinde getirmektedir. Pestisitlerin yoğun ve bilinçsiz bir şekilde kullanılmaları sonucunda gıdalarda, su, hava ve toprakta pestisitin kendisi ya da dönüşüm ürünleri kalabilmektedir.

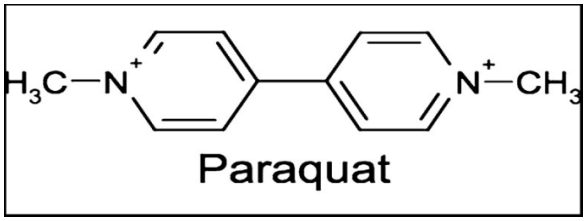
Hedef alınan organizmaya göre yapılan sınıflandırmada en önemli üç büyük pestisit grubu arasında insektisit (böceklere karşı), fungisit (funguslara karşı) ve herbisitler (bitkilere karşı) yer almaktadır. Paraquat ise herbisit grubuna dahil bir pestisittir [9,10].

1.2. Paraquat

Günümüz modern tarımında pestisitlerin kullanılması önemlidir. Ancak pestisit kullanılırken, hem ürünün hastalık, zararlı ve yabancı otlara karşı korunması hem de insan ve çevreye olumsuz etkileri birlikte değerlendirilmelidir. Paraquat ilk olarak 1882 yılında sentezlenmiş ve 1955 yılında herbisidal etkisi keşfedilmiştir. Şu anda Türkiye dahil olmak üzere yaklaşık 120 ülkede kullanılmaktadır. Ancak son

zamanlarda çevreye verdiği zararlardan dolayı 13 ülkede kullanımı yasaklanmıştır[11].

Dünya pestisit pazarında herbisitler ve insektisitler en yaygın olarak kullanılanlardandır. Türkiye'de birinci sırayı insektisitler alırken, herbisitler tarım ilaçlarının ikinci önemli bölümünü oluşturmaktadır. Bir herbisit olan paraquat tüm dünyada kullanılan herbisitler içerisinde çok yüksek toksititesi ile bilinmesine karşın çoğu ülkede kullanımı kısıtlı olmayan bir maddedir. Genellikle "Gramoxone " olarak bilinir. Sinonim adlarından bazıları ise; metil violojen diklorid, 1.1'-dimetil-4,4'-Bipiridiliyum diklorid, Crisquat, Dexuron, Metil violojen hidrattır. Kimyasal formülü; $C_{12}H_{14}Cl_2N_2$'dür. (Şekil 1.1)



Şekil 1.1. Paraquatın kimyasal yapısı

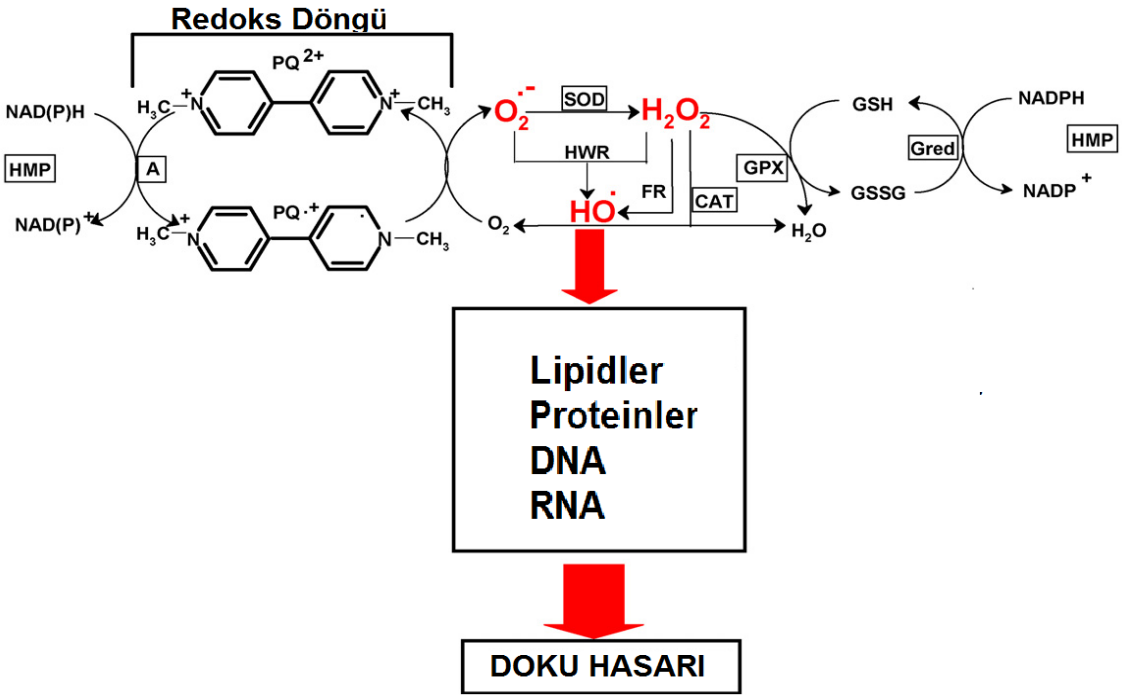
Bir dipyridium bileşiği (1,1'-dimetil-4,4'-dipiridiliyum) olan paraquatın (PQ) kazara veya intihar amacıyla, başta oral yol olmak üzere parenteral ve inhalasyon yoluyla alınması zehirlenmelere yol açar. Dozla ilişkili olarak ölüm oranı % 60-100'dür. Oral alımda 24-48 saat içinde gastrointestinal sistem (GİS) mukozasında ülserler, karın ağrısı, kusma, diyareler görülür. Sistemik etkisini esas olarak böbrek, karaciğer ve akciğerler üzerinde gösterir [12].

PQ'ın hücresel toksisitesi, temel olarak onun redoks döngüsü nedeniyledir [13]. (Şekil 2) [6]. PQ, NADPH sitokrom P450 redüktaz, NADPH sitokrom C redüktaz, ubikinon oksidoredüktaz olarak bilinen mitokondriyal kompleks I tarafından PQ serbest radikali oluşturmak için indirgenirler [14].

Bu döngüdeki enzim seti hücrede NAD(P)H dan PQ gibi küçük moleküllere elektron transfer ederler. PQ monokatyon serbest radikali ($PQ^{\cdot+}$**)** hızlı bir şekilde oksijen varlığında süperoksit radikaline tekrar okside edilmektedir [15,16].

Bu reaksiyon seti reaktif oksijen türlerinin indüksiyonu olarak bilinmektedir. Bu döngünün sonunda temel olarak hidrojen peroksit ve hidroksil radikali oluşmaktadır. *İn vitro* deneylerle PQ'ın bu radikalerin oluşumuna neden olduğu ve bunun

sonucunda lipit peroksidasyonu ve membran hasarının ortaya çıktığı tespit edilmiştir [13].



Şekil 1.2. Paraquat (PQ) toksisitesi için önerilen mekanizma. A, Hücresel terleme; SOD, süperoksit dismutaz; CAT, katalaz; GPX, glutatyon peroksidaz; Gred, glutatyon redüktaz; PQ^{2+}, paraquat; $PQ^{\cdot+}$, paraquat katyon radikal; HMP, hekzos monofosfat yolu; FR, Fenton reaksiyon; HWR, Haber-Weiss reaksiyon [17,18].

Paraquat, NADPH'ya bağımlı indirgenme/yükseltgenme tepkimesine maruz kalmakta ve her seferinde elektronları doğurarak superoksidi oluşturmaktadır. Bu nedenle paraquat önderliğinde oluşan superoksit guruplarına akciğer dokusu aşırı derecede duyarlılık gösterir [19].

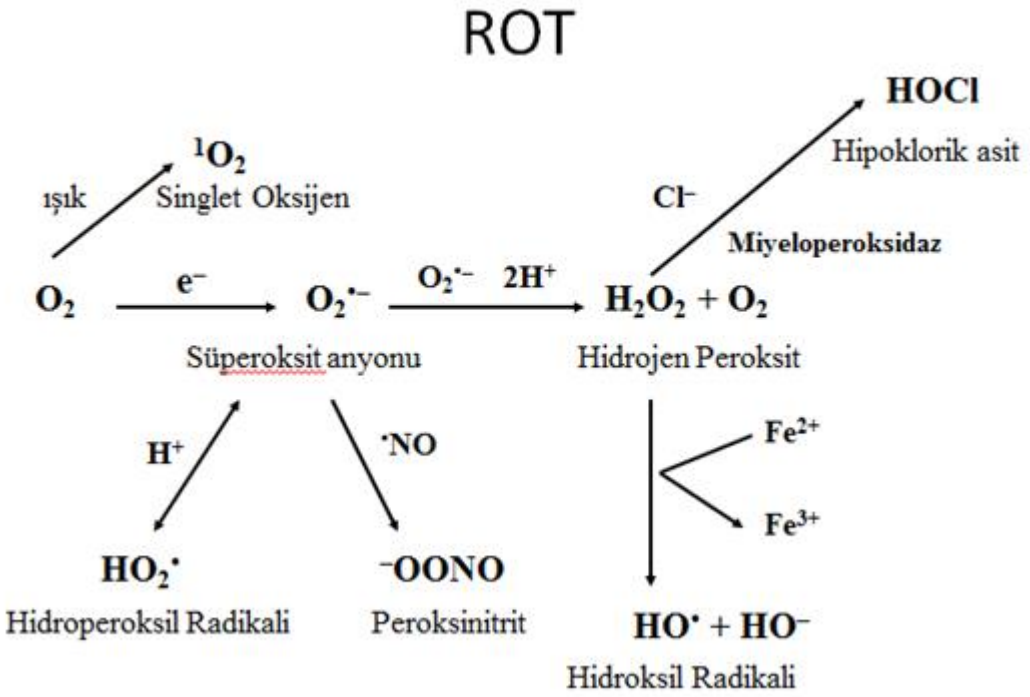
Bir başka görüş ise paraquatın, glutatyon peroksidaz enzimi ile pentoz fosfat yolunu sitümüle ettiği şeklindedir. Bu şekilde akciğerde hücresel düzeyde yağ asidi inhibe olmakta, pulmoner disülfitlerde hızlı bir artış ve NADPH 'da azalma gözlenirken, uzun süre NADPH'nın fizyolojik seviyede tutulmaması nedeniyle serbest

radikallerin zararlı etkilerine karşı alveol epiteli daha duyarlı hale gelerek hücre hasarı oluşmaktadır [20].

Paraquatın yüksek elektron afinitesi vardır. Ancak oksijen konsantrasyonunun yüksek olduğu yerlerde daha çok hasara yol açar. Bu nedenle paraquat intoksikasyonunda en çok etkilenen organ akciğerlerdir [3]. Akciğer hücrelerinde paraquat enerji bağımlı olarak toplanır. Burada bir elektron kaybederek serbest radikal haline geçer. Moleküler oksijen ile etkileşir ve süper oksit anyonu oluşturur. Süperoksit anyonu ve iki değerlikli demir varlığında H_2O_2'ye dönüşür. Oluşan oksijen radikalleri hücre membranındaki fosfolipidlerin peroksidasyonuna ve sonuçta hücrenin ölümüne yol açar [6]. Bu nedenle paraquat toksisitesinde serbest oksijen radikalleri ve oksidatif stres süreci önemli role sahiptir.

1.3. Serbest Radikaller

Ortaklanmamış elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller serbest radikal olarak tanımlanırlar. Ancak Fe^{3+}, Cu^{2+}, Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metalleri ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezlerken serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Serbest radikaller pozitif yüklü (katyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral olabilirler. Moleküler oksijen (O_2), paralel spin durumlu iki ortaklanmamış elektrona sahiptir. Serbest radikal tanımına göre moleküler oksijen, bir serbest radikal olarak değerlendirilir. Ayrıca moleküler oksijen, molekül yapısı gereği yüksek derecede reaktif oksijen türleri (ROT) oluşturma eğilimindedir. (Şekil 1.3)



Şekil 1.3. Moleküler oksijenden reaktif ara ürünlerin oluşumu

Serbest oksijen radikalleri canlı sistemelerde endojen ve eksojen olmak üzere iki temel kaynaktan oluşmaktadır. (Tablo 1).

Tablo 1.1. Serbest oksijen radikallerini oluşturan kaynaklar

Endojen kaynaklar	**Eksojen kaynaklar**
Mitokondriler (solunum zinciri)	Radyasyon
Hücre zarı (prostoglandin sentezi)	İlaçlar
Sitokrom P-450	Sigara, Alkol, Uyuşturucu
Aktive lökositler (fagositoz)	Metal iyonları
Mikrozomal elektron tasıma zinciri	
Oksidan enzimler	

1.3.1.Süperoksit radikali($O_2^{-\cdot}$)

Oksijene bir elektron eklenmesi ile süperoksit radikali oluşur. Süperoksit radikali membranlardan kolayca geçememesinden dolayı fazla miktarda toksik değildir [21]. Elektronca zengin bir ortam olan iç mitokondri zarında solunum zinciriyle kendiliğinden oluşur [22]. Süperoksit radikali bir oksitleyici gibi davranarak bir elektron daha alabilir. Böylece oluşan peroksit (O_2^{-2}) anyonu ortamdan iki proton daha alarak hidrojen peroksit oluşturabilir veya süper oksit radikali aldığı elektronu başka bir elektron alıcıya vererek tekrar oksijene oksitlenebilir. Ayrıca iki süperoksit radikalinin birbiri ile etkileşmesi sonucu biri indirgenirken diğeri yükseltgenir ve böylece hidrojenperoksit ve moleküler oksijen oluşur [21].

$$2O_2^{-\cdot} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Süperoksit ayrıca yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar gibi fiziksel ve kimyasal ajanlar ile bazı bileşiklerin otooksidasyonuyla ya da fagositozla oluşabilir [23]. Organik moleküllerin bulunduğu sulu ve oksijenli ortamda $O_2^{-\cdot}$ oluşumu iki katına çıkar.

1.3.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Moleküler oksijen iki elektron alarak hidrojen peroksidi oluşturur.

$$O_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2O_2$$

Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri (ROT) arasındadır. Bunu nedeni, Fe^{2+} veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu ya da süperoksit radikali ($O_2^{-\cdot}$) varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu oldukça reaktif olan hidroksil radikali ($OH^{-\cdot}$) oluşturmasıdır.

Fenton Reaksiyonu:

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{+3} + OH^{-\cdot} + OH^-$$

Haber-Weiss reaksiyonu:

$$O_2^{-\cdot} + H_2O_2 + H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O + OH^{-\cdot}$$

Ayrıca hidrojen peroksit, ürat oksidaz, glukoz oksidaz, D-aminoasit oksidaz gibi birçok enzimatik reaksiyonlarda oksijene iki elektron ilavesiyle oluşabilir. Hidrojen peroksit mebranlardan kolaylıkla geçebilen ve uzun ömürlü olması nedeniyle ROT'lar arasında önemli bir yere sahiptir [25].

1.3.3. Hidroksil radikali ($OH^{-\bullet}$)

Hidroksil radikali oldukça reaktiftir ve canlı hücrede hemen hemen bütün moleküllere (şeker molekülleri, proteinler, aminoasitler, DNA bazları ve doymamış yağ asitleri dahil tüm organik asitler) etki edebilir. Hidrojen peroksit'in süperoksit ile tepkimeye girmesi sonucu hidroksil radikali ve singlet oksijen oluşturur. Tepkime katalizörsüz ortamda oldukça yavaşken, demirin katalizörlüğünde çok hızlıdır [23].

1.3.4. Nitrik oksit ($NO^{\cdot}$)

$NO^{\cdot}$ enzimatik olarak nitrik oksit sentaz enzimi tarafından L-arjinin'den sentezlenir.

$$\text{L-arjinin} + \text{NADPH} + O_2 \rightarrow \text{L-sitrullin} + NO^{\bullet} + NADP^+$$

Yüksek miktarlarda $O_2^{-\cdot}$ yapımı $NO^{\cdot}$ ile paraleldir ve birbirlerini etkileyerek $OH^{\cdot}$ ve $NO_2^{\bullet}$ oluşumuna neden olurlar**.** Tepkime sırasında ise peroksinitrit ($ONOO^-$) ve peroksinitröz asit (ONOOH) ara ürünleri oluşur [24].

$$NO^{\bullet} + O_2^{-\cdot} \rightarrow ONOO^-$$
$$ONOO^- + H^+ \rightarrow ONOOH$$
$$ONOOH \rightarrow OH^{\bullet} + NO_2^{\bullet}$$

$NO^{\bullet}$ eşleşmemiş elektron bulundurmasına rağmen kolayca tepkimeye giremez. Bu nedenle fazla toksik değildir [24].

Vücudumuzda NO• sentezini sağlayan mekanizmalar oldukça kısıtlıdır. Vücuda giren nitro bileşiklerin metabolize edilmesi sırasında oluşan NO• bir tarafa bırakılacak olursa, endojen NO• oluşturan tek kaynak nitrik oksit sentaz (NOS) enzimidir.

Radikal olarak reaktivitesi çok düşük olan NO, metal içeren merkezler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girer. Özellikle lipid radikaller ile tepkimeye girmesi NO•'ya antioksidan bir etki de kazandırmaktadır.

Fizyolojik değişimde üretilen NO esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata (NO_3) okitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, nitrik oksidi ortamdan temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur.

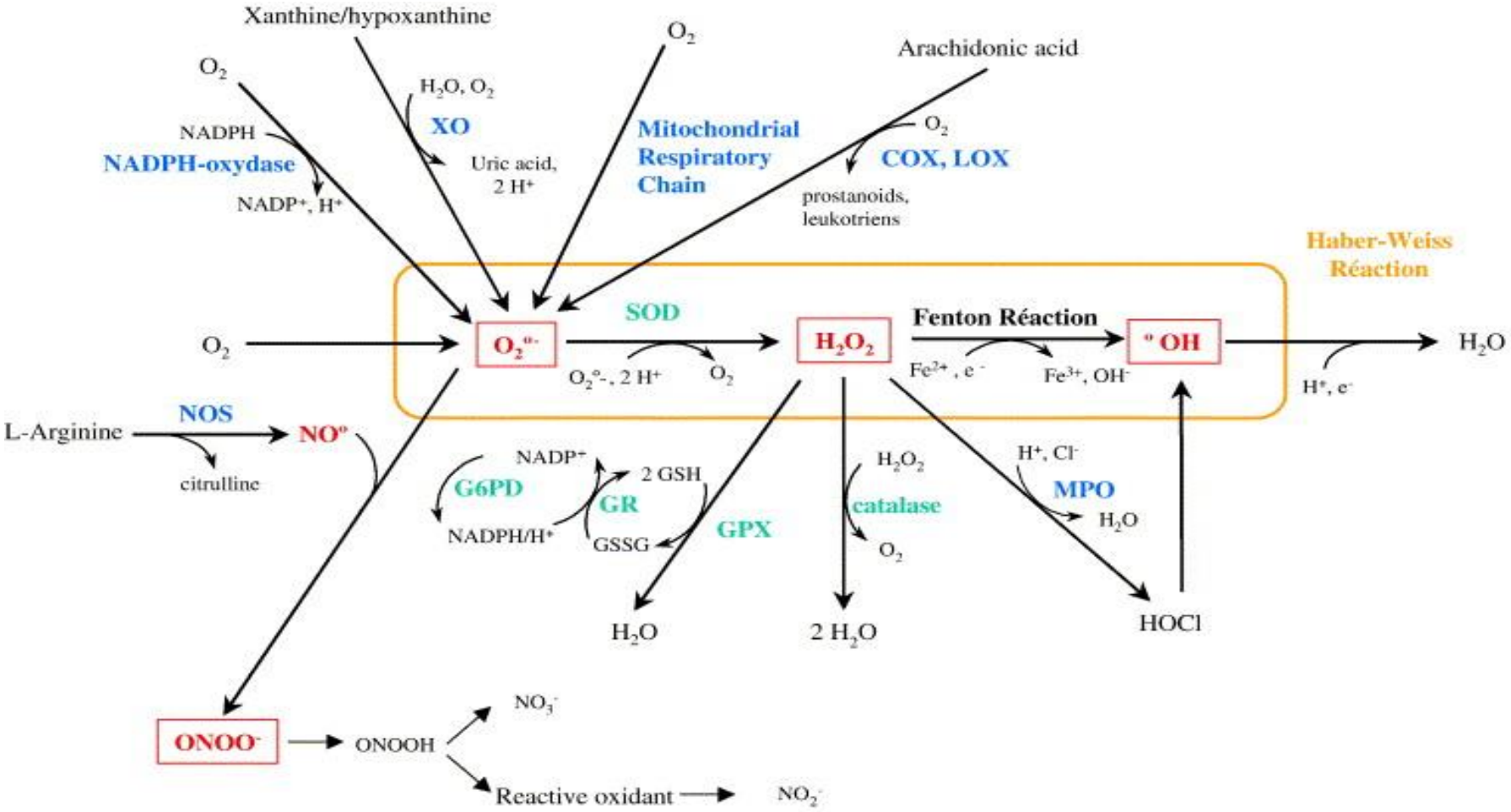
1.3.5. Singlet oksijen ($^1O_2$)

Singlet oksijen eşleşmemiş elektron içermediği için serbest radikal değildir. Bununla birlikte dönme yönlerinin farklılığından dolayı oksijenin yüksek reaktif formudur [25].

Enerji absorpsiyonu ile oksijenin paylaşılmamış dış elektronları spinlerini değiştirebilirler. Yani oksijenin elektronlarından birinin enerjisini alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle oluşur.

Singlet oksijen iki formda olabilir. Birincisi delta formunda olup iki elektron aynı orbitalde bulunur ve spinleri birbirine zıttır, diğer orbital boştur. İkinci formu olan sigma formunda ise iki elektron ayrı ayrı orbitallerdedir ve spinleri birbirine zıttır. Singlet oksijenin delta formu boş bir dış orbital içerdiğinden çok güçlü nükleofilik olarak davranarak yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren bütün bileşiklerle tepkimeye girer.

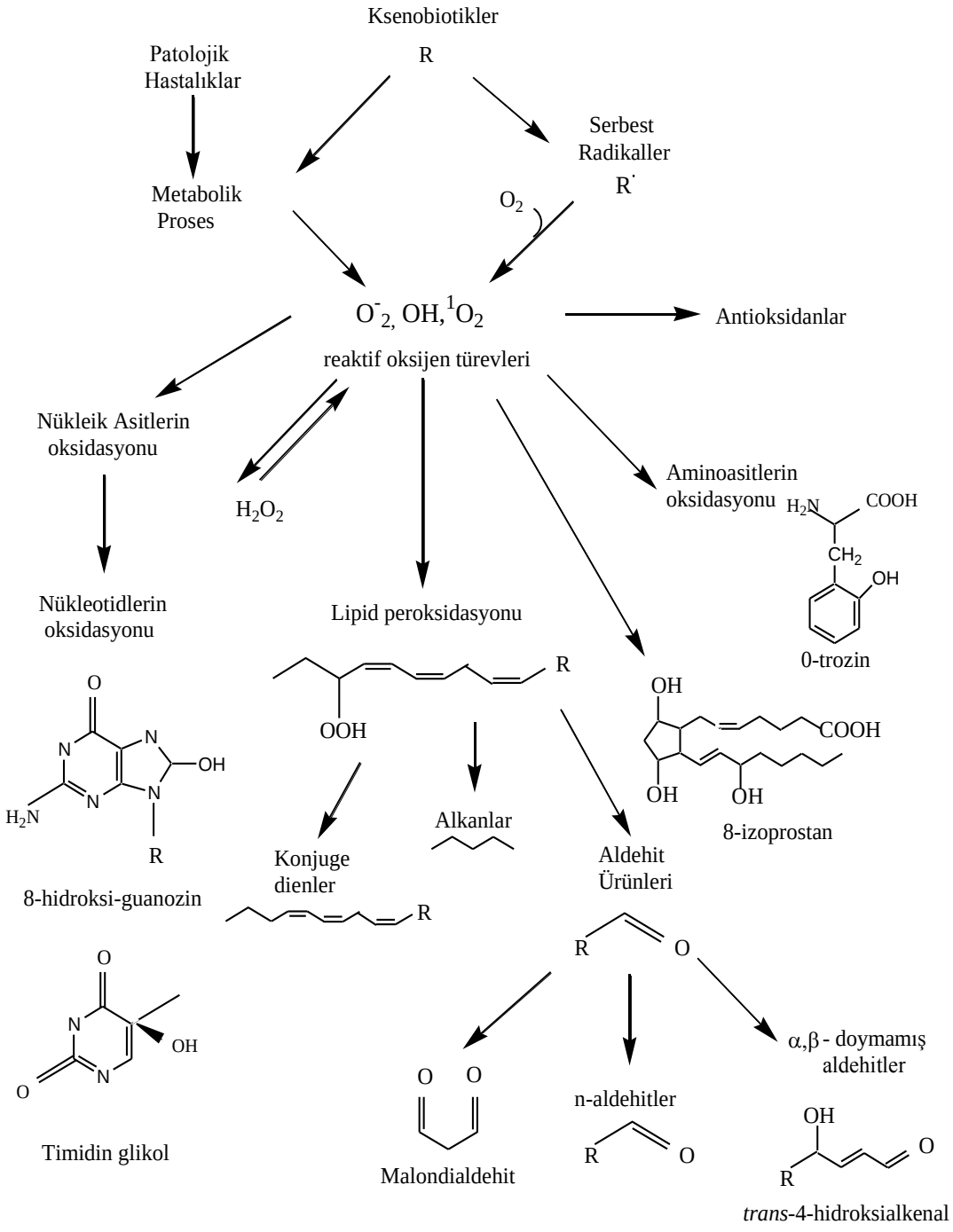
Singlet oksijenin kimyasal bir bileşikle etkileşimi sonucu kemiluminesans meydana gelmesi ve bunun ölçülmesiyle reaktif oksijen türlerinin direk tayinine imkan sağlamaktadır.



Şekil 1.4. Hücredeki reaktif oksijen türleri ve antioksidan sistem

1.4. Serbest Radikallerin Biyolojik Hedeflere Etkileri

Vücuttaki fizyolojik aktivitenin doğal ürünü olan serbest radikalleri, organizma doğuştan kazandığı çok hassas bir donanımla oksidan-antioksidan denge olarak tanımlanabilecek bir çizgide tutmaya çalışır. Bu dengenin bozulması oksidatif strese yol açar [26]. Oksidatif stres sürecinde hücredeki protein, karbonhidrat, nükleik asit ve lipidler hedef moleküller haline gelirler.



Şekil 1.5. Serbest radikal hasarının oluşturduğu ürünler[27]

1.4.1.Proteinlere etkileri

Serbest radikaller protein yapısındaki aminoasitlerle reaksiyona girerek sülfidril gruplarının kaybına ve karbonil gruplarının oluşmasına neden olurlar. Özellikle doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle etkileşimi yüksektir. Bu nedenle triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin ve sistein gibi aminoasitleri içeren proteinler serbest radikallerden daha kolay etkilenirler. Örneğin immungulobin G ve albumin gibi disülfit bağı fazla olan proteinlerin serbest radikal saldırıları sonucu üç boyutlu yapıları bozulduğu tespit edilmiştir [28,29]. Ayrıca protein yapısında olan enzimlerinde serbest radikallerle etkileştikleri sonucu aktivitelerinde değişiklikler meydana gelebilir [30,31].

Hem proteinleri de serbest radikallerden önemli derecede etkilenirler. Özellikle oksihemoglobinin, $O_2^{-\cdot}$ radikali ve H_2O_2 ile reaksiyonu methemoglobin oluşumu ile sonuçlanır [32].

$$O_2^{-\cdot} + \text{Hb - } Fe^{+2} \text{ - } O_2 \longrightarrow \text{Hb} - Fe^{+3} + H_2O_2 + O_2$$

$$H_2O_2 + 2\text{Hb - } Fe^{+2} \text{ - } O_2 \longrightarrow 2\text{Hb} - Fe^{+3} + 2H_2O + O_2$$

1.4.2.DNA ve nükleik asitlere etkileri

Reaktif oksijen metabolitleri DNA üzerinde sitotoksik etkiye sahiptir. Sitotoksik etki, büyük oranda nükleik asitlerdeki baz modifikasyonlarından kaynaklanan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer değişikliklere bağlıdır. İyonize edici radyasyona maruz kalınması sonucu oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek genetik materyalde mutasyonlara neden oldukları tespit edilmiştir. Örneğin hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek bu grupları etkileyebilir. Ayrıca hidrojen peroksit radikali ise zarlardan kolayca geçip hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücrede fonksiyon bozukluğuna ve hatta hücre ölümüne neden olabilir [33,34].

1.4.3.Karbonhidratlara etkileri

Günlük hayatta en çok kullandığımız gıdalardan olan monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksit ve okzoaldehitler meydana gelir. Açığa çıkan okzoaldehitler proteinlere bağlanabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterir ve böylece kanser ve yaşlanmaya neden olabilirler [33].
İnflamatuar eklem hastalığında bir mukopolisakkarid olan hiyalürinik asidin sinoviyal sıvıda artmış olan H_2O_2 ve $O_2^{-\cdot}$ tarafından parçalandığı gösterilmiştir [35].
Yine gözün vitreous humourunda da bol miktarda bulunan hyalünorik asitin oksidasyonu sonucu katarakt oluştuğu tespit edilmiştir [36].

1.4.4.Lipidlere etkileri

Biyomoleküllerin bütün sınıfları serbest radikallerden etkilenir, fakat lipidler en hassas olanıdır. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Serbest radikallerin biyolojik dokulardaki doymamış yağ asitlerine etkileri lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde devam eder. Lipid perokidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür [36]. Lipid peroksidasyonu direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehitler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verirler. Biyolojik zarların yapısı lipid ve proteinden oluşmaktadır, lipid peroksidasyonu lipidlere olduğu kadar zar proteinlerinde de hasar oluşturur [37].
Lipid peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin (poly unsaturated fatty asid) (PUFA) reaktif oksijen türleri tarafından peroksitler, alkoller, malondialdehit, etan ve pentan gibi ürünlere yıkılmasıdır. Yağ asitlerinin peroksidasyonu sonrasında açığa çıkan ürünler zar geçirgenliğini ve akışkanlığını ciddi şekilde etkileyip hücre ve organel içeriklerinin ayrılmasına neden olan kopma ve kırılmalara yol açar[38].
Reaktif oksijen metabolitleri membranlara yakın bölgelerde ortaya çıktığında membran fosfolipidlerinin yağ asidi yan zincirlerine saldırmasıyla lipid peroksidasyonu başlar. $OH^{-\cdot}$ radikali çoklu doymamış yağ asidi zincirindeki α-

metilen gruplarından bir H uzaklaştırır. Hidrojen atomu uzaklaşması ile karbon atomu üzerinde eşleşmemiş elektron kalır ve bunun sonucu yağ asidi zinciri bir lipid radikali**(L˙)** niteliği kazanır.

$$LH + R^{\cdot} \longrightarrow L^{\cdot} + RH$$

Oluşan lipid radikalinin molekül içi çift bağlarının pozisyonunun değişmesiyle konjuge dienler oluşur. Bir alkenin iki çift bağı arasında bir tane tekli bağ varsa bu yapı konjuge dien olarak isimlendirilir. Bu şekilde moleküler düzenleme sağlanmış olur. Lipit radikalinin moleküler oksijen ile etkileşmesi sonucu lipid peroksil radikali **(LOO˙)** oluşur.

$$L^{\cdot} + O_2 \longrightarrow LOO^{\cdot}$$

Peroksil radikali diğer komşu yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşmasına neden olurken kendisi de açığa çıkan hidrojen atomunu alarak lipid hidroperoksitlerine **(LOOH)** dönüşür. Böylece peroksidasyon başladıktan sonra kendi kendine yayılabilmekte ve çok sayıda yağ asidi zinciri lipid hidroperoksitlerine dönüşebilmektedir. Bu tepkime ilerleme reaksiyonu olarak isimlendirilir [39,40].

$$LH + LOO^{\cdot} \longrightarrow L^{\cdot} + LOOH$$

Lipidlerden araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine "enzimatik lipid peroksidasyonu", diğer radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna ise "non-enzimatik lipid peroksidasyonu" denir.

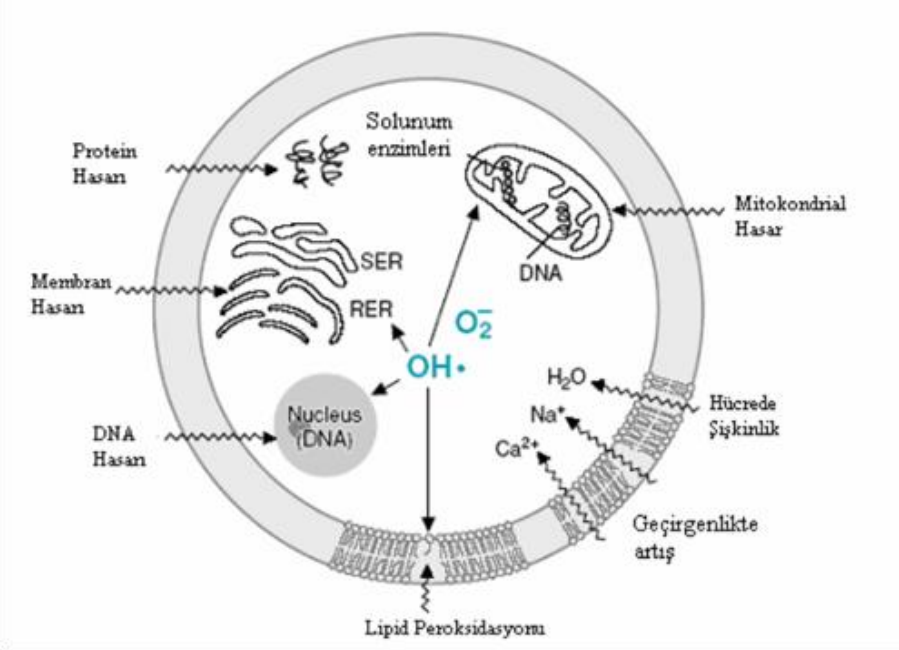
Lipid peroksidasyonu sonucunda; konjuge dienler, malondialdehid (MDA), 4-hidroksinonenal (4-HNE), akrolein, izoprostanlar ile etan ve pentan gibi alkanlar meydana gelir. Lipid peroksidasyonunun değerlendirilebilmesi için oksidasyon ürünlerinin kantitatif ölçümleri gerekmektedir [41].

Lipid proksidasyonunun son bileşeni olan malondialdehit (MDA) peroksidasyona uğramış çoklu doymamış yağ asitlerinin bölünmesiyle oluşan üç karbonlu bir dialdehidtir ve hücrede oksidatif hasarın göstergesi olarak yaygın bir şekilde kullanılır. Bu dialdehid biyolojik ortamda makromoleküllerin NH_2 ve/veya SH gruplarına bağlı veya serbest olarak bulunur [35]. Oluşan MDA; deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi zar

özelliklerinin değişmesine yol açar. Bu etkiler MDA nın mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu gösterir [42]. Lipid peroksidasyonu direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehitler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verirler.

Serbest radikallerin ve lipid peroksitlerinin neden olduğu hastalıklar aşağıda sıralanmıştır.

- Yaşlanma
- Ateroskleroz
- Kanser
- Radyasyon hasarı
- İskemi-reperfüzyon hasarı
- İnflamasyon
- Diabet
- Akciğer hastalıkları (sigara, oksijen toksisitesi)
- Beyin bozuklukları (hiperbarik oksijen , alüminyum toksisitesi, nörotoksinler, alzheimer hastalığı, parkinson hastalığı)
- Böbrek bozuklukları (Otoimmün nefroz, aminoglikozid nefrotoksisitesi, ağır metal nefrotoksisitesi)
- Kardiyak miyopati (Keshan Hastalığı)
- Kas hastalıkları (kas distrofisi, multipl skleroz, egzersiz)
- Göz bozuklukları (maküler dejenerasyon, katarat)
- Cilt bozuklukları (solar radyasyon, yanıklar, kontakt dermatit)
- Karaciğer bozuklukları (endotoksin, alkol, halojenli hidrokarbonlar, asetaminofen, demir)
- Kan hastalıkları (Fenilhidrazin, primaquin, sülfonamid gibi kimyasal bileşikler, protoporfirin fotooksidasyonu, malarya, orak hücre anemisi, favism)
- Gastrointestinal bozukluklar (ülseratif kolit)



Şekil 1.6. Serbest Radikallerin Yol Açtığı Hücre Hasarı

1.4.5. Serbest oksijen radikalleri ve akciğer

Göğüs boşluğunun büyük bir kısmını işgal eden akciğerler süngerimsi elastik bir yapıya sahiptir. Yeni doğanda pembemsi beyaz renkli olup yaş ilerledikçe gri renk alır. Akciğerlerin ağırlığı, erkeklerde vücut ağırlığının yaklaşık 1/37 si, kadınlarda ise 1/43'ü kadardır [43].

Akciğerler koni şeklindedir. Akciğerler sağ ve sol olmak üzere iki kısımda bulunur. Sağ akciğer üç lobdan oluşmuştur. Sol akciğer ise iki lobdan oluşmuştur [44].

Akciğerin normal fonksiyonlarını sürdürmesi için üç temel dengenin sağlanması gerekir. Bunlar:

1. Proteaz- Antiproteaz dengesi
2. İnflamatuar- Antiinflamatuar dengesi
3. Oksidan/Antoksidan dengesi

Bu üç dengeden biri bozulduğunda akciğer dokusunda hasar meydana gelir. Oksidan/antioksidan dengesinin bozulması serbest oksijen radikallerin fazla üretilmesi sonucunda gelişir [46].

Normal hücre metabolizması esnasında akciğerler başlıca süperoksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen metabolitlerine bağlı olarak belli düzeyde oksidan madde yüküne maruz kalırlar [45]. Buna karşın akciğer dokusu diğer dokulara oranla daha

fazla oksijen konsantrasyonu ile karşılaştığı için superoksit ve hidroksi radikalleri yönünden risk altındadır. Örneğin moleküler oksijenden salınan serbest radikaller akciğer dokusunda fibrozise neden olur [47,48]. Ayrıca serbest radikallerin amfizem, bleomisin toksisitesi, paraquat toksisitesi, bütilhidroksitoluen toksisitesi, sigara dumanı toksisitesi, ve astım bronşit gibi bir çok akciğer hastalıklarının patogenezinde rol aldıkları kaydedilmiştir.

1.5. Akciğer Hastalıkları

1.5.1. Astım

Akciğer dokusunda oksidanlardan meydana gelen astım alerjik bir akciğer hastalığıdır [49]. Astımlı hastalarda makrofajlar ve nötröfiller reaktif oksijen türleri, hidrojen peroksit, 8-izobütan ve CO'in artmasına yol açar [50]. Bu artışla birlikte akciğer hücrelerinde SOD ve pulmoner glutatyon peroksidaz artar. Reaktif oksijen türleri astımın önemli özellikleri olan epitelyal hasar ve mukus hipersekresyonuna sebep olurlar. Ayrıca astımlı hastaların bronkoalveol sıvısında peroksidaz ve miyelin peroksidaz seviyesinde artış olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmişti [51,52].

1.5.2. Kronik obsküsif akciğer hasarı (KOAH)

Klinik ve deneysel araştırmalar oksidanların KOAH patogenezinde rol oynadığını rapor etmektedir. Kronik obstrüktif akciğer hastalığı yavaş ve geri dönüşü olmayan amfizem ve kronik bronşit gibi belirtileri ile akciğer fonksiyonlarında kademeli azalmayı içeren bir hastalıktır. Türkiye'de KOAH'ın en önemli iki etkeni sigara kullanımı ve biyokütleye bağlı oluşan akciğerdeki iç ortam kirliliğidir [53].

Yapılan çalışmalarda N-asetil sistein, KOAH'lı hastalarda kullanıma uygunluğu kanıtlanmış ve yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [54,55]. Tedavi sonrasında oksidan-antioksidan denge üzerinde ortaya çıkan olumlu değişiklikler bu ilacın kullanımında önemli bir etkendir.

1.5.3.Pulmoner fibrozis

Pulmoner fibrozis akciğerlerin hava ile dolu olması gereken alveol keseciklerinin, iş göremeyecek şekilde yara dokusu (fibrozis) ile yer değiştirmesidir. 5-fluorouracil (5FU), Amiodarone, Anagrelide, Azacitidine, Bepridil, Bleomycin, Bromocriptine, Busulfan, Cyclophosphamide) gibi çeşitli ilaçlar ve oksijen veya organik radikallerin pulmoner fibrozise sebep olduğu ortaya konmuştur. Örneğin bleomisinin hücre içerisinde serbest demirle kompleks oluşturmasının fenton kökenli hidroksil radikali oluşumu indüklediği ve DNA hasarlarına neden olduğu gösterilmiştir.

Akciğer dokusunda oksijen radikalleri ile hasar meydana getiren ilaçlardan bazıları şunlardır [56,57,58].

1) Siklofosfamid; Reaktif oksijen metabolitleri üretir.

2) Karmustin; Glutatyon seviyelerini azaltır.

3)Nitrofrantoin ve Amiodoron; Dokuda reaktif oksijen metabolitleri'lerinin üretimini indükler.

1.6.Antioksidanlar

Oksijenli yaşamın bir sonucu olarak aerobik organizmalar sürekli bir serbest radikal maruziyeti altındadırlar. Bu nedenle, serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Organizmanın yaşamını sağlıklı bir şekilde sürdürebilmesi için oksidanlar ve antioksidanlar arasında bir denge bulunmalıdır. Bu denge bozulduğunda hücre hasarına kadar giden birçok patolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır [59].

Serbest radikallerin oluşturduğu hücre hasarlarından korunmak için antioksidanlar hayati önem taşıyan moleküllerdir. Bu nedenle, antioksidanlar hedef moleküllerdeki oksidan hasarı engelleyen veya geciktiren maddeler olarak tanımlanabilir ve bu tanımla bağlantılı olarak antioksidanların etkileri farklı şekillerde olabilmektedir [60]. Antioksidanlar, hem direkt, hem de dolaylı olarak hücreleri oksidanlardan koruyan maddelerdir [61].

Antioksidanlar aşağıdaki verilen tablolarda belirtilmiş kriterlere göre farklı sınıflandırmalar içermektedir (Tablo 2-4).

Tablo 1.2. Çözünürlüklerine göre antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidan	**Faz**	**Etki**
Süperoksit Dismutaz (SOD)	Hidrofilik	$O_2^{\cdot}$'nin H_2O_2ve O_2'e dismutasyonu
Katalaz (CAT)	Hidrofilik	H_2O_2'nin H_2O ve O_2'e dismutasyonu
Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)	Hidrofilik Lipofilik	R-OOH'nin R-OH indirgenmesi
Glutatyon redüktaz (GSH-Rd)	Hidrofilik	Okside glutatyonun indirgenmesi
Glutatyon S Transferaz (GST)	Hidrofilik	R-OOH'nin GSH ile konjugasyonu
Metallotieninler	Hidrofilik	Geçiş metalleriyle nötralizasyon
Glutatyon	Hidrofilik	GSH-Px ve GST'nin kofaktörü
Askorbik asit	Hidrofilik	Serbest radikal temizleyicisi Tokoferol kazanımı
Karotenler	Lipofilik	Serbest radikal temizleyicisi
Tokoferol	Lipofilik	Selenyum absorbsiyonunu arttırır
Selenyum	Amfifilik	GSH-Px yapıtaşı

Tablo 1.3. Yapılarına göre antioksidanların sınıflandırılması

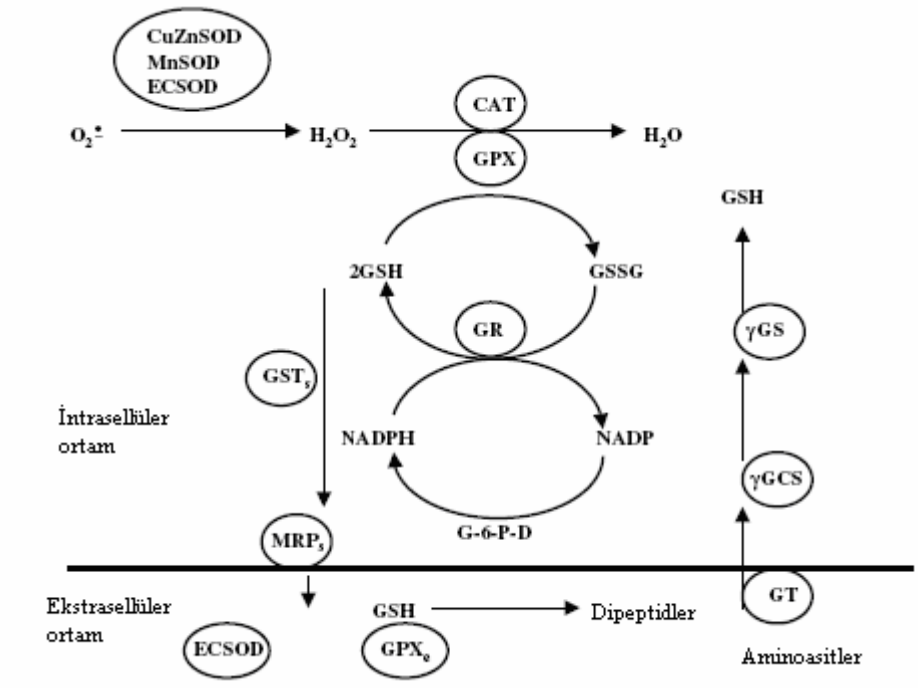
Enzim kaynaklı olanlar	**Enzim kaynaklı olmayanlar**	
Süperoksit dismutaz	Sistein	Albumin
Katalaz	Alfa- tokoferol	Bilirubin
Glutatyon peroksidaz	Melatonin	Transferin
Glutatyon-S-transferaz	Ferritin	Flavonoidler
Glutatyon redüktaz	Askorbat	Serüloplazmin

Tablo 1.4. Kaynaklarına göre antioksidanların sınıflandırılması

Endojen kaynaklı	**Eksojen kaynaklı**
Süperoksit dismutaz (SOD)	Folik asit (Folat)
Hemoglobin	β-karoten
Melatonin	Askorbik asit (vitamin C)
Glutatyon	α-tokoferol (vitamin E)
Katalaz (CAT)	Sitokinler (TNF ve IL-1)

1.7. Antioksidan Etki Mekanizmaları

Antioksidanların serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya yeni bir moleküle çevirme işlemine "toplayıcı etki" denir. Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştürme işlemine "bastırıcı etki" denir. Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak (hemoglobin gibi) zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleme işlemine "zincir kırıcı etki" denmektedir [62].



Şekil 1.7. Dokularda birincil antioksidan enzim sistemi ve bağlı yollar [63]

1.8. Antioksidan savunmayı sağlayan birincil antiksidan enzimler

1.8.1.Süperoksid dismutaz (SOD)

Antioksidan enzimler organizmanın savunmasında oksidatif strese karşı hayati öneme sahiptirler. Süperoksit radikalinin ortadan kaldırılmasında bu enzim sisteminin en önemlisi SOD'dur. İlk olarak 1968 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanan SOD, yapısında bakır, çinko ve manganez içerdiğinden metalloenzim olarak isimlendirilir. Süperoksidin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler ve süperoksit düzeylerini kontrol etmede önemli bir rol oynar [64].

Katalizlediği reaksiyon normalde meydana gelebilir ama SOD ile 4000 kat daha hızlı gerçekleşir.

$$2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

İnsanda SOD un iki tipi bulunmaktadır. Bunlar sitozolde bulunan dimerik, Cu ve Zn bulunduran(Cu-Zn SOD) ile mitokondride bulunan tetramerik Mn (Mn SOD) bulunduran izomerlerdir. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokuda fazladır. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit üretimi olmasına rağmen bu enzim sayesinde intraselüler süperoksit seviyeleri düşük tutulur [65].

1.8.2.Katalaz (CAT)

Leew ve arkadaşları tarafından ilk kez 1901 yılında dağada keşfedildikten sonra, 1937 yılında Sumner ve Dounce tarafından karaciğerde bulunduğu gösterilmiştir [67,68]. Glikoprotein yapısında bir hemoproteindir. En yüksek aktivite karaciğer ve böbrekte saptanırken, en düşük aktivite destek dokusunda saptanmıştır. Hidrojen peroksitin aşırı arttığı ortamlarda aktivite göstererek, moleküler oksijen ve suya parçalanmasını sağlar [66].

$$2\ H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

Katalaz, kanda, kemik iliğinde, mukoz membranlarında ve böbrekte de bulunur.

1.8.3. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)

Glutatyon Peroksidaz organik hidroperoksitlerin (lipit hidroperoksitler, DNA hidroperoksitler) veya hidrojen peroksitin GSH tarafından indirgenmesi tepkimesini katalizler. 1957'de Mills tarafından keşfedilmiştir [70]. GSH-Px aşağıdaki tepkimeleri gerçekleşmesini sağlar [69].

$$H_2O_2 + 2\ GSH \longrightarrow 2\ H_2O + GSSG$$

$$ROOH + 2\ GSH \longrightarrow ROH + GSSG + H_2O$$

Glutatyon Peroksidaz enzimi selenyuma bağlı ve selenyuma bağlı olmayan şeklinde ikiye ayrılır [71]. Normal koşullarda hücreda bulunan H_2O_2 in detoksifikasyonundan esas olarak Glutatyon peroksidaz sorumludur. GSH-Px lipid peroksidasyonunun başlamasını ve gelişmesini önleyici özellikte bir enzimdir [66].

Ayrıca GSH-Px'in, fagositik hücrelerde diğer antioksidanlarla birlikte solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmelerini engellediği gösterilmiştir [72]. Eritrositlerde de GSH-Px oksidatif strese karsı en etkili antioksidandır [73].

1.8.4. Glutatyon redüktaz (GSH-Rd)

Glutatyon redüktaz sitoplazmaya lokalize olmuştur. Şimdiye kadar birçok prokaryotik ve ökaryotik kaynaktan izole edilmiştir. Tüm koşullarda aktif merkezinde molekül başına bir adet flavinoid adenozin dinükleotid (FAD) içeren dimerik bir flavoenzimdir [74]. Okside glutatyon (GSSG) NADPH bağlı flavo enzim olan Glutatyon Redüktaz tarafından redükte formuna (GSH) indirgenir. Bu tepkime aşağıdaki gibi gerçekleşir [75].

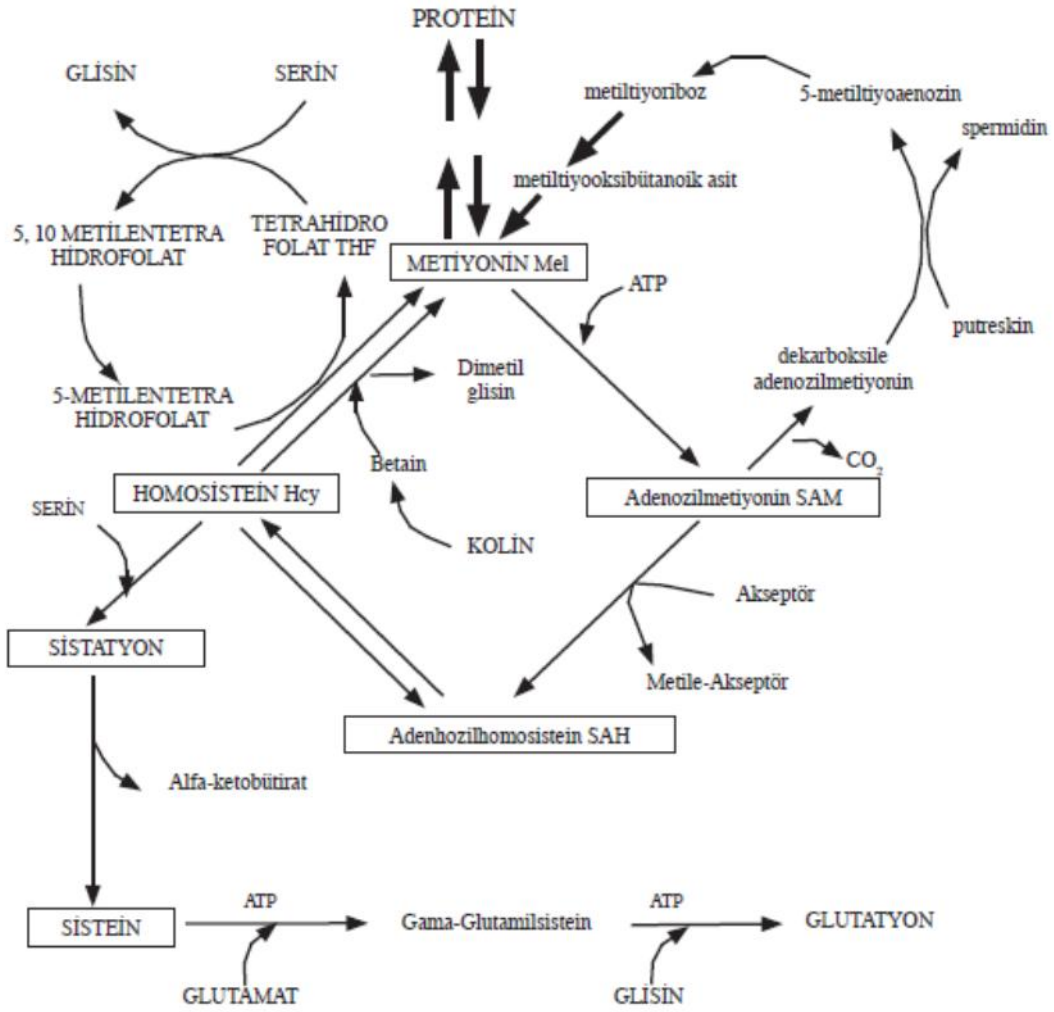
$$GSSG + NADPH + H^+ \longrightarrow 2GSH + NADP^+$$

Normal hücrelerde GSH/GSSG oranı son derece yüksektir ve GSSG'nin yeniden GSH'a indirgenmesi gerekir. Enzimin katalizlediği reaksiyon sırasında FAD,

NADPH tarafından indirgenirken açığa çıkan elektronlar, aktif merkezdeki disülfid bağına taşınır ve bu şekilde GSSG, iki GSH molekülüne indirgenmiş olur

1.9. Tiyol Grubu İçeren Antioksidanlar

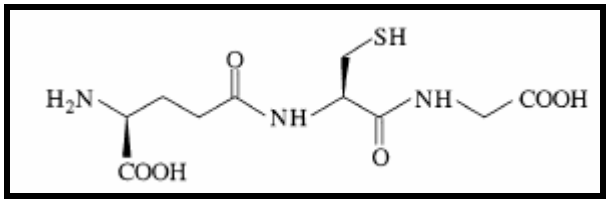
Tiyol terimi -SH grubu içeren bileşikleri gösterir. Plazma tiyolleri, fizyolojik olaylar üzerinde prooksidan veya antioksidan etkilere sahip olmasına karsın genel olarak antioksidan kabul edilirler [76,77]. Vücuttaki tiyol antioksidanlara ait döngü Şekil1.8'de verilmiştir.



Şekil 1.8. Tiyol içeren antioksidanların döngüsü [78,79]

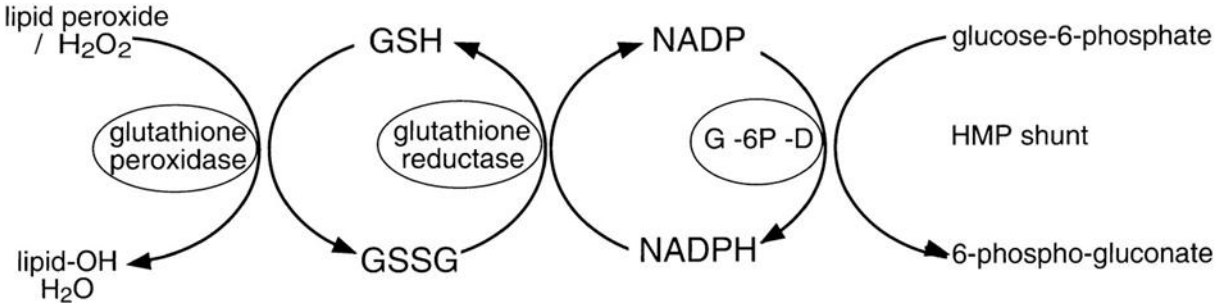
1.9.1. Redükte glutatyon (GSH)

Tripeptid yapıdaki GSH (L-γ- glutamil-L-sisteinil-glisin) bir çok oksidatif stres kaynağına karşı hücreyi korumada önemli role sahiptir. GSH, glutamat, sistein ve glisinden sentezlenir. Bu sentez sitozolik enzimler olan gama glutamil sistein sentetaz ve glutatyon sentetaz tarafından katalizlenir.



Şekil 1.9. Redükte Glutatyonun (GSH) molekül yapısı..

GSH, sitozolik GSH redoks döngüsünde substrat olarak rol alırken, ROT'lara karşı direkt olarak da savunma yapabilen ve memeli canlılar için hücre düzeyinde olmazsa olmaz esansiyel bir antioksidandır [70].



Şekil 1.10. Glutatyonun redoks döngüsü

Gulutatyon redoks döngüsünde görüldüğü üzere GSH'ın antioksidan özelliğinde NADPH'ın konsantrasyonun önemli olması nedeniyle hücredeki pentoz yan yolunun işlemesi gerekmektedir. Bu yüzden hücrelerdeki Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği de, oksidatif stresin ilerlemesinde rol sahibidir.

Eritrositlerin savunmasında çok önemli role sahip olan GSH, bu hücrelerin oksidatif strese maruz kalmaları durumunda hızlı bir şekilde okside glutatyon(GSSG) formuna dönüşürler. Bu formda aktif taşımayla hücre dışına transport edilirler. GSH, hücre zarından geçmezken, GSSG çok daha kolay geçebilmektedir. Ancak eritrositler, bu transport sistemine sahip olmadıklarından, transport işlemi hücre

zarına penatre olan ajanlarca (NAC veya GSH esterleri gibi) hücre içi GSH düzeylerinin artışı sağlanarak gerçekleştirilir. GSH salınımı, ana sentez kaynağı olan karaciğerde gerçekleşir ve okside formu olan GSSG 'nin salınımında olduğu gibi diğer dokulara kan dolaşımıyla ulaşır [80].

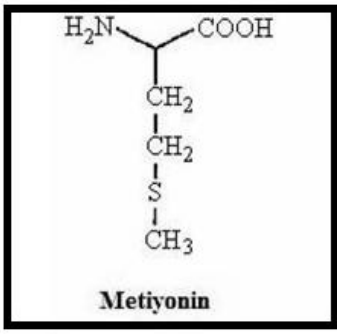
$$2GSH + H_2O_2 \longrightarrow GSSG + 2H_2O$$

Hücrelerde, total glutatyonun %90'i GSH, kalan %10'lik kısmı ise okside glutatyon (GSSG) şeklinde bulunur. Hayvansal hücrelerin birçoğunda, GSSG'nin protein sentezini inhibe ettiği bilinmektedir. Bu bilgi GSSG'nin hücrelerde neden daha düşük derişimler de bulunduğunu ve GSSG'nin neden kalp ve böbrek gibi organlar ile eritrositlerden dışarıya taşındığını açıklamaktadır [75].

1.9.2. Metiyonin

Metiyonin, vücudun ana sülfür kaynaklarından biridir. İnsanlar tarafından metiyonin inorganik sülfürden sentezlenemediği için gıdalarla birlikte alınması zorunlu olan esansiyel bir amino asittir .

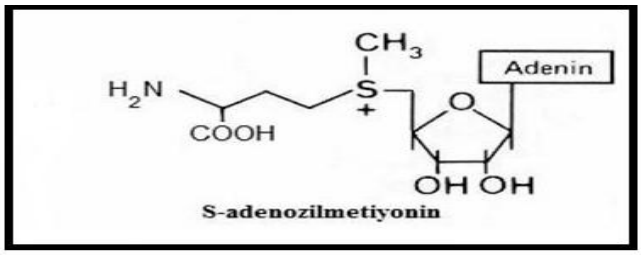
Protein sentezinde metiyonin önemli bir metil vericisidir . Biyolojik sistemlerdeki dinamik dengenin devamlılığı, özellikle de metiyonin oksidasyon ve redüksiyon dengesi, proteinlerin regülasyonunda önemlidir. Ayrıca metiyonin oksidatif stres altındaki proteinlerin oksidasyondan korunmasında önemli role sahip olduğuda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [76,77].



Şekil 1.11. Metiyoninin molekül şekli

1.9.3. S-adenozil-L-metiyonin (SAM)

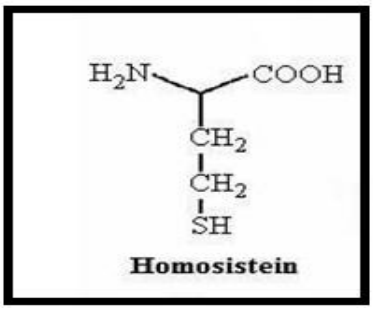
S-adenozilmetiyonin sülfir içeren aminoasitlerden metiyoninin bir metaboliti ve önemli bir metil vericisidir. SAM'de metiyonin gibi vücudun sülfür gerektiren birçok metabolik yolunda gereklidir. Vücut tüm gerekli SAM'i metiyoninden sentezleyebilir. Molekülden transsülfürasyonla bir metil grubunun ayrılması ile S-adenozil-homosistein oluşabilir. Bu bileşik homosisteine ve sonra glutatyonun öncülü olan sisteine dönüşür [81].



Şekil 1.12. S-adenozil-L-metiyoninin molekül şekli

1.9.4. Homosistein (Hcy)

Homosistein bir aminoasit olup, metiyoninin demetilasyonu ile ortaya çıkan bir tiyol formudur. Gıda ile birlikte fazla miktarda metiyonin insana verildiğinde homosistein siklusu bazal seviyelere iner. Metiyonin metaboliti olan S-adenozilmetiyonin (SAM), homosistein moleküllerinin sentezinin oranını etkiler [76,77]. Bilim dünyasında Hcy yüksek konsantrasyonlarda ateroskleroz ve vasküler hastalıklar için bir risk faktörü olarak bilinmesine rağmen, bazı araştırmalara göre mikromolar konsantrasyonlarda moleküler yapısında bulunan sülfür grubu ile antioksidan özellik de göstermektedir [82].

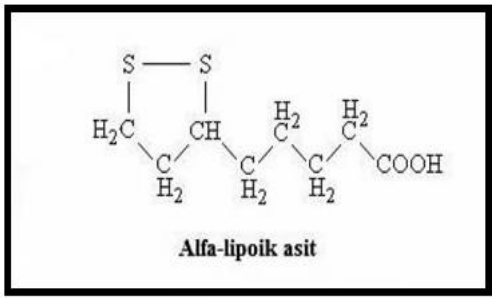


Şekil 1.13. Homosisteinin molekül şekli

1.9.5. α-Lipoik asit (LA) (tiyoktik asit)

Alfa-lipoik asit, mitokondride enerji ile ilgili pirüvat ve α-ketoglutarat dehidrojenaz multienzim komplekslerinde kofaktör olarak rol alır [83,84]. Terapötik olarak serbest radikallerin hücrelere vereceği zararların önlenmesinde, antioksidan etkisiyle oksidatif stresin azaltılmasında ve kan glukozunun düşürülmesinde görev aldığı bilinmektedir. Aköz ve hidrofobik ortamlarda yapılan çalışmalarda α-lipoik asidin koenzim Q10 ve hücre içi GSH düzeylerini de arttırdığı görülmüştür. Oral verildikten sonra α-lipoik asit tamamen absorbe edilmekte ve indirgenerek dihidrolipoik aside (DHLA) dönüşmektedir [85].

Antioksidan savunmada önemli rolü olan GSH'nın yeniden oluşturulmasında mili-molar konsantrasyonlarda NAC gerekirken, mikromolar düzeyde LA gereklidir.

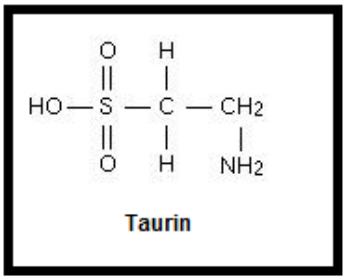


Şekil 1.14. α-Lipoik asitin molekül şekli

1.9.6. Taurin

Taurin, yapısındaki serbest sülfhidril grubu ile ROT temizlenmesinde direkt etkili ve oksidatif hasardan kaynaklanan membran permeabilitesinin önlenmesinde ise, indirekt etkili bir antioksidandır [86]. Boğa safrasında doğal olarak bulunduğu için "taurin" ismi verilmiştir.

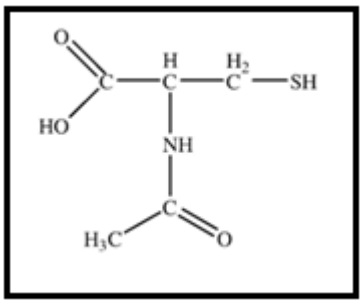
Taurin (2-aminoetanesülfonik asid) hemen bütün memeli dokularında bulunan, yarı esansiyel bir amino asittir. *İn vivo* ve *in vitro* olarak antioksidan özellikleri bulunan, diğer proteinlerin yapısına katılmayan, beta aminoasit yapısında bir moleküldür. Diyetteki et ve sebzelerle alınmakla birlikte, sistein ve metiyoninden de sentez edilebilmektedir [87,88].



Şekil 1.15. Taurinin molekül şekli

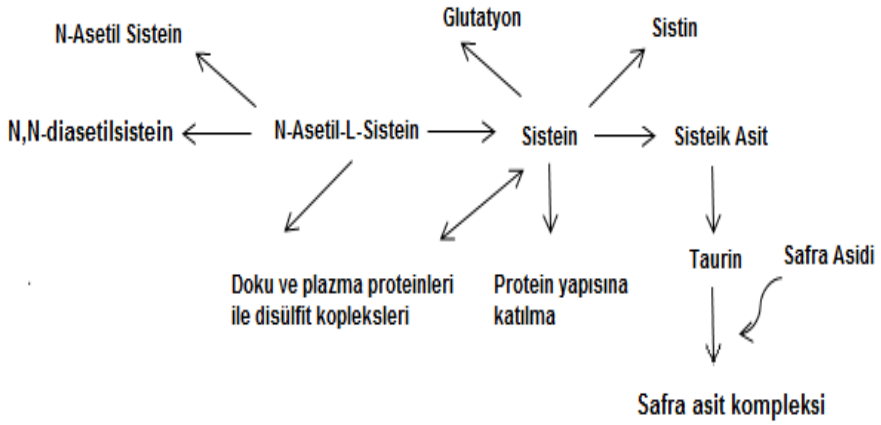
1.9.7. N-Asetilsistein (NAC)

N–Asetilsistein (NAC) doğal bir aminoasit olan bir tiol molekül olan L-Sistein 'in N-asetillenmiş türevine verilen isimdir. Kimyasal formülü $C_5H_9NO_3S$, moleküler ağırlığı 163,2 gr/mol'dür. En iyi ve en eski bilinen etkisi mukolitik etkisidir. Bu özelliği molekül içerisinde bulunan serbest sülfhidril (-SH) grupları için zengin bir kaynak teşkil etmesinden ve balgam içerisindeki mukoprotein moleküllerindeki disülfür köprülerini kırmasına ve onları depolimerize etmesine bağlıdır.



Şekil 1.16. N-Asetil sistein molekül şekli

NAC, GSH sentezinde bir substrat olarak görev alır. NAC'ın yapısında bulunan SH grupları nedeniyle O_2^{-1} ve H_2O_2 gibi oksidanlar ile direkt olarak etkileşir. Bu reaksiyonda iki NAC molekülü bir disülfit bağını oksitler. Böylece O_2^{-1} içeriği düşüş gösterir. Ayrıca NAC, bir OH^- radikal yakalayıcısıdır. 10^{-5} M üstünde NAC alınması intrasellüler GSH seviyesinde yaklaşık olarak 10 kat artış oluşturur. Moleküler yapısı ile hücre içine kolayca giren NAC burada deasetillenerek L–sisteine dönüsür. L–sistein bir glutatyon prekürsorüdür ve glutatyon sentezini artırır [90,91].



Şekil 1.17. NAC'ın hücredeki metabolik yolları

NAC bağırsaklardan yüksek oranda absorbe edilir. Hızla metabolize olurken yalnızca %10 'luk bir kısmı metabolize edilmeden atılır [89].

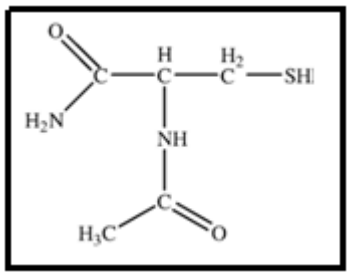
NAC'ın

- Nükleoflik olması
- Mitokondrideki etkileri
- Karsinojenlerin biyolojik etkilerini azaltışı
- DNA onarımını sağlaması
- Genotoksik oluşumunu inhibe etmesi
- Apoptozis ve antiinflamatuar (iltihap önleyici) aktivitesi
- Kötü huylu tümörlerin gelişimini baskılaması
- Hücre döngüsünün devamını etkilemesi
- Hücre immünitesinde rol oynaması
- Kimyasal ajanlar veya diğer kimyasal önleyici ajanların zehirli etkilerine karşı önleyiciliği

gibi vücüt savunması için önemli özellikleri vardır.

1.9.8. N-Asetilsistein amid (NACA)

NACA, NAC'ın karboksil grubunun nötralize edilerek dizayn ve sentez edilmiştir. NAC'ın hücre içine geçme özelliği fizyolojik pH koşullarında karboksil grubunun negatif yükü dolayısıyla çok düşüktür. NACA, NAC'daki karboksil grubunun yerine amid grubu içeren modifiye bir formdur. Bu özelliği sayesinde yüksek membran permeabilitesi ve düşük toksititeye sahiptir.



Şekil 1.18. NACA nın molekül şekli

Son çalışmalarda NACA'nın kırmızı kan hücrelerinde NAC'dan daha etkin bir şekilde hücre içine geçtiği ve hücre içi glutatyon düzeyini arttırdığı tespit edilmiştir. Bunun daha da ötesinde NACA hidrolize edilerek endojen glutatyon üretiminin temelinde yer alan sisteine dönüştürülebilir. NACA'nın *in-vitro* antioksidan özelliklerini gösteren bir çalışmada serbest radikal süpürücü, metal şelatleyici ve lipid peroksidasyonunu önleyici özelliği ortaya konmuştur [7].

Bu özellikleriyle NACA, NAC'ın dezavantajlarını ortadan kaldırabilir ve gelecek çalışmalarda NAC'ın yerini alabilir.

2.ÇALIŞMA İLE İLGİLİ KAYNAK ÖZETLERİ

Paraquat ile yapılan zirai mücadele sırasında gerek tarım alanı çevresinde yaşayan insanlar gerekse paraquat kalıntısı içeren meyve ve sebzeleri tüketenler paraquat toksisitesine maruz kalabilirler. Paraquat yüksek elektron afinitesi nedeniyle sistemik etki gösterir ve oksijen konsantrasyonunun yüksek olduğu dokularda daha büyük hasar oluştur. Bu nedenle paraquattan en çok etkilenen organ akciğerlerdir [4].
Paraquatın akciğerlere verdiği hasarla ilgili bir çalışmada Paraquatın neden olduğu akciğer toksitesinin iki kısımdan oluştuğu, bunların ise akciğer dokusundaki alveollerin epitel hücrelerinin yıkımı ve kolojen yapısındaki değişiklikler ile fibrolastların farklılaşması olduğu gösterilmiştir [98]. *İn vitro* deneylerle PQ'ın hidrojen peroksit ve hidroksil radikalerin oluşumuna neden olduğu ve bunun sonucunda ise lipit peroksidasyonunun arttığı tespit edilmiştir [16].

Paraquatın hücrede serbest oksijen radikallerine dönüşüp hücre hasarına neden olduğunu gösteren birçok çalışma vardır. Bu çalışmaların birinde paraquat indüksiyonu sonucu oluşan oksidatif stresin apoptotik hücre ölümüne neden olduğu ve bu hasarın önlenmesi için askorbik asit ve NAC'ın koruyucu antioksidan olarak kullanılabileceği gösterilmiştir [93]. Paraquatın hepatoselluler karsinom hücrelerinde (HepG2) *in vitro* koşullarda apoptozise yol açtığı gösterilmiştir [94]. Başka bir çalışmada ise paraquatın nöronal hücre ölümü ile ilişkili olduğu ve bu hücre hasarının özellikle Parkinson hastalığı üzerindeki etkisi gösterilmiştir [95]. NAC ile ilgili literatürde pek çok çalışma vardır. Bunların birinde kokain ile gelişen karaciğer hasarının NAC'ın antioksidan etkisi ile azaltılabildiği gösterilmiştir [96]. Ayrıca NAC'ın HIV virüsünün etkisini, hücrelerdeki glutatyon düzeyini arttırarak bloke ettiği ortaya konmuştur [97]. Tariq ve arkadasları yaptıkları bir çalışmada değişen dozlarda siklosporin ve NAC verdikleri rat gruplarını karşılaştırdıklarında, yalnızca siklosprin verilen gruplarda kan üre azotu değerlerinde yükselme gözlerken, NAC verilen grupta değişim gözlemediklerini, histolojik incelemede ise siklosporin ile oluşan değişikliklerin NAC tarafından engellendiğini rapor etmişlerdir [99]. Çeşitli çalışmalarda uzun süreli NAC kullanımının KOAH'da atak sayısını ve soluk alıp verme esnasından nefesteki hidrojen peroksit gibi oksidatif stres göstergelerini azalttığı gösterilmiştir [100].

N-Asetilsistein Amid (NACA), N-Asetilsistein'in (NAC) karboksil grubunun nötralize edilerek, hücre membranından geçişi kolaylaştırmayı mümkün kılmak için dizayn ve sentez edilmiş yeni bir antioksidan moleküldür. NACA'nın sentezlendiği çıkış molekül olan NAC ile ilgili literatürde binlerce çalışma varken NACA ile ilgili bugüne kadar yaklaşık 15 çalışma mevcuttur. Bununla beraber son yıllarda NACA'nın antioksidan özelliklerinin ortaya konması ve ilaç olarak kullanılabilirliği ile ilgili çalışmalar artarak devam etmektedir.

NACA'nın *in vitro* antioksidan özelliklerini gösteren en temel çalışmada serbest radikal süpürücü, metal şelatleyici ve lipid peroksidasyonunu önleyici özellikleri ortaya konmuştur. Aynı zamanda bu çalışmada NACA nın bu özelliklerinin bilinen antioksidan moleküller NAC, askorbik asit ve α-tekaferol ile karşılaştırılabilir veya yüksek düzeyde olduğu gösterilmiştir [7]. NACA, NAC'dan türetilmiş yeni bir antioksidan olduğu için bu iki bileşiğin çeşitli metodlarla karşılaştırıldığı çalışmalarda vardır. Bunlardan bir tanesinde NACA'nın NAC' daha hızlı bir şekilde kan beyin bariyerini geçtiği zamana bağlı incelenerek HPLC-floresan dedektör kullanılarak gösterilmiştir [101].

NAC'nın hücre kültüründe *in vitro* özelliklerini ve hayvan çalışmaları ile *in vivo* özelliklerini ortaya koymak için Ercal ve arkadaşları en yoğun çalışan guptur. Bu grubun yaptığı çalışmaların birinde NACA'nın radyasyon ile indüklenmiş yumurtalık hücrelerinde glutatyon düzeyini arttırarak oksidatif stres hasarını belli ölçüde engellediği ortaya konulmuştur [102]. NACA'nın önemli özelliklerinden olan kan beyin bariyerini geçme özelliğininden yararlanmak için yapılan çalışmada ise beyin endotelyal hücreleri gp120 ve Tat ile indüklenerek oksidatif strese maruz bırakılmıştır. Çalışma sonucunda NACA'nın gp120 ve Tat'ın oluşturduğu oksidatif hasarını tersine döndürdüğü ortaya konulmuştur [103].

İn vitro bir çalışmada ise NAC ve NACA karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş ve oosit domuzlarında embriyonun gelişmesine etkileri incelenmiştir. NACA'nın NAC dan daha üstün olan antioksidan özellikleri bu çalışmada da gösterilmiştir[92]. NACA ile *in vitro* olarak yapılan başka bir çalışmada ise beta talasemili hastalardan elde edilen kırmızı kan hücrelerindeki glutayon seviyesinde azalmanın, trombosit ve polimorfonükleer (PMN) lökosit oluşumunun NACA tarafından iyileştirildiği rapor edilmiştir [104].

Oksidatif stresin Parkinson ve serabral iskemi gibi nörodejeneratif durumlarda nöral hücrelerde hasara yol açtığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Yapılan bir

çalışma ise NACA'nın Parkinson gibi nöral hasarla oluşan hastalıkların tedavisinde kullanılabilir olabileceği ile ilgili deliller içermektedir [105].

NACA'nın kırmızı kan hücrelerinde NAC'dan daha etkin bir şekilde hücre içine geçtiği ve hücre içi glutatyon düzeyini arttırdığı tespit edilmiştir. NACA hidrolize edilerek endojen glutatyon üretiminin temelinde yer alan sisteine dönüştürülür. Sisteinin GSH sentezinde temel rol oynadığı ve GSH sentezi için hız belirleyici bir enzim olan γ-glutamat sistein ligaz enzimini indüklediği, aynı zamanda serbest radikal süpürücü özelliği ve metalleri şelatlama özelliği ortaya konmuştur[98]. Başka bir çalışmada ise glutamat ve kurşun zehirlenmesine bağlı olarak oluşturulan hasarda GSH seviyesinin böbrek, karaciğer, beyin ve kırmızı kan hücrelerinde azaldığı gösterilmiş. NACA nın antioksidan olarak oluşan bu hasarda koruyucu olduğu hatta NAC dan daha iyi sonuçlar verdiği gösterilmiştir [106]. L-Buthionine-(S, R)-sulfoximine (BSO), γ-glutamylcysteine sentetazın inhibitörüdür. Katarakt ise yaşın ilerlemesi ile ortaya çıkan bir göz hastalığıdır. NACA'nın, BSO nun neden olduğu katarak hastalığında antioksidan savunma sistemi etkisi ile koruyucu bir etki gösterdiği bu çalışmada gösterilmiştir [107].

Bu kapsamda tezin amacı paraquat maruziyetinin neden olabileceği akciğer hasarına karşı NACA'nın olası koruyucu etkilerinin biyokimyasal ve histolojik parametreler ile araştırılmasıdır. NACA'nın *in vitro* bazı antioksidan özelliklere sahip olduğu ortaya konmuştur. Bu çalışma NACA'nın *in vivo* kullanılabilirliği açısından önemlidir ve bu yönüyle NACA'nın ileride ilaç olarak kullanılabilinirliğine önemli katkılar sağlayacağı aşikârdır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Deneysel Modelin Uygulanması

Deneysel model için yapılan planlama aşağıda ayrıntılı verilmiştir.
30 adet erkek erişkin Wistar cinsi sıçan;
Grup 1: Kontrol(n:10),
Grup 2: Paraquat (10 mg/kg) (n:10),
Grup 3: Paraquat (10 mg/kg) + NACA (100 mg/kg/gün) (n:10),
olacak şekilde gruplandırıldı. NACA uygulaması intraperitonal olarak Paraquat uygulamasından 30 dakika önce gerçekleştirildi. Paraquat uygulaması haftada iki kez olmak üzere subkutan olarak geçekleştirildi. Uygulama suresi 28 gün olarak gerçekleştirildi. Bu sürenin sonunda hayvanlar sodyum pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) anestezisi altında kanları alınarak sakrifiye edildikten sonra akciğer dokuları alındı. Akciğer dokusu biyokimyasal ve histolojik analizler için hazırlandı.

3.2. Biyokimyasal Analizler

3.2.1. Dokuların homojenizasyonu

Akciğer dokusu 1/5 w/v oranında PBS tamponu (pH 7,4) eklenerek buz izolasyonu altında IKA-Werke T25 homojenizatörü ile tüm doku parçalanıncaya kadar homojenize edildi. Kalan homojenatlar, Sonics VCX130 sonifikatörde 30 saniyelik aralıklarla 4 defa 15 saniye sonifiye edildi. Elde edilen homojenattan 1 mL MDA ölçümü için ayrıldı. Sonifiye işlemlerinin ardından 10.000 g' de +4 ºC' de 10 dakika Nüve NF 800R mikrosantrifüj aletiyle santrifüj işlemi yapıldı. Böylece enzim aktiviteleri ve protein tayinin yapılacağı süpernatan elde edildi. Süpernatan örnekleri ölçüm işlemleri yapılıncaya kadar -70 ºC de derin dondurucuda saklandı.

3.2.2. Katalaz aktivite tayini

Katalaz enziminin aktivite tayini Luck H. [108] yöntemine göre yapıldı.

Gerekli çözeltiler :

-- 1/15 M konsantrasyonda Na, K-fosfat tamponu (Na_2HPO_4- KH_2PO_4) pH: 7

-- Derişik H_2O_2 çözeltisi

Yöntem:

Katalaz ölçümünde kullanılmak üzere spektrofotometrede 240 nm'de absorbans 0,7-0,9 oluncaya kadar Na-K-fosfat tampon çözeltisine derişik (% 35 'lik) H_2O_2 ilave edildi. Numunelerin katalaz içeriğini belirlemek için hazırlanan bu karışımdan 1000 µl alınıp küvete kondu ve üzerine çalışma aralığına bağlı olarak 30 µl başlayarak gittikçe artan konsantrasyonlarda süpernatan eklendi ve bir kez karıştırılıp Shimadzu 1601-UV visible spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda 30 sn süreyle H_2O_2'nin (ε= 0,0396 cm^2 μmol^{-1}) absorbans değişimi okundu. Okunan bu optik dansite farkından mL'deki enzim ünite sayısı hesaplandı.

3.2.3. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivite tayini

SOD enziminin aktivite tayini McCord J.M, Fridovich I [109] yöntemine göre yapılmış olup yöntemin esası ksantin/ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit radikallerinin *sitokrom-c*'yi indirgemesinin SOD tarafından inhibisyonu temeline dayanır.

Süperoksit dismutaz çeşitli yollarla ortaya çıkan süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) radikalinin hidrojen peroksite (H_2O_2) dismutasyonu reaksiyonunu katalizler. SOD enzim aktivitesi ksantin/ksantin oksidaz (XO) sistemi ile üretilen $O_2^{\cdot-}$ radikallerinin *sitokrom c* okside etmesi sonucu oluşan renk değişiminin inhibisyonu 550 nm'de takip edilerek belirlendi. Bu reaksiyona dayanan optik dansitedeki azalmadan yararlanarak SOD tarafından reaksiyonun % inhibisyonu belirlendi. Bu reaksiyonu % 50 inhibe eden örneklerdeki SOD miktarı 1 Unite (U) olarak kabul edildi ve sonuçlar U/mg protein olarak verildi.

% inhibisyon = ((ODkör – ODnum) / ODkör) x 100.

Gerekli çözeltiler:

A çözeltisi:

-- 5 µmol ksantinin 0.001 N NaOH‘ daki çözeltisi: 10 hacim

-- 2 µmol *sitokrom-c*’nin 50 mM pH 7,8 ve 0,1 mM EDTA içeren fosfat tamponundaki çözeltisi: 100 hacim

A çözeltisi belirtilen hacim oranlarında karıştırılarak hazırlanır. Bu çözelti +4ºC ’ de 3 gün kararlıdır.

B Çözeltisi:

Ksantin oksidazın 0,1 mM EDTA’daki çözeltisi 0.2U/mL

B çözeltisi deneyden önce taze olarak hazırlanır.

Yöntem:

1) 1’lik spektrofotometre küvetine 1 mL A çözeltisi eklendi.
2) 50 µL örnek ilave edildi.
3) Tepkime 50 µL B çözeltisinin eklenmesiyle başlatıldı.
4) Daha sonra Shimadzu 1601-UV visible spektrofotometrede 550 nm deki absorbans değişimi (1dk.) okundu.
5) Kör okuması yapılırken örnek yerine 50µL distile su eklendi.
6) Örneklerin % inhibisyon değerleri hesaplandı.

3.2.4. Se-Bağımlı glutatyon peroksidaz aktivite tayini

Se-bağımlı GSH-Px enziminin aktivite tayini için Lawrance R.A, Burk R.F yöntemi kullanılmıştır. [74]

Gerekli çözeltiler:

Tampon Çözelti : 50 mM KH_2PO_4 + K_2HPO_4 + 5 mM EDTA içeren pH:7 olan çözelti tampon çözelti olarak kullanılmıştır.

NaN_3 (Sodyum azid) : 1 mM

H_2O_2 : 0.25 mM

NADPH : 0.2 mM

GSH (Redükte glutatyon) : 2 mM

GSSG Redüktaz : 1.2 U/mL

Yöntem:

Yukarıdaki derişimlerde hazırlanan çözeltilerle önce kör ardından da örnek deneyleri yapılmıştır. Kör için 1 mL tampon, 50 μL NADPH, 50 μL GSH, 20 μL NaN_3 ve 50 μL GSSG redüktaz çözeltileri spekrofotometre küvetine kondu. 37^oC de 5 dk süre ile inkübasyona tabii tutulan çözelti karışımına 20 μL H_2O_2 ilave edildi ve Shimadzu UV-1601-UV visible spektrofotometrede 340 nm deki absorbans değişimi 3 dk. takip edildi. Numune deneyleri için ise belirli miktarlarda süpernatan ilave ettikten sonra 37^oC de 5 dk. süre ile inkübasyona tabii tutulup kör denemede olduğu gibi 340 nm deki absorbans değişimi okunarak enzim aktivitesi Unit aktivite olarak aşağıdaki formülle hesaplandı. GSH-Px aktivitesi U/mg protein olarak ifade edildi.

$$C = \frac{\triangle OD}{6220/mL} \qquad \triangle OD: \text{Optik Dansite Farkı}$$

3.2.5. Total Glutatyon (GSH) Ölçümü

5-tio-2-nitrobenzoat (TNB) oluşumu, 412 nm' de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ekstrakt içindeki GSH miktarı, ticari bir GSH standart olarak kullanılarak, nmol/mg protein cinsinden belirlendi [110].

Gerekli çözeltiler:

Fosfat tampon (ph 7)

Tampon çözelti (DTNB 1,5 mg/ml)

NADPH 4 mg/ml (tamponda hazırlanır)

GSH- Redüktaz (6 Unıt/ml)

Yöntem:

1) 1'lik spektrofotometre küvetine 1 mL tampon çözeltisi eklendi.
2) 10 µL örnek ilave edildi.
3) 50 µL NADPH
4) 20 µL DTNB
5) 20 µL GSH - Redüktaz
6) Daha sonra Shimadzu 1601-UV visible spektrofotometrede 412 nm deki absorbans değişimi (5dk.) okundu.
7) Enzim aktivitesi U/mg protein olarak ifade edildi.

3.2.6. NO ölçümü

NO canlı organizmada katıldığı reaksiyonlar ile nitrit (NO^{2-}) ve nitrat (NO^{3-}) son ürünlerini oluşturmaktadır. Bu iki son ürünün oranları değişkendir. Bu nedenle total NO (tNO) üretiminin en iyi göstergesi NO^{2-} ve NO^{3-}'ün birlikte ölçülmesidir. Çalışmamızda akciğer dokusundaki tNO düzeyleri, Griess reaksiyonu kullanılarak, nitrat redüktaz ile NO'in indirgenmesi ile oluşan nitrit (NO^{2-}) ve nitrat (NO^{3-}) düzeylerinin Cayman florometrik kitleri kullanılarak belirlendi [111].

3.2.7. Lipid peroksidasyonunun belirlenmesi

Serbest radikal saldırıları sonucu hücre membranında bulunan lipidlerin peroksidasyonu, son ürün olan malondialdehit (MDA) miktarının Beuge J.A [112] yöntemine göre belirlendi.

Gerekli çözeltiler:

-- % 15 'lik TCA çözeltisi : 1 hacim
-- % 0.375 'lik TBA çözeltisi : 1 hacim
-- 0.25 N 'lik HCl çözeltisi : 1 hacim

Yukarıdaki üç çözeltinin hassas bir şekilde hazırlanıp belirtilen hacim oranlarında karıştırılmasıyla bir solüsyon hazırlandı.

Yöntem :

1-10 mL' lik santifüj tüpleri alındı ve bütün tüplere hazırladığımız solüsyondan 2 mL kondu.
2- Kör tüpleri hariç tutularak örnek tüplerine 0.5 mL homojenat kondu.

3- Bir kez şiddetli bir şekilde karıştırıldı.
4- Kaynar suda (95-100 ºC ’de) 30 dk. bekletildi.
5- Daha sonra tüpler soğutuldu ve 3500 rpm’ de 10 dk. santrifüj edildi.
6- Elde edilen süpernatanın Shimadzu 1601 UV-VIS spektrofotometresinde 535 nm’deki MDA-TBA kompleksi ‘nin (ε : 1.56 x 10^5 $M^{-1}cm^{-1}$) absorbansı okunarak malondialdehit miktarı hesaplandı.

3.2.8. Protein tayini

Protein tayini Bradford M.M. [113] yöntemine göre yapıldı. Standart protein olarak bovine serum albumin (BSA) kullanıldı. Bradford çözeltisiyle doku türüne bağlı olarak süpernatandan çeşitli hacimlerde örnek alınarak protein değerleri hesaplandı.

3.3. Histolojik Değerlendirme

Deney sonunda, sıçanların akciğer dokuları alınarak % 10 formalin solüsyonu içinde tespit edildi. Rutin doku takibi sonrasında parafine gömülen dokulardan, alınan 5 μm'lik kesitlere hematoksilen eozin (H-E) ve periyodik asit schiff (PAS) boyama yöntemler uygulandı. Kesitler Leica DFC-280 ışık mikroskobu ile incelendi.

3.4. İstatiksel Analiz

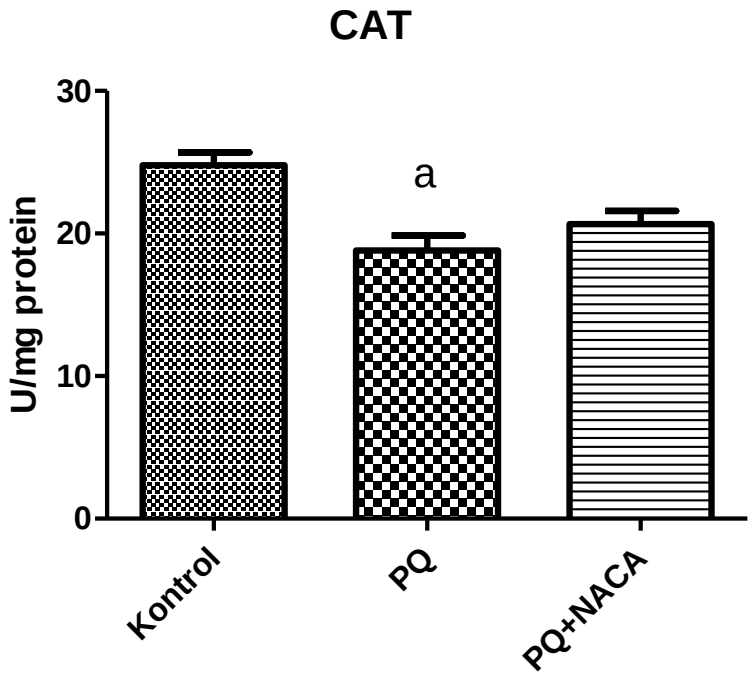
Çalışma bulgularının istatiksel analizinde GraphPad Prism 5.0 programı kullanıldı. Verilerin kıyaslaması One Way ANOVA testi kullanılarak gerçekleştirildi.

4.ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. Biyokimyasal Bulgular

Çalışmada biyokimyasal olarak akciğer hücrelerinde birincil antioksidan sisteme ait enzimler CAT, SOD, GSH-Px, hücrede antioksidan sistemin önemli bir molekülü olan GSH düzeyi ve hücredeki lipid peroksidasyonunun önemli bir parametresi MDA düzeyi ve toplam nitrik oksit (tNO) düzeyi belirlenmiştir. (Şekil 3.1-6).

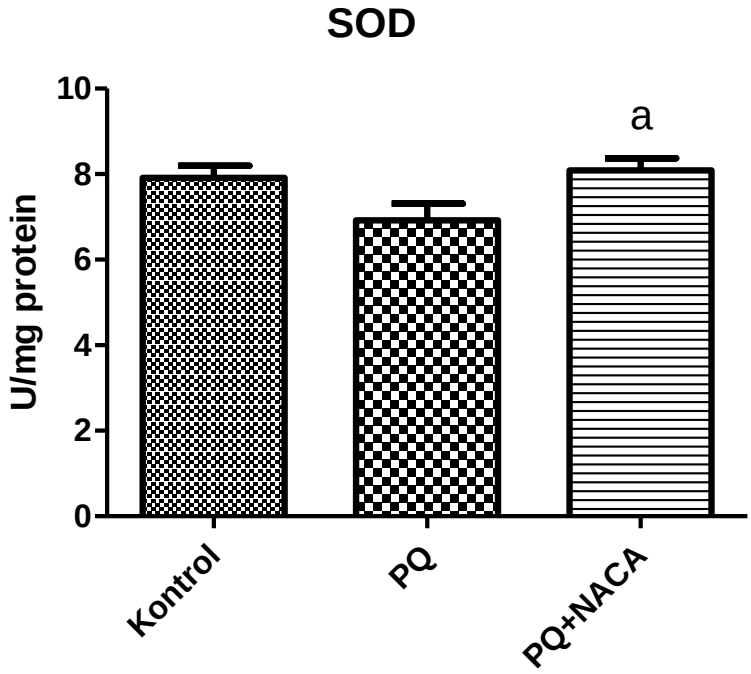
Çalışma sonuçlarımıza göre CAT enzim aktivitesinin PQ grubunda kontrole göre anlamlı *(p<0.01)* azalış sergilerken NACA grubunda PQ grubuna göre artış anlamlı değildir.



Şekil 3.1.1. PQ ile oluşturulmuş deneysel modelde NACA'nın akciğer dokusunda CAT enzim aktivitesi üzerine etkisi.

(a) Kontrol vs. PQ *(p<0.01)*

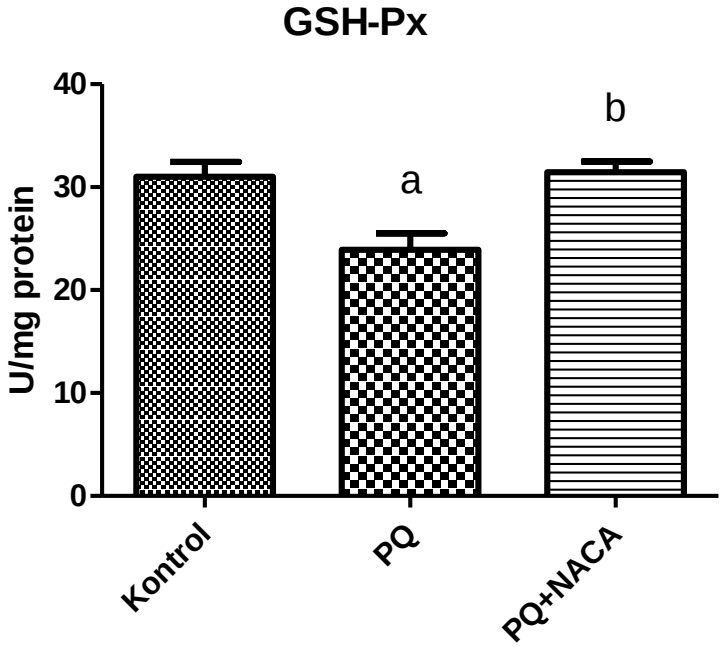
SOD enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre PQ grubunda bir düşüş görülse de bu düşüş anlamlı değildir. Buna karşın NACA uygulaması ile SOD enzim aktivitesinde PQ grubuna göre anlamlı bir yükseliş görülmüştür *(p<0.05).*



Şekil 3.1.2. PQ ile oluşturulmuş deneysel modelde NACA'nın akciğer dokusunda SOD enzim aktivitesi üzerine etkisi.

(a) PQ vs. PQ+NACA *(p<0.05)*

Akciğer dokusunda ki GSH-Px aktivitesi PQ uygulaması ile kontrole göre anlamlı bir düşüş buna karşın NACA uygulanmış grupta PQ grubuyla karşılaştırdığımızda anlamlı *(p<0.01)* bir yükseliş görülmüştür. Bu sonuç GSH-Px aktivitesinin bağlantılı olduğu bileşik GSH düzeyindeki değişim ile paraleldir.

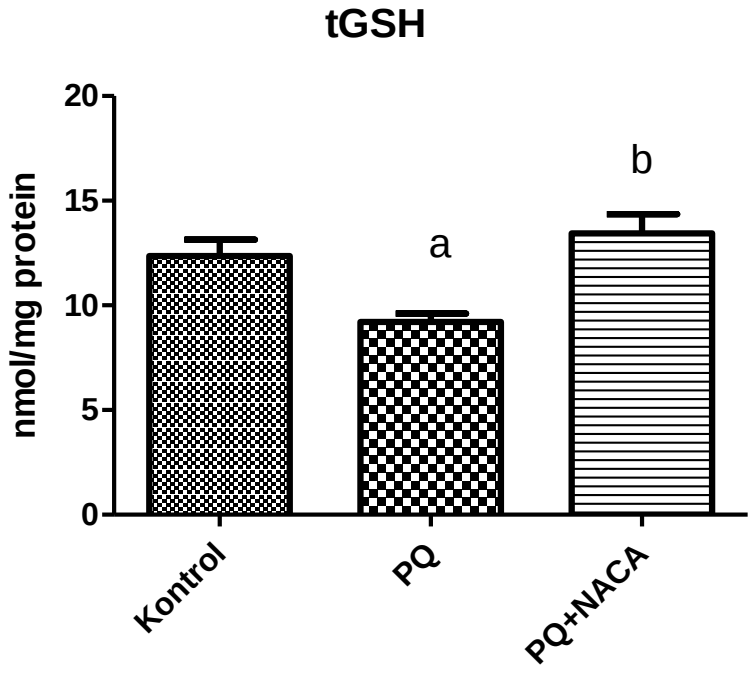


Şekil 3.1.3. PQ ile oluşturulmuş deneysel modelde NACA'nın akciğer dokusunda GSH-Px enzim aktivitesi üzerine etkisi.

(a) Kontrol vs. PQ *(p<0.01)*

(b) PQ vs. PQ+NACA *(p<0.01)*

Glutatyon düzeyi oksidatif stres ve onunla ilgili hastalıkların teşhisinde biyokimyasal ölçek olarak yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Glutatyon düzeyindeki azalma hem direk antioksidan özelliği hem de GSH-Px enziminin reaksiyonunda kullanılması nedeniyle hücrenin savunma mekanizmasında bir hasarın habercisi olarak değerlendirilmektedir. Bizim bu çalışmamızda da PQ uygulaması kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı bir düşüş göstermiştir. Buna karşın NACA uygulaması hem kontrol hem de PQ grubuna göre anlamlı artış göstermiştir.

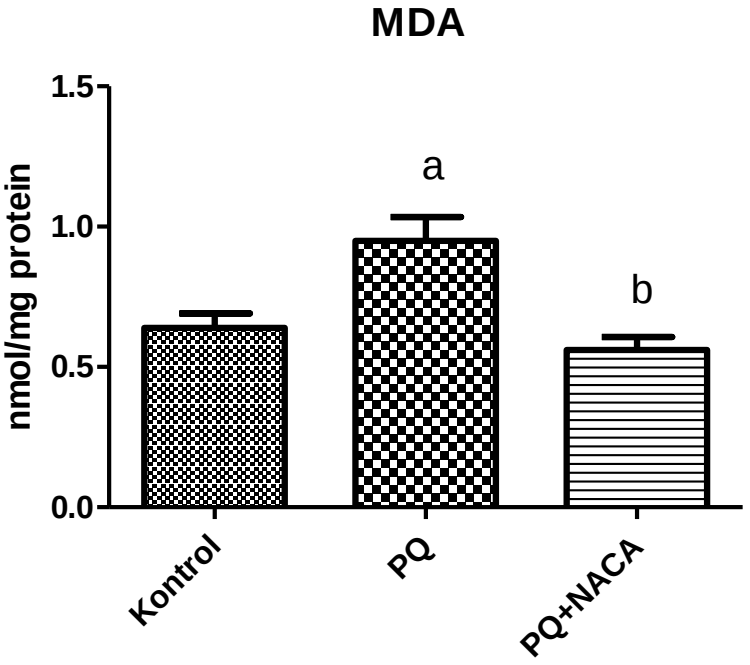


Şekil 3.1.4. PQ ile oluşturulmuş deneysel modelde NACA'nın akciğer dokusunda tGSH düzeyine etkisi.

(a) Kontrol vs. PQ *($p<0.05$)*

(b) PQ vs. PQ+NACA *($p<0.01$)*

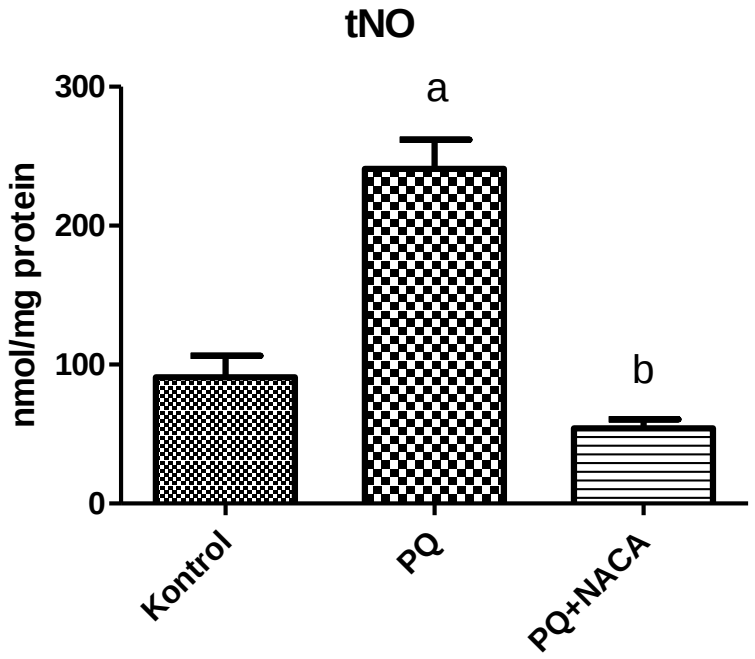
MDA düzeyi hücredeki lipid peroksidasyonun önemli bir göstergesi olup hücredeki artışına paralel olarak oksidatif stres derecesinin arttığı ve hücre bütünlüğünün bozulduğu kabul edilmektedir. Bizim sonuçlarımızda PQ grubunda kontrole göre anlamlı *(p<0.05)* bir yükseliş görülmüştür. Bununla beraber NACA uygulaması PQ oluşturduğu hasar bağlantılı MDA düzeyini anlamlı *(p<0.01)* bir şekilde düşürmüştür.



Şekil 3.1.5. PQ ile oluşturulmuş deneysel modelde NACA'nın akciğer dokusunda MDA düzeyine etkisi

(a) Kontrol vs. PQ *(p<0.01)*
(b) PQ vs. PQ+NACA *(p<0.001)*

NO vazodilatasyon, nörotransmisyon ve antimikrobiyal savunma mekanizmalarında rol alan önemli bir moleküldür. Fizyolojik olarak NO fazla miktarda oluştuğunda ise oksidan özellikleri nedeniyle doğrudan veya başka inflamatuar oksidanların sinerjistik etkisi ile doku hasarına yol açabilir. Bizim sonuçlarımızda PQ grubunda kontrole göre yaklaşık 2 kat bir yükseliş görülmüştür *(p<0.001)*. Bununla beraber NACA uygulaması PQ oluşturduğu bu etkiyi istatiksel olarakta anlamlı *(p<0.01)* bir şekilde tolare etmiştir.

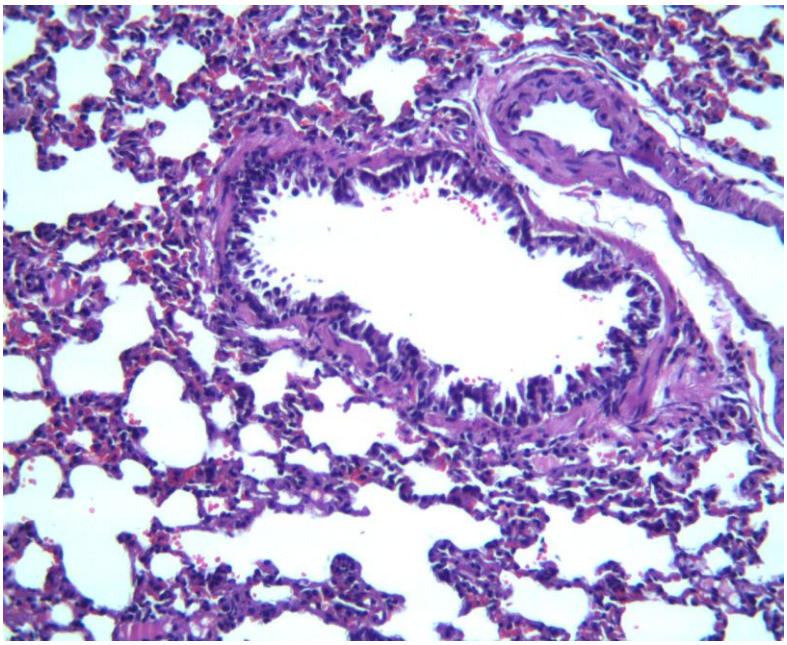


Şekil 3.1.6. PQ ile oluşturulmuş deneysel modelde NACA'nın akciğer dokusunda toplam NO (tNO) düzeyine etkisi

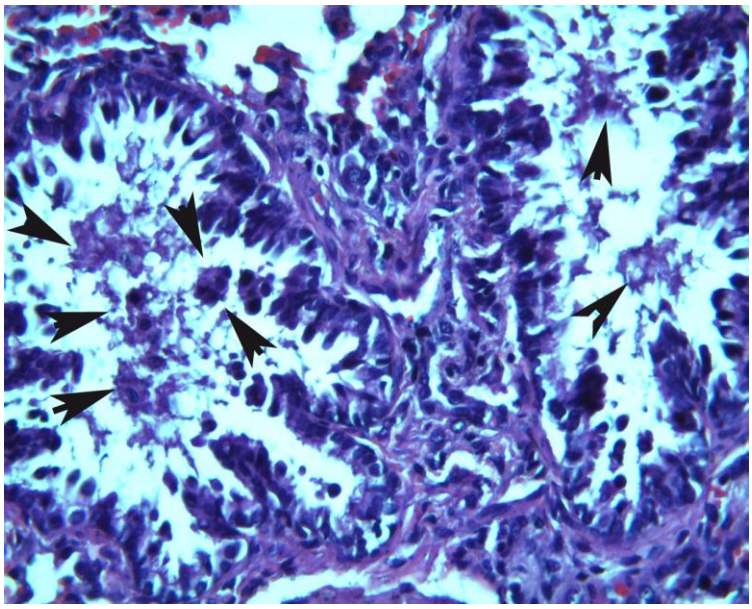
(a) Kontrol vs. PQ *(p<0.001)*
(b) PQ vs. PQ+NACA *(p<0.001)*

3.2. Histolojik Bulgular

Kontrol grubuna ait akciğer doku kesitleri incelendiğinde, bronş, bronşiol, alveol ve pulmoner interstisyum yapılarının normal olduğu görüldü (Resim 3.2.1).

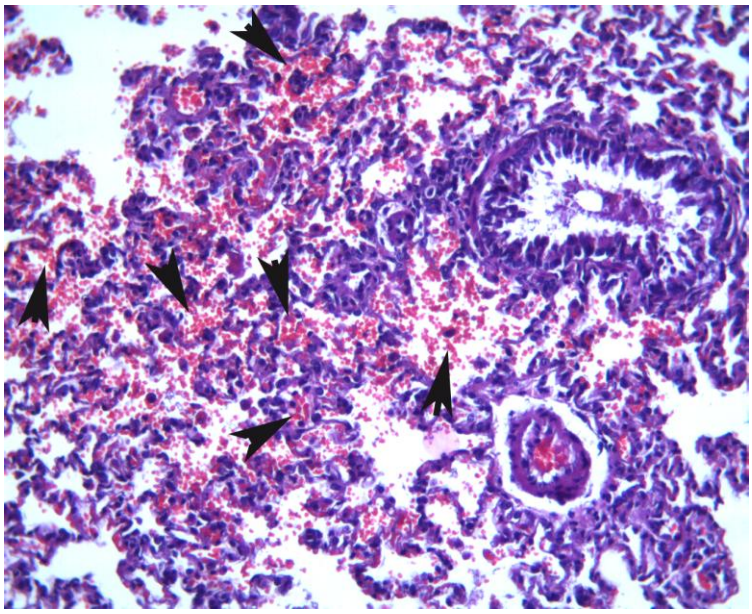


Resim 3.2.1: Kontrol grubunun histoloji analizi (Bronşiol lumeni, epiteli ve interstisyum normal yapıda görülmekte, HEX20)

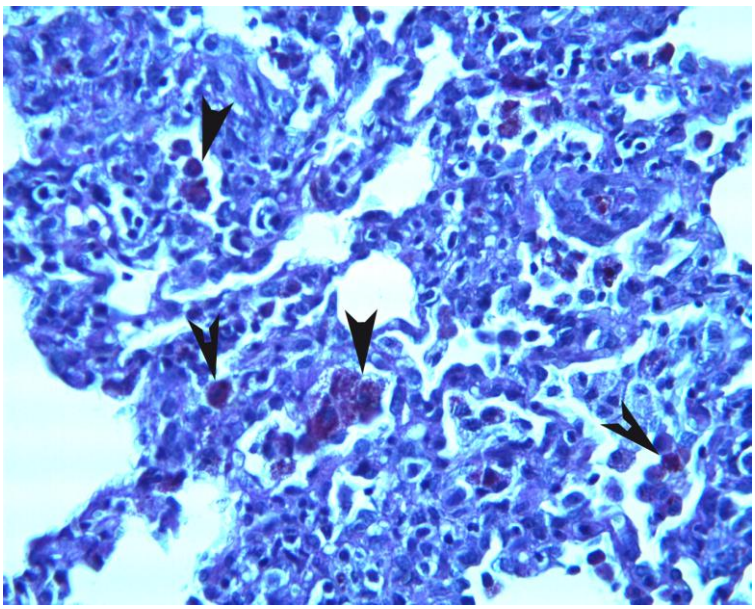


Resim 3.2.2: PQ grubunun histoloji analizi (Bronşiol lumenine dökülen epitelyum hücreleri (oklar) HEX40)

Paraquat uygulanan sıçanlarda ise bronşiollerin yalancı çok katlı prizmatik olan epitelinin bütünlüğü bozulmuş, epitel hücreleri bazal laminadan ayrılarak bronşiol lümenine dökülmüştü (Resim3.2.2). Aynı grupta pulmoner interstisyumda yaygın hemoraji tespit edildi (Resim 3.2.3).

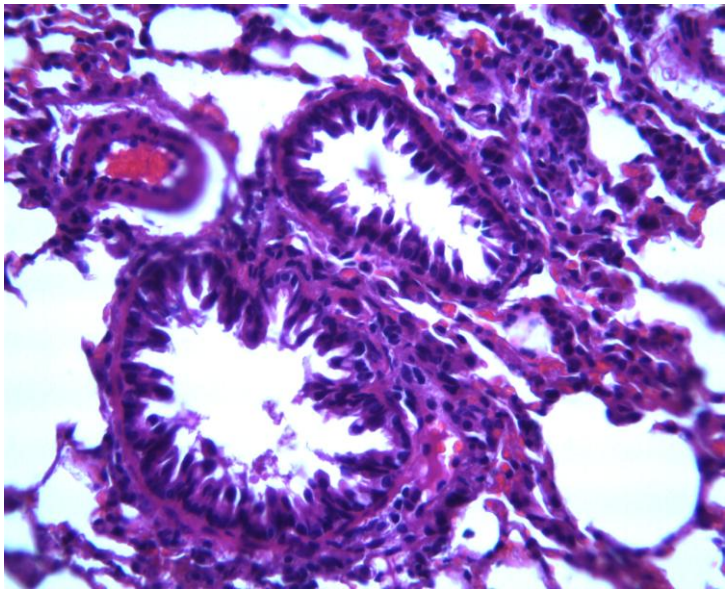


Resim 3.2.3: PQ grubunun histoloji analizi (Damar dışına çıkan çok sayıda eritrosit pulmoner interstisyumda izlenmekte (oklar). HEX20)

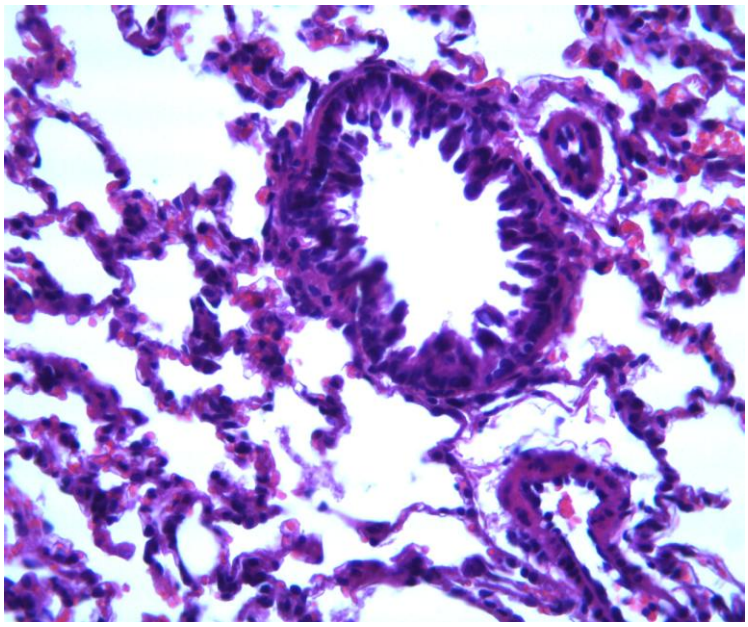


Resim 3.2.4: PQ grubunun histoloji analizi (Alveoler lümende izlenen ve PAS (+) boyanan makrofajlar (oklar). PAS X40)

Ayrıca, yine bu grupta alveol lümenlerinde çok ayıda PAS (+) makrofaj olduğu gözlendi (Resim 3.2.4). PQ+NACA grubunda, PQ grubuna göre hasar azalmıştı. Bu grupta bronşiol epiteli hafif epitel döküntüleri hariç düzenli ve hemen hemen normal histolojik görünümdeydi (Resim 3.2.5).



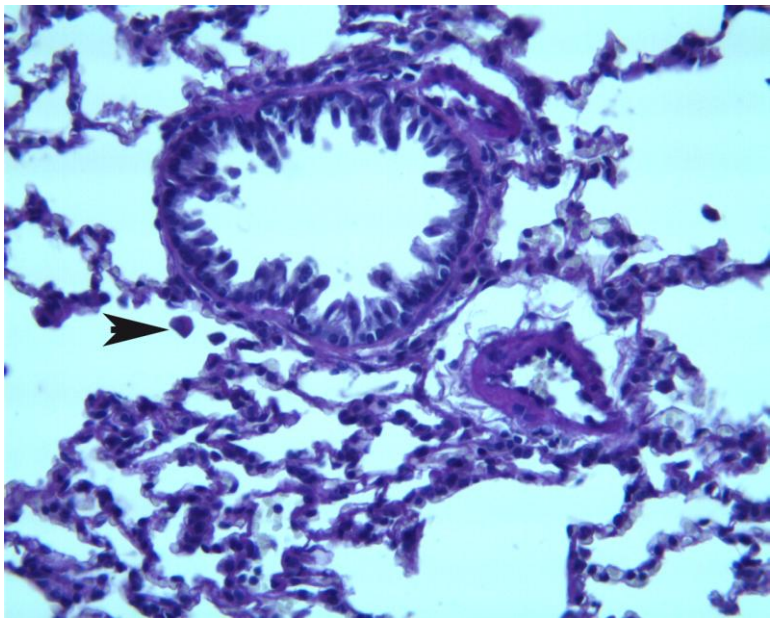
Resim 3.2.5: PQ+NACA grubunun histoloji analizi (Bronşioller lümenine dökülen birkaç epitel hücresi dışında normal olarak izlenmekte. H-EX40)



Resim 3.2.6: PQ+NACA grubunun histoloji analizi (Pulmoner interstisyumda hemoraji bulguları tespit edilmedi. H-EX40)

Pulmoner interstisyumda, damar dışında eritrositlere nadir olarak rastlandı (Resim 3.2.6).

PQ grubunda alveol lümeninde yaygın olarak izlenen makrofajlar, PQ+NACA grubunda nadir olarak tesbit edildi (Resim 3.2.7).



Resim 3.2.7: PQ+NACA grubunun histoloji analizi (Alveol lümeninde nadir olarak izlenen makrofajlar (ok). PASX40)

4. SONUÇ TARTIŞMA

Günümüz modern tarımında pestisitlerin kullanılması önemlidir. Ancak pestisit kullanılırken, hem ürünün hastalık, zararlı ve yabancı otlara karşı korunması hem de insan ve çevreye olumsuz etkileri birlikte değerlendirilmelidir. Paraquat, dünyada ve Türkiye'de tarım alanlarında yaygın olarak kullanılan bir herbisitdir. Paraquat ile yapılan zirai mücadele sırasında gerek tarım alanı çevresinde yaşayanlar insanlar gerekse paraquat kalıntısı içeren meyve ve sebzeleri tüketenler paraquat toksisitesine maruz kalabilirler. Paraquat yüksek elektron afinitesi nedeniyle sistemik etki gösterir ve oksijen konsantrasyonunun yüksek olduğu dokularda daha büyük hasar oluştur. Bu nedenle paraquat'tan en çok etkilenen organ akciğerlerdir [4].

Oksidatif stresin nörodejeneratif hastalıklardan kansere kadar birçok hastalığın gelişmesinde önemli role sahip olduğu düşünülmektedir. Paraquatın hücrede serbest oksijen radikallerine dönüşüp hücre hasarına neden olduğunu gösteren birçok çalışma vardır. Bu çalışmaların birinde paraquat indüksiyonu sonucu oluşan oksidatif stresin apoptotik hücre ölümüne neden olduğu ve bu hasarın önlenmesi için askorbik asit ve NAC'ın koruyucu antioksidan olarak kullanılabileceği gösterilmiştir [93]. *İn vitro* deneylerle PQ'ın hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerin oluşumuna neden olduğu ve bunun sonucunda ise lipid peroksidasyonunun arttığı tespit edilmiştir [16]. Birçok çalışmada serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerini ortadan kaldırmada sentetik ya da doğal antioksidanların özellikleri incelenmektedir. Tiol içeren bileşikler antioksidanların önemli bir sınıfıdır ve özellikle hücre savunmasında büyük role sahip olan glutatyonun hücre içi düzeyini arttırdığından dikkat çekmektedirler.

N-Asetilsistein (NAC), 50 yıldan daha fazla süredir klinik olarak kullanılmakta olup tiol antioksidanlar içerisinde en iyi bilinenidir. NAC, enfeksiyonlar, genetik bozukluklar ve metabolik bozuklukları içeren birçok hastalıkta glutatyon eksiklikliğini gidermekte kullanılmaktadır . *İn vitro* ve *in vivo* çalışmalarda elde edilen deliller NAC'ın hücre dışı sistini sisteine indirgeyerek ya da glutatyon-S-transferaz aktivitesini indükleyerek hücre içi glutatyon biyosentezini arttırdığı ortaya koymuştur.

İlave olarak NAC, ROT'lar ile nükleofilik reaksiyonları sonucu potansiyel bir serbest radikal süpürücüdür. Ayrıca NAC'ın HIV virüsünün etkisini, hücrelerdeki glutatyon düzeyini arttırarak bloke ettiği ortaya konmuştur [97].

N-Asetilsistein Amid (NACA), N-Asetilsistein'in (NAC) karboksil grubunun nötralize edilerek, hücre membranından geçişi kolaylaştırmayı mümkün kılmak için dizayn ve sentez edilmiş yeni bir antioksidan moleküldür. NACA'nın *in vitro* antioksidan özelliklerini gösteren en temel çalışmada serbest radikal süpürücü özelliği. metal şelatlayıcı özelliği ve lipid peroksidasyonunu önleyici özelliği ile güçlü bir antioksidan bileşik olduğu ortaya konmuştur [7]. NACA, NAC'dan türetilmiş yeni bir antioksidan olduğu için bu iki bileşiğin çeşitli metodlarla karşılaştırıldığı çalışmalarda vardır NACA'nın kırmızı kan hücrelerinde NAC'dan daha etkin bir şekilde hücre içine geçtiği ve hücre içi glutatyon düzeyini arttırdığı tespit edilmiştir [102]. NACA hidrolize edilerek endojen glutatyon üretiminin temelinde yer alan sisteine dönüştürülür.

Bu kapsamda tezin amacı paraquat maruziyetinin neden olabileceği akciğer hasarına karşı NACA'nın olası koruyucu etkilerinin biyokimyasal ve histolojik parametreler ile araştırılmasıdır. Çalışmada biyokimyasal olarak akciğer hücrelerinde birincil antioksidan sisteme ait enzimler CAT, SOD, GSH-Px, hücrede antioksidan sistemin önemli bir molekülü olan GSH düzeyi ve hücredeki lipid peroksidasyonunun önemli bir parametresi MDA düzeyi ve toplam nitrik oksit (tNO) düzeyi belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarımıza göre CAT enzim aktivitesinin PQ grubunda kontrole göre anlamlı $(p<0.01)$ azalış sergilerken NACA grubunda PQ grubuna göre artış anlamlı değildir. SOD enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre PQ grubunda bir düşüş görülse de bu düşüş anlamlı değildir. Buna karşın NACA uygulaması ile SOD enzim aktivitesinde PQ grubuna göre anlamlı bir yükseliş görülmüştür $(p<0.05)$. Akciğer dokusunda ki GSH-Px aktivitesi PQ uygulaması ile kontrole göre anlamlı bir düşüş buna karşın NACA uygulanmış grupta PQ grubuyla karşılaştırdığımızda anlamlı $(p<0.01)$ bir yükseliş görülmüştür. Bu sonuç GSH-Px aktivitesinin bağlantılı olduğu bileşik GSH düzeyindeki değişim ile paraleldir.

Redükte ve okside glutatyon düzeyi oksidatif stres ve onunla ilgili hastalıkların teşhisinde biyokimyasal ölçek olarak yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Glutatyon düzeyindeki azalma hem direk antioksidan özelliği hem de GSH-Px enziminin reaksiyonunda kullanılması nedeniyle hücrenin

savunma mekanizmasında bir hasarın habercisi olarak değerlendirilmektedir. Bizim bu çalışmamızda da PQ uygulaması kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı bir düşüş göstermiştir. Buna karşın NACA uygulaması hem kontrol hem de PQ grubuna göre anlamlı artış göstermiştir.

MDA düzeyi hücredeki lipid peroksidasyonun önemli bir göstergesi olup hücredeki artışına paralel olarak oksidatif stres derecesinin arttığı ve hücre bütünlüğünün bozulduğu kabul edilmektedir. Bizim sonuçlarımızda PQ grubunda kontrole göre anlamlı *(p<0.05)* bir yükseliş görülmüştür. Bununla beraber NACA uygulaması PQ ın oluşturduğu hasar bağlantılı MDA düzeyini anlamlı *(p<0.01)* bir şekilde düşürmüştür.

Nitrik oksit (NO), memeli dokularında L-arginin'den nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığı ile endogen olarak sürekli sentezlenen, 6-30 saniye gibi çok kısa yarı ömüre sahip, yüksüz yapısı ile biyolojik membranlardan kolayca difüze olup hücre içi hedeflerine ulaşarak farklı olaylarda aracı rolü oynayan, çözünürlüğü az bir gazdır[114,115]. NO, içerdiği ortaklanmamış elektronu ile oksijen, superoksit radikalleri, demir-bakır-kobalt-manganez gibi geçiş elementleri ile kompleks yapabilir. Bu özellikleri NO'in hücre/doku düzeyinde çok sayıda olayda rol oynamasına ve çeşitli bileşikler oluşturmasına olanak sağlar[116].

Akciğerlerde NO, havayolu epiteli, makrofajlar veintra pulmoner vasküler endotelyumdan sentezlenmektedir[117]. NO, düz kas hücresine etki ederek vasküler gerilimi azaltıp, pulmoner akımı artırarak ventilasyon perfüzyon oranının uygun düzeyde tutulmasına katkıda bulunur[118]. NO, dolaşımdaki kısa yarı ömrü ve gaz yapısı nedeni ile stabil nitrik oksit metabolitleri (NOx) olan nitrit ve nitrata okside olmakta ve bu bileşikler böbrekler aracılı ile dışarı atılmaktadır[119]. Nitrit ve nitrat anyonların konsantrasyon ölçümü NO üretiminin kantitatif göstergesi olarak kullanılabilir. Bizim sonuçlarımızda PQ grubunda kontrole göre yaklaşık 2 kat bir yükseliş görülmüştür *(p<0.001).* Bununla beraber NACA uygulaması PQ ın oluşturduğu bu etkiyi istatiksel olarakta anlamlı *(p<0.01)* bir şekilde tolere etmiştir.

Ayrıca çalışmamızda biyokimyasal sonuçlara ilaveten histolojik açıdan dokular incelendi. Akciğer dokusundan alınan 5 mm'lik kesitlere hematoksilen eozin (H-E) ve periyodik asit schiff (PAS) boyama yöntemler uygulandı. Kesitler Leica DFC-280 ışık mikroskobu ile incelendi. Sonuçlarımızda kontrol grubuna

ait akciğer doku kesitlerinde, bronş, bronşiol, alveol ve pulmoner interstisyum yapılarının normal olduğu görüldü (Resim 3.2.1).

Paraquat uygulanan sıçanlarda ise bronşiollerin yalancı çok katlı prizmatik olan epitelinin bütünlüğü bozulmuş, epitel hücreleri bazal laminadan ayrılarak bronşiol lümenine dökülme tespit edildi. (Resim 3.2.2). Yine aynı grupta pulmoner interstisyumda yaygın hemoraji tespit edildi (Resim 3.2.3). PQ+NACA grubunda, PQ grubuna göre hasarın azaldığı tespit edildi. Bu grupta bronşiol epiteli hafif, epitel döküntüleri hariç düzenli ve hemen hemen normal histolojik görünümdeydi (Resim 3.2.5). Ayrıca, bu grupta alveol lümenlerinde çok ayıda PAS (+) makrofaj olduğu gözlendi (Resim 3.2.4). Yine bu gurupta pulmoner interstisyumda, damar dışında eritrositlere nadir olarak rastlandı (Resim 3.2.6). PQ grubunda alveol lümeninde yaygın olarak izlenen makrofajlar, PQ+NACA grubunda nadir olarak tesbit edildi (Resim 3.2.7). Histolojik verilerden elde edilen genel sonuç NACA'nın PQ'nun oluşturduğu oksidatif stres ve hücre hasarını belli ölçüde azalttığı şeklindedir. Bu sonuçlar biyokimyasal verilerle önemli oranda paralellik sergilemektedir.

Sonuç olarak NACA, PQ akciğer dokusunda oluşturduğu oksidatif stres süreci sonrası hücrelerde meydana gelebilecek hasarı önemli ölçüde azaltmıştır. NACA'nın bu iyileştirici etkisinde PQ ile bozulan GSH metabolizmasındaki düzenleyici rolünün önemli olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca bu çalışma, yeni dizayn edilerek sentezlenmiş güçlü antioksidan özelliğe sahip NACA'nın etki mekanizmasının tam olarak ortaya konacağı ileri çalışmalara öncülük etmesi, akciğerde meydana gelebilecek imflamasyonların önlenmesinde glutatyon metabolizmasını düzenlemedeki rolü ve ilaç olarak kullanılabilirliği açısından önem arz etmektedir.

5. KAYNAKLAR

[1] Tepe I. *Türkiye'de Tarım ve Tarım Dısı Alanlarda Sorun Olan Yabancıotlar ve Mücadeleleri.* Yüzüncü Yıl Matbaası, Van(1997); 237.

[2] Sanlı Y. *Veteriner Klinik Farmokoloji ve ilaçla Sağaltım ilkeleri*. Medisan Yayınevi, Ankara (2002); 812.

[3] G.M. Copland, A Kolin, H.S. Shulman, *Fatal pulmonary intraaveolar fibrozis after paraquat ingestion*. **The New Eng J Med** (1974);8: 290.

[4] E. Addo, T. Poon-King, *Leucocyte supression in treatment of 72 patiens with paraquat poisoning*. **The Lancet** (1986);May 17: 1117.

[5] H.K. Fisher, J.A. Clements, R.R. Wright, *Enhancement of oxygen toxicity by the herbisite paraquat* . **Am Rev Dis** (1973),107: 246.

[6] C.I. Schoenberger, S.I. Rennard, P.B. Bitterman, Y. Fukuda, V.J. Ferrans, R.G. Crystal, *Paraquat-inuduced pulmonary fibrozis*. **Am Rev Respir Dis** (1984),129:168.

[7] B. Ates, L. Abraham and N. Ercal, *Antioxidant and free radical scavenging properties of n-acetylcysteine amide (NACA) and comparison with n-acetylcysteine (NAC)*. **Free Rad Res**, (2008),42(4): 289-296.

[8] Turabi M.S. *Bitki Koruma Ürünlerinin Ruhsatlandırılması. Tarım İlaçları Kongre ve Sergisi, TMMOB Zir. Müh Odası ve TMMOB Kimya Müh Odası,* Bildiriler Kitabı, s:50-61, 25-26 Ekim (2007).

[9] Öncüer C. "Tarımsal Zararlılarla Savaş Yöntemleri ve İlaçları" İzmir, (1995).

[10] Toros, S. et. al., Tarımsal Savaş Yöntemi ve İlaçları, Ankara, (1999).

[11] www.panap.net

[12] A. Seaton, D. Seaton, A. G. Leitch. *Crofton and Douglas's Respıratory Dısease*s. **Blackwell Scientific Publications** (1989);860-1.

[13] R.F. Burk, R.A. Lawrence, J.M. Lane. *Liver necrosis and lipid peroxidation in the rat as result of paraquat and diquat administration. Effect of selenium deficiency*. **J Clin Invest**, (1980);65:1024–1031.

[14] L. Clejan, A.I. Cederbaum. *Synergistic interaction between NADPH-cytochrome P-450 reductase, paraquat and iron in the generation of active oxygen radicals*. **Biochem Pharmacol**, (1989);38:1779-1786.

[15] S.M. Aziz, D.W. Lipke, J.W. Olson, M.N. Gillespie. *Role of ATP and sodium in polyamine transport in bovine pulmonary artery smooth cells*. **Biochem Pharmacol**, (1994);48:1611–1618.

[16] T. Fukushima, K. Yamada, A. Isobe et al. *Mechanism of cytotoxicity of paraquat. I. NADH oxidation and paraquat radical formation via complex I*. **Exp Toxicol Pathol**, (1993);45:345–349.

[17] S. Hong, D. Yang, K. Hwang. *Associations between laboratory parameters and outcome of paraquat poisoning.* **Toxicol Lett** (2000);20;53-9.

[18] R.J. Dinis-Oliveira, F. Remiao, H. Carmo et al. *Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease*. **NeuroToxicol**, (2006);27:1110-1122.

[19] Toksikolojide serbest radikallerin önemi. YYU VetFak Derg. 2004;15 (1-2):91-96.

[20] D.M. Skillrud, W.J. Martin, *Parquat – induced of type II alveoller cells,an invitro model of oxidant injury*. **Am Rev Respir Dis** (1984);129: 995.

[21] J Lunced, D Blanke. *Oxygen free radicals: Their relevance to disease processes In: Cohen RD, Lewis B, Alberti KGMM. The Metabolic and Molekuler Basis of Acquired Disease*. **Balliere Tindall**, London. (1990), 189-212.

[22] B.J. Zimmerman, D.N Granger, *Mechanisms of reperfusion injury*. **Am. J. Med. Sc**,. (1994); 307:284–292.

[23] E Oruç Özcan, *2,4-Diamin ve Azinfosmetilin Tilapia Nilotica'da Karaciğerde Antioksidan Enzim Aktivitelerine ve Lipid Peroksidasyonuna Etkileri*. **Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi**, Adana, (1998).

[24] J.Nordberg, E.S.J. Arner. *Reactive Oxygen Species, Antioxidants and The MammalianThioredoxin System*. **Free Radical Biology and Medicine**, (2001); 31(11): 1287-1317.

[25] J.M.C. Gutteridge. *Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage*. **Clin Chemistry** (1995);41:1819-1828.

[26] I.S. Young, *Woodside J.V. Antioxidants in health and disease*, **J Clin Pathol**, (2001); 54:176-186.

[27] L. Loeckie. Z De, H.N John. Meerman, N.M Jan. *Commandeur, Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans*, **Elsevier**, (1999);26:202-226.

[28] Akkuş İ. Serbest Oksijen Radikalleri ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Basım Yayın ve Dağıtım, Konya (1995);1-15

[29] İ. Meram, Ş. Aktaran. *Serbest Radikallerin Biomoleküller Üzerine Etkileri*. Arşiv. (2002);11:299.

[30] E. R. Stadtman. *Oxidation of free aminoacids and aminoacids residues in protein by radiolysis and metal catalyzed reactions*. **Annu Rev Biochem** (1993); 62:797-821.

[31] E. R. Stadtman. *Protein oxidation and aging*. **Science** (1992); 257:1220-4.

[32] P.M. Abuja, R. Albertini. *Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins.* **Clinica Chimica Acta**. (2001); 306:1-17.

[33] İ Akkuş. *Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri*. Konya: Mimoza yayınları, (1995).

[34] B. Ozbay, K. Uzun, H. Arslan, I Zehir. *Functional and radiological impairment in women highly exposed to indoor biomass fuels*. **Respirology (**2001); 6:255-8.

[35] E. Kurutaş Belge, F. İnanç Güler, M. Kılınç. *Serbest Radikaller*. Arşiv, (2004); 13:120-13.

[36] Y. Niwa, T. Kanoh, T. Sakane et al. *The ratio of lipidperoxides to superoxide dismutase by tumor necrozis faktör:Possible protective mechanism*. *Science*. (1988), 242: 941-943.

[37] B. Halliwell, J.M. Gutteridge. *Free radicals in biology and medicine*. **2th Ed. Oxford: Clarendon Pres**, (1989).125.

[38] R Del Maestro. *Trace elements, micronutrients and free radicals*. Dreosti IE(ed). **Humano Press Inc.** Cliton. (1991);25-51.

[39] A. Özkan, K. Fışkın. *Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez ve Antioksidant Enzimler*. **Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi**. (2004); 14:52-60.

[40] E. Sodergen. *Lipid Peroxidation İnvivo Evolution and Application of Methods for Measurements*, Sweeden, **Tryck&Medier**, (2000).

[41] Y. Dotan, D. Lichtenberg, I. Pinchuk. *Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress*. **Prog. Lipid Res** (2004); 43:200-27.

[42] M. Percival. *Antioxidants*. **Clinical Nutrıtıon Insıghts**. (19989; 98(10): 1 - 4.39.

[43] M. Yıldırım, *Topografik Anatomi Birinci baskı*. Nobel Tıp Kitapevi**,** İstanbul (2000) S:299-310

[44] G.Y. Sherki, E. Melademed, D. Offen, *Oxidative stress induced neurodegredative diseases: the needs for the antioxidants the penetrate the blood brain barrier.*

Neuropharmacology, (2001),40: 959-975.

[45] A. Mübeccel, İ. Akkurt, H. Eğilmez, M. Atalar, İ. Salk, *Biomass exposure and the high resolution computed tomographic and spirometric findings.* **Eur J Radiol (**2004); 52:192-9.

[46] T. A. Hazinski and R. B. Cotton, *Oxygen toxicity and oxidant stress in the developing lung.* **Semin Neonato**(1998); 3: 103-111.

[47] S. De Flora, C. Dennicelli, A. Camoirono et al, *In vivo effects of N-acetylcysteine on glutathione metabolism and on the biotransformation of carcinogenic and / or mutagenic compounds***. Carcinogenesis** (1985) ; 6: 1735-1745.

[48] O.I. Aruoma, B. Halliwell, B.M. Hoey et al, *The antioxidant action of N-acetylcysteine: Its reaction qwith hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide and hypochlorous acid.* **Free Radic Biol Med** (1989); 6: 593-597.

[49] I. Rahman, D. Morrison, K. Donaldson, W. MacNee, *Systemic oxidative stress in asthma, COPD and smokers***. Am J Respir Crit Care Med** (1996);159:1055-60.

[50] L.J. Smith, M. Shamsuddin, P.H. Sporn, M. Denenberg, J. Anderson. *Reduced superoxide dismutase in lung cells of patients with asthma*. **Free Radic Biol Med** (1997); 22:1301-7.

[51] J. Monteseirin, I. Bonilla, J. Camacho, J. Conde, F. Sobrino. *Elevated secretion of myeloperoxidase by neutrophils from asthmatic patients: the effect of immunoptherapy*. **J Allergy Clin Immunol** (2001);1007:623-6.

[52] R.E. Aldridge, T. Chan, C.J. van Dalen, S. Renthilmohan, M. Winn, P. Venge, et al. *Eosinophil peroxidase produces hypobromous acid in the airways of stable asthmatics*. **Free Radic Biol Med** (2002);33:847-56.

[53] İ.Y Barış. *Primitif Biyomasın Neden Olduğu Sağlık Sorunları*. Ankara. Toraks Yayınları (2006).

[54] G. Çelik, F. Erdem, D. Alper. *Kronik obstrüktif akciğer hastalığı. In: Numanoğlu N, ed. Klinik solunum sistemi ve hastalıkları.* Ankara: **Antıp A.Ş.,** (1997);379-400.

[55] İ. Saraçoğlu. Kronik bronşit. In: N. Özyardımcı, ed. *Nonspesifik Akciğer hastalıkları*. Bursa: Uludağ Üniversitesi Basımevi,(1999);360-73.

[56] M. Ünlü. *Reaktif oksijen metabolitleri ve akciğer hastalıkları*. **Solunum hastalıkları. (**1999); 10:207-11

[57] H. Gökbel, K. Uzun, *Hava Kirliliğinin Solunum Fonksiyonlarýna Etkileri*. Ekoloji Çevre Dergisi. (1995); 15, 4-5.

[58] Q.C. He, P.J. Lioy, W.E. Wilson, R.S. Chapman, *Effects of Air Pollution on Children's Pulmonary Function in Urban and Suburban Areas of Wuhan*. **People's Republic of Chine Arch Environ Helt.,** (1993) 48, 6, 382-391.

[59] C-M. Andersson, T. Högberg, *Advances in the Development of Pharmaceutical Antioxidants*. **Adv. Drug Res**. (1996);28: 65-180.

[60] B. Hallivell, J.M.C. Gutteridge, *The Antioxidants of Human Extracellular Fluids.* **Arch. Biochem. Biophys**. (1990); 280: 1-8.

[61] K.H. Cheeseman, T.F. Slater. *An introduction to free radical biochemistry***. Br. Med. Bull.**(1993);49(3):479-480.

[62] T. Isbir. *Antioksidan sistemler*. Endotel. İzmir Tabip Odası Tıpta Temel Bilimler Kolu Sonbahar Okulu: (1994);92-98.

[63] V.L Kinnula, P. Paakko, Y. Soini. *Antioxidant enzymes and redox regulating thiol proteins in malignancies of human lung*. **FEEBS**, (2004);1-6.

[64] Y. Kobayashi, Y. İshigame, et al. *Superoxide dismutase activitiy of human granulocytes and lymphocytes*. **The Lancet**.(1977); 16: 865.

[65] Y. Niwa, K. İshimato, T. Kanoh, *İnduction of superoxide dismutase in leukocytes by paraquat: Correlation with age and possible predictor of longevity*. **Blood.** (1990); 76:835-841.

[66] A. Seven, G. Candan, *Antioxidant defense systems*. Cerrahpaşa J Med (1996);27:41-50.

[67] H. Aebi. Catalase In: U. Bergmeyer, ed. *Methods of enzymatic analysis*. New York and London: Academic Pres. (1974);673-677.

[68] A. Deisseroth, A.L. Dounce. *The purification and crystallization of beef erythrocyte catalase*. **Arch Biochem Biophys**. (1969);131:18-29.

[69] P. Corbisier, A. Houbion, D. Lambert, *Glutathione peroksidase, superoxide dismutase and catalase inactivation by peroxidase and oxygen derived free radikals.* **Mechanism of Agening and Development**. (1990); 51, 283-297.

[70] M.F.C.M Knapen, P.L.M Zusterzeel, W.H.M Peters, E.A.P Steegers. *Glutathione and Glutathione-Related Enzymes in Reproduction*. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. (**1999);82: 171-184.

[71] N.H.P Cnubben, I.M.C.M Rietjens, H Wortelboer, J Zanden, P.J Bladeren, *The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense*. **Envorimental Toxicology and Pharmacology**. (2001); 10:141-152.

[72] J.E .Spallholz. Selenium and glutathione peroxidase: *Essential nutritient and antioxidant component of the immun system* . **Adv. Exp. Med. Biol**. (1990);262: 145-158.

[73] J. Forslid, B. Björksten, K. Hagersten, J. Hed. *Erythrocytemediated scavenging of reactive oxygen metabolites generated by human polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis*. **Inflammation.** (1989);13:543-551.

[74] M.P Patel, J.Marcınkeviciene, J.S Blanchard, *Enterococcus faecalis glutathione reductase: purification, characterization and expression under normal and hyperbaric O2 conditions,* **FEMS Microbiology Letters**, (1998);166: 155-163.

[75] B. Halliwell, J.M. Gutteridge,. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford Universty Press, London, s. (1999);36-245.

[76] G. Atmaca. *Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids*. **Yonsei Med J** (2004); 45(5):776-88.

[77] S. Parcell. *Sulfur in human nutrition and applications in medicine*. **Altern Med Rev** (2002); 7(1):22-44

[78] J.D. Finkelstein, J.J. Martin, B.J. Harris. Methionine metabolism in mammals. *The methionine-sparing effect of cystine.* **J Biol Chem** (1998); 263(24):11750-4.

[79] P. Verhoef, M.J. Stampfe, J.E. Buring, et al. *Homocysteine metabolism and risk of myocardial infarction: relation with vitamins B6, B12, and folate.* **Am J Epidemiol** (1996); 143(9):845-59.

[80] S.K Srivastava and E. Beutler; 1969. *The Journal of Biolojical Chemistry* pp. 9-16,1969

[81] G.J. Flora, P.K. Seth. *Beneficial effects of S-adenosyl-L-methionine on aminolevulinic acid dehydratase, glutathione, and lipid peroxidation during acute lead-ethanol administration in mice*. **Alcohol** (1999); 18(2-3):103-8.

[82] J.D. Finkelstein, J.J. Martin. *Homocysteine.* **Int J Biochem Cell Biol** (2000); 32(4):385 9.

[83] L. Packer, E.H. Witt, H.J. Tritschler. *Alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant*. **Free Radic Biol Med** (1995); 19(2):227-50.

[84] R. Sivaprasad, M. Nagaraj, P. Varalakshmi. *Combined efficacies of lipoic acid and 2,3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver.* **J Nutr Biochem** (20049; 15(1):18-23.

[85] K. Kalia, S.J. Flora. *Strategies for safe and effective therapeutic measures for*

chronic arsenic and lead poisoning. **J Occup Health** (2005); 47(1):1-21.

[86] H. Gurer, H. Ozgunes, E. Saygin, N. Ercal. *Antioxidant effect of taurine against lead-induced oxidative stress*. **Arch Environ Contam Toxicol**. (2001); 41(4):397-402.

[87] B.O. Ahn, H.G. Kim, H.S. Lee, C.D. Kim, Y.S. Kim, *Effect of Taurin on Cerulein-İnduced Acute Pancreaitis in the Rat*. **Pharmacolojy**. (2001);61 (1): 1-7.

[88] B.P. Vohra, X. Hui, *Taurin Protect Against Carbon Tetrachloride Toxicity in The Cultured Neurons And invivo*. **Arch. Physiol. Biochem**. (2001);109:90-94.

[89] *Acetylcysteine.* Editorial the Lancet (1991); 337(8749):1069-70.

[90] J Sylvester, et al *Molecular mechanism of NAC action*. **Cell Mol. Life science** (2003);60:6-20.

[91] O.I. Aruoma, B. Halliwell, B.M. Hoey, J. Butler. *The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid*. **Free Rad Biol Med,** (1989);6:593-597.

[92] B.D.Whitaker, J.W Knight; *Effects of N-acetyl-cysteine and N-acetyl-cysteine-amide Supplementation on In Vitro Matured Porcine Oocytes:* **Reprod Dom Anim** (2010);45, 755–759.

[93] X. Li and A.Y. Sun. *Paraquat induced activation of transcription factor AP -1 and apoptozis in PC12 cells***. J. Neural. Transm.(**19999;106:1-21.

[94] *Görkem Kısmalı* Doktora Tezi 2009- ANKARA

[95] L.Alison, McCormack, M. Thiruchelvam, B. Amy, Manning-Bog, C. Thiffault, J. William Langston, A Deborah. Cory-Slechta, and A Donato. *Di Monte Environmental Risk Factors and Parkinson's Disease: Selective Degeneration of Nigral Dopaminergic Neurons Caused by the Herbicide Paraquat* :**Neurobiology of Disease** (2002);10, 119–127.

[96] H. Iguchi, K.I. Kato, Y. Ibayashi. *Melatonin serum levels and metabolic clearance in rate patientswith liver cirrhosis*. **J Clin Endocrinol Metab** (1982); 5:1025-1027.

[97] S. Mihm and W. Droge: *İntracellular glutathione level controls DNA-binding activity of NF kappa B-like proteins.* **İnt Conf AIDS** (1990);6(3):159

[98] K. Nakata, M. Kawase, S. Ogino, et al. *Effects of age on levels of cysteine, glutathione and related enzyme activities in livers of mice and rats and an attempt to replenish hepatic glutathione levels of mouse with cysteine derivatives.* **Mech**

Age Dev, (1996);90: 195-207.

[99] M. Tariq, C. Morais, S. Sobki, M.A. Sulaiman, A.A. Khader: *N-acetylcysteine attenuates cyclosporin induced nephrotoxicity in rats*. **Nephrol Dial Transplant.** (1999);14:923-929.

[100] M.L. Rubio, M.C. Martin-Mosquero, M. Ortega. *Oral N-acetylcysteine elastaseinduced pulmonary emphysema in rats*. **Chest** (2004); 125:1500-6.

[101] W. Wei, G .Glenn, A. Craig, H. Richard. Matthews and E. Nuran. *Separation and quantification of N-acetyl-L-cysteine and Nacetyl-cysteine-amide by HPLC with fluorescence detection.* **Biomed. Chromatogr**. (2006);20: 415–422.

[102] W. Wei, A. Linu, O. Joshua, M. Richard, G. Glenn, E. Nuran. *Effects of N-acetylcysteine amide (NACA), a thiol antioxidant on radiation-induced cytotoxicity in Chinese hamster ovary cells:* **Life Sciences**(2008); 82, 1122–1130.

[103] O. P Tulin, U Fikriye, A William. Banks, E Nuran, *A novel antioxidant N-acetylcysteine amide prevents gp120- and Tat-induced oxidative stress in brain endothelial cells*: **Experimental Neurology** (2006) ;201, 193–202.

[104] A. Johnny, A. Daphne, F. Eitan; *N-acetylcysteine amide (AD4) attenuates oxidative stress in beta-thalassemia blood cells.:* **Biochimica et Biophysica Acta**(2008); 1780 ,249–255.

[105] P. Suman, M. Suneetha, G. Glenn, A. B. William, E. Nuran; *Effects of N-acetylcysteine amide (NACA), a novel thiol antioxidant against glutamate-induced cytotoxicity in neuronal cell line PC12*: **Brain Research** (2005); 1056, 132 – 138.

[106] P. Suman, E. Nuran; *Comparative evaluation of N-acetylcysteine (NAC) and N-acetylcysteine amide (NACA) on glutamate and lead-induced toxicity in CD-1 mice:* **Toxicology Letters**(2011); 201, 1–7.

[107] W. C. Joshua, Y. P. Eylem, P. Suman, K. Humeyra, E. Nuran; *In vivo inhibition of l-buthionine-(S,R)-sulfoximine-induced cataracts by a novel antioxidant, N-acetylcysteine amide*: **Free Radical Biology & Medicine** (2011); 50 ,722–729.

[108] H Luck., *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, Academic Press., New York, USA. (1963), pp 885-888.

[109] J.M. McCord, I. Fridovich, Superoxide dismutase: *An enzymic function for Erythrocuprein (Hemocuprein),* **The J of Biological Chemistry**, Vol,244, No. 22:(1969) ;6049-6055.

[110] P. Theodorus, M. Akerboom, H. Sies. *Assay of glutathione, glutathione disulfide*

and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods Enzymol** (1981); 77: 373- 383.

[111] *Cayman Inc*. Ann Arbor, MI, USA.

[112] A.J. Buege, S.D. Aust, *Microsomal lipid peroxidation***. Methods Enzymol** (1978); 52, 302-310.

[113] Bradford M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding*, **Anal. Biochem**. (1976); 72 pp. 248–254.

[114] İ. Çalıkoğlu, L. Tamer. *Nitrik oksitin biyokimyası ve aterogenezdeki rolü*. Klinik Laboratuar Araştırma Dergisi.2003; Cilt 7, Sayı:3:89-96.

[115] R.M.J. Palmer, A.G. Ferringe, S. Moncada. *Nitric oxide release accounts fort he biological activity of endothelium derived relaxing factor*. **Nature (**1987); 327:524-6.

[116] J. Marin, A.M. Rodriquez-Martinez. *Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions.***Pharmacol Ther**. 1997; Vol:75, no.2: 111-34.

[117] B. Gaston, J.M. Drazen, J. Loscalzo, J.S. Stamler. *The biology of nitrogen oxides in the airways*. **Am J Respir Crit Care Med** (1994); 149: 538-51.

[118] C.G. Frostell, M.D. Fratacci, J.C. Wain, R. Jones, W.M. Zapol. *A selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction.* **Circulation** (1991); 83:2038-47.

[119] L.C. Green, D.A. Wagner, J. Glogowskı, P.L. Skipper, J.S. Wishnok, A.R. Tannenbaum. *Analysis of nitrate andnitrite and (15N) nitrate in biological fluids*. **Analytical Biochemistry** (1982); 126: 131-8.

ÖZGEÇMİŞ

20.07.1984 yılında Malatya'da doğdu. İlk ve orta eğitimini Malatya'da tamamladı. 2003 yılında Malatya Meslek Yüksek Okulu Tekstil bölümünden mezun oldu. 2007 yılında İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünden mezun oldu. 2009 yılında İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek lisansa başladı.