T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

AKUT EGZERSİZDE OKSİDAN VE ANTİOKSİDAN PARAMETRELERİN ARAŞTIRILMASI VE MELATONİN UYGULAMASININ ETKİLERİ

Hazırlayan
Mustafa ERGÜL

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Behzat ÇİMEN

Yüksek Lisans Tezi

Haziran 2012
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

AKUT EGZERSİZDE OKSİDAN VE ANTİOKSİDAN PARAMETRELERİN ARAŞTIRILMASI VE MELATONİN UYGULAMASININ ETKİLERİ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Hazırlayan
Mustafa ERGÜL

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Behzat ÇİMEN

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSY-11-3416 kodlu proje ile desteklenmiştir

Haziran 2012
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Mustafa ERGÜL

İmza: 

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

"Akut Egzersizde Oksidan Ve Antioksidan Parametrelerin Araştırılması Ve Melatonin Uygulamasının Etkileri" adlı **Yüksek Lisans Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Mustafa ERGÜL

Danışman

Yrd. Doç.Dr. Behzat ÇİMEN

Anabilim Dalı Başkanı

Prof.Dr. İlhan DEMİRHAN

Yrd.Doç.Dr. Behzat ÇİMEN danışmanlığında **Mustafa ERGÜL** tarafından hazırlanan **"Akut Egzersizde Oksidan Ve Antioksidan Parametrelerin Araştırılması Ve Melatonin Uygulamasının Etkileri "** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Eczacılık Biyokimya** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

05 / 07 / 2012

JÜRİ		**İmza**
Danışman	: Yrd. Doç.Dr. Behzat ÇİMEN	
Üye	: Prof. Dr. İlhan DEMİRHAN	
Üye	: Yrd. Doç.Dr. Serdar ŞIVGIN	

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ..... tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgi, deneyim ve yardımlarıyla beni yönlendiren, sabır ve desteğini hiç esirgemeyen Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Behzat ÇİMEN'e,

Tez oluşumu süresince her aşamada benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen Farmakoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi eşim Merve İNANIR'a,

Hayatımın her döneminde yanımda olan benden maddi manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mustafa ERGÜL

Kayseri, Haziran 2012

AKUT EGZERSİZDE OKSİDAN VE ANTİOKSİDAN PARAMETRELERİN ARAŞTIRILMASI VE MELATONİN UYGULAMASININ ETKİLERİ

Mustafa ERGÜL

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Haziran 2012

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Behzat ÇİMEN

KISA ÖZET

Bu çalışmanın amacı, akut yoğun yüzme egzersizinin oksidan ve antioksidan parametreler üzerindeki etkilerini araştırmaktır. Otuz adet Wistar-albino erkek rat, rastgele eşit sayıda 3 gruba ayrıldı. Grup 1 genel kontrol grubu. Grup 2 akut yoğun egzersiz grubu (30 dk akut yüzme egzersizi yaptırıldı). Grup 3 melatonin grubu (akut yüzme egzersizinden 30 dk önce 25 mg/kg tek doz melatonin uygulandı). Bütün hayvanlar eter anestezi altında sakrifiye edilerek kan örnekleri alındı ve serumları ayrıldı.

Akut yoğun egzersiz grubundaki plazma malondialdehit (MDA) miktarı, melatonin grubu ile karşılaştırıldığında birbirlerine yakın, kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$). Akut egzersiz grubundaki karbonil seviyesi melatonin grubu ile karşılaştırıldığında birbirlerine yakın, kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$). Akut egzersiz grubundaki nitrik oksit (NO) seviyeleri melatonin ile yakın kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0,05$). Plazma süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi akut egzersiz grubunda kontrole yakın, melatonin grubunda iki gruptanda yüksek bulundu ($p<0,05$). Plazma katalaz (KAT) aktivitesi akut egzersizde kontrole göre düşük, melatonin grubunda kontrole göre yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Plazma glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesi akut egzersiz grubunda melatonin grubuna ve kontrol grubuna göre düşük bulundu ($p<0,05$).

Bu sonuçlar, akut yoğun egzersizin antioksidan kapasitesini azalttığını ve oksidatif strese bağlı hasar markırlarının seviyelerini artırdığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Akut Egzersiz; Oksidan; Antioksidan; Melatonin.

INVESTIGATION OF OXIDANT AND ANTIOXIDANT PARAMETERS IN ACUTE EXERCISE AND EFFECTS OF MELATONIN

Mustafa ERGÜL

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Pharmacy Biochemistry

M.Sc. Thesis, June 2012

Supervisor: Yrd. Doç. Dr. Behzat ÇİMEN

ABSTRACT

The aim of this study, is to examine effects of acute intensive swimming exercise on antioxidant and oxidant parameters. Thirty Wistar-albino male rats were divided randomly and an equal number 3 group. Group 1 general control (No application was not performed). Group 2 acute intensive exercise group (30 mins acute intensive swimming exercised). Grup 3 melatonin group (before acute intensive swimming exercise 30 mins 25 mg/kg single dose melatonin administritaion was performed). All animals were sacrified under the ether anesthesia and their blood samples have taken.

Plasma MDA levels of the acute intensive exercise group have been found smilar levels with the melatonin group and higher than the control group ($p<0,05$). Carbonly levels of acute intensive exercise have been found smilar levels with melatonin and higher than control group ($p<0,05$). NO levels of acute intensive exercise group have been found smilar levels with melatonin and higher than cotrol group ($p<0,05$). Plasma SOD activity acute intensive exercise group have been found smilar levels with control and lower than melatonin group ($p<0,05$). Plasma KAT activity on acute intensive exercise group have been found lower than control group and melatonin group higher than control group ($p<0,05$). Plasma GPx activity on acute intensive exercise group have been found lower than both melatonin and control group ($p<0,05$).

According to this results acute and intensive exercise reduce capacity of antioxidant and increase oxidative stress damage markers on plasma.

Key Words: Acute exercise; Oxidant; Antioxidant; Melatonin.

İÇİNDEKİLER

Bilimsel Etiğe Uygunluk i

Yönergeye Uygunluk Onayı ii

Onay iii

Teşekkür iv

Özet v

Abstract vi

Simgeler ve Kısaltmalar ix

Tablolar Listesi xiii

Şekiller Listesi xiv

1. GİRİŞ VE AMAÇ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. SERBEST RADİKALLER VE ÇEŞİTLERİ 3

2.2. Serbest Radikal Kaynakları 4

2.3. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ 4

2.3.1. Süperoksit ($O_2^{\cdot -}$) 4

2.3.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) 5

2.3.3. Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot}$) 5

2.3.4. Hipokloröz Asit (HOCI) 6

2.3.5. Singlet Oksijen ($^1O_2$) 6

2.4. REAKTİF NİTROJEN TÜRLERİ 7

2.4.1. Nitrik oksit (NO) 7

2.4.2. Peroksinitrit (ONOO-) 11
2.5. SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ 12
2.5.1. Lipidlere Etkileri ve Lipid Peroksidasyonu 12
2.5.2. Proteinlere Etkileri ve Protein Oksidasyonu 16
2.5.2.1. Protein Oksidasyonunun Başlıca Basamakları 17
2.5.2.2. Protein Karbonil Türevlerinin Oluşumu 18
2.5.2.3. Protein Fragmantasyonu 22
2.5.2.4. Tiyol Gruplarının Oksidasyonu 24
2.5.2.5. Nitrotirozin Oluşumu 24
2.5.2.6. İleri Oksidasyon Protein Ürünleri 25
2.5.3. Karbonhidratlar Üzerine Etkisi 25
2.5.4. Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Etkileri 26
2.6. ANTİOKSİDAN SAVUNMA MEKANİZMALARI 26
2.6.1.Enzimatik Antioksidanlar 28
2.6.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) 28
2.6.1.2. Katalaz (KAT) 29
2.6.1.3. Glutatyon peroksidaz (GPx) 29
2.7. PİNEAL BEZ VE MELATONİN 31
2.7.1. Melatonin Sentezi ve Salınımı 32
2.7.2. Melatoninin Takviyesinin Serbest Radikal Giderici Etkisi 33
2.8. EGZERSİZ VE AKUT EGZERSİZİN KAN VE DOKULARDAKİ ANTİOKSİDAN ENZİMLER VE OKSİDATİF STRES HASAR MARKIRLARI ÜZERİNE ETKİSİ 35
2.8.1. Egzersiz, Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem 35
2.8.2. Akut egzersizde oksidatif stres 37

2.8.3. Akut Egzersizde Lipit Peroksidasyon, Protein Oksidasyonu ve Antioksidan Sistem 40

2.8.4. Düzenli Egzersizde Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma 43

3. MATERYAL VE METOD 45

3.1. MATERYAL 45

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 45

3.1.2. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler 45

3.1.3. Çalışma Popülasyonu 46

3.2. METODLAR 46

3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması ve Yapılan İşlemler 46

3.2.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Ölçüm Yöntemi 47

3.2.2. Katalaz Aktivitesi Ölçüm Yöntemi 48

3.2.3. Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi Ölçüm Yöntemi 49

3.2.4. Malondialdehit Ölçüm Yöntemi 50

3.2.5. Nitrik Oksit Ölçüm Yöntemi 51

3.2.6. Karbonil Grubu Ölçümü 53

3.2.7. Protein Miktarının Tayini 53

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ 55

4. BULGULAR 56

4.1. SOD ÖLÇÜM SONUÇLARI 56

4.2. KAT ÖLÇÜM SONUÇLARI 57

4.3. GPx ÖLÇÜM SONUÇLARI 58

4.4. MDA ÖLÇÜM SONUÇLARI 60

4.5. NO ÖLÇÜM SONUÇLARI 61

4.6. KARBONİL GRUBU ÖLÇÜM SONUÇLARI 62

4.7. GRUPLARIN TOPLUCA DEĞERLENDİRİLMESİ 64

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 65

KAYNAKLAR 70

ÖZ GEÇMİŞ 81

SİMGELER VE KISALTMALAR

$^1O_2$ **:** Singlet oksijen

BSA **:** Bovin Serum Albümin

cGMP **:** Siklik Guanozin Mono Fosfat

DEKAM **:** Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi

DNA **:** Deoksiribo Nükleik Asit

eNOS **:** Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz

FAD **:** Flavin Adenin Dinükleotid

FMN **:** Flavin Mononükleotid

GPx **:** Glutatyon peroksidaz

GR **:** Glutatyon redüktaz

GSH **:** Glutatyon

GSSG **:** Okside glutatyon

HOCI **:** Hipoklorik asit

H_2O_2 **:** Hidrojen peroksit radikali

iNOS **:** İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

KAT **:** Katalaz

MDA **:** Malondialdehit

MEL **:** Melatonin

MPO **:** Miyeloperoksidaz

nNOS **:** Nöronal nitrik oksit sentaz

NADPH **:** Nikotin Amid Dinükleotid Fosfat

NO **:** Nitrik oksit

NO_2^- **:** Nitrit

NO_3^- **:** Nitrat

NOS **:** Nitrik Oksit Sentaz

O_2^- **:** Süperoksit anyon radikali

$OH^\cdot$ **:** Hidroksil radikali

$ONOO^-$ **:** Peroksinitrit

RNS **:** Reaktif Nitrojen Türleri

ROS **:** Reaktif Oksijen Türleri

SOD **:** Süperoksit dismutaz

TBA **:** Tiyobarbitürik Asit

TCA **:** Trikloroasetik Asit

TFA **:** Trifloroasetik Asit

XO **:** Ksantin Oksidaz

İp **:** İntraperitoneal enjeksiyon

NAT **:** N-asetil transferaz

8-OHdG **:** 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin

Ü **:** Ünite

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Bazı Radikaller, Simgeleri ve Özellikleri 7

Tablo 2.2. Oksidasyona yatkın olan aminoasitler ve oksidasyon ürünleri 22

Tablo 2.3. Enzimatik ve Enzimatik Olmayan Antioksidanlar..... 27

Tablo 3.1. SOD aktivite ölçümünde uygulanan işlem..... 48

Tablo 3.2. Katalaz aktivite ölçümünde uygulanan işlem. 49

Tablo 3.3. Glutatyon peroksidaz aktivite ölçümünde uygulanan işlem 50

Tablo 3.4. Malondialdehit ölçümünde uygulanan işlem. 51

Tablo 3.5. NO ölçümünde uygulanan işlem. 52

Tablo 4.1. Gruplara ait SOD aktivite değerleri (Ü/mg protein) 56

Tablo 4.2. Gruplara ait KAT aktivite değerleri (ku/L protein)..... 58

Tablo 4.3. Gruplara ait GPx aktivite değerleri (Ü/mg protein) 59

Tablo 4.4. Gruplara ait MDA değerleri (µmol/l)..... 60

Tablo 4.5. Gruplara ait NO değerleri (µmol/L)..... 62

Tablo 4.6. Gruplara ait karbonil grubu değerleri (nmol/mg protein) 63

Tablo.4.7. Grupların topluca değerlendirilmesi 64

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Memeli hücrelerinde NO üretiminin biyokimyasal yolu 9

Şekil 2.2. Nitrik oksit sentazın (NOS) yapısı, katalizlediği reaksiyonlar ve kofaktörleri 10

Şekil 2.3. İnsan nNOS, eNOS ve iNOS izoformlarının domain yapısı 11

Şekil 2.4. Lipid peroksidasyonunun basamakları 14

Şekil 2.5. MDA ve TBA arasındaki reaksiyon sonucu MDA-TBA_2 oluşumu 15

Şekil 2.6. Aminoasit yan zincirlerinin direk oksidasyonu sonucu oluşan karbonil türevlerinin yapısı 17

Şekil 2.7. Serbest oksijen radikal aracılı protein oksidasyonu 19

Şekil 2.8. Glikasyon, glioksidasyon ve poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) peroksidasyon ürünleri ile proteinlerin reaksiyonları sonucu, protein karbonil gruplarının oluşumu. A. Protein lizil amino gruplarıyla (P-NH_2) şekerlerin reaksiyonu. B. Protein lizin (P-NH_2), histidin (P-his) veya sistein (PSH) rezidülerine 4-hidroksi-2-nonenal'ın Michael reaksiyonu ile eklenmesi. C. Lipid peroksidasyon ürünleriyle, malondialdehid ve protein amino gruplarının (PNH_2) reaksiyonu 21

Şekil 2.9. Diamid (a) ve α-amidasyon (b) yolu ile peptid bağının ayrılması 23

Şekil 2.10. Glutamik asit ve prolin rezidülerinde hidroksil radikali atağı sonucunda oluşan peptid fragmantasyonu 24

Şekil 2.11. Nitrotirozin oluşumu 25

Şekil 2.12. Glutatyon döngüsü. Glutatyon (GSH) glutatyon disülfite (GSSG) oksitlenirken su (H_2O) hidrojen peroksite (H_2O_2) redüklenir 31

Şekil 2.13. Melatonin sentezi 33

Şekil 2.14. Oksihemoglobinin methemoglobine oksidasyonu sırasında süperoksit anyonlarının oluşumu 39

Şekil 2.15. Akut egzersizle ilişkili reaktif oksijen türlerinin üretiminin olası mekanizmaları (45) 40

Şekil 4.1. Kontrol, Egzersiz ve Melatonin grubunun ortalama SOD düzeyleri..... 57

Şekil 4.2. Kontrol, Egzersiz ve Melatonin grubunun ortalama KAT düzeyleri. 58

Şekil 4.3. Kontrol, Egzersiz ve Melatonin grubunun ortalama GPx düzeyleri..... 59

Şekil 4.4. Kontrol, Egzersiz ve Melatonin gruplarına ait MDA düzeyleri 60

Şekil 4.5. Nitrit kalibrasyon ve doğrusallık eğrisi 61

Şekil 4.6. Kontrol, Egzersiz ve Melatonin gruplarına ait NO düzeyleri..... 62

Şekil 4.7. Kontrol, Egzersiz ve Melatonin gruplarına ait karbonil grubu düzeyleri..... 63

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Fiziksel egzersizin, sağlık üzerine pek çok faydalı etkilere sahip olmasının yanında, reaktif oksijen türlerinin ve serbest radikal oluşumunun özellikle şiddetli egzersiz sırasında arttığına ve oksidatif hasarın kas, karaciğer, kan ve diğer dokularda oluştuğuna dair bulgular da mevcuttur. Fiziksel egzersizle ilgili olan oksidatif hasar, egzersizin tipi ve yoğunluğuna bağlıdır. Egzersizin yoğunluğu ne kadar yüksek olursa, oksidatif stres ve serbest radikal oluşumu da o kadar fazla olur. Özellikle akut, yoğun egzersizlerin oksidatif strese neden olduğu belirtilirken, düzenli dayanıklılık antrenmanlarının egzersiz sonrası oksidatif stresi ve kas hasarını düşürdüğü ve antioksidan savunma kapasitesini geliştirdiği ileri sürülmektedir. Egzersizin serbest radikal üretimini artırdığı ilk kez 1982 yılında gösterilmiş o zamandan beri egzersizin oksidatif stres üzerine etkisi birçok çalışmada araştırılmıştır (1, 2).

Egzersiz süresince oksijen tüketimi dinlenme durumuna göre 10-15 kat artabilmekte, bunun sonucunda dinlenme durumuna göre yüksek miktarda serbest radikal üretimi olmaktadır. Egzersiz esnasında oksijen tüketiminin artması serbest radikal üretiminde artışa yol açar. Akut olarak yapılan egzersizin iskelet kası, kalp, karaciğer ve böbrek gibi çeşitli dokularda ayrıca eritrosit, serum ve plazmada antioksidan enzim aktivitelerinde ve MDA, karbonil grubu gibi oksidatif stres belirteçlerinde değişikliklere neden olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (3, 4, 5, 6).

Akut egzersizin oluşturduğu oksidatif stres özellikle son 10 yılda geniş bir şekilde araştırılmıştır. Bu çalışmalarda akut egzersizden sonra kandaki oksidatif stres belirteçlerinde artış tanımlanması, oksidatif stresin sadece hücresel elemanlarla sınırlı olmadığına işaret etmektedir (7). Akut egzersiz; serbest radikallerin, özellikle süper oksit ve hidrojen peroksit gibi diğer reaktif oksijen türlerinin artışıyla sonuçlanır. Özellikle yüksek şiddette yapılan akut aerobik egzersizin oksidatif strese neden olduğu birçok çalışmada bildirilmiştir (8, 9). Akut egzersize cevap olarak reaktif oksijen

türlerinin oluşumu mitokondrial solunum (elektron transport zincirinden elektron sızıntıları), prostanoid metabolizması, katekolaminlerin otooksidasyonu ve oksidaz enzimatik aktivite (NAD(P)H oksidaz, ksantin oksidaz) gibi çeşitli yollarla oluşabilir. Akut egzersiz sırasında aktif olan kaslar hipoksik olabilirler. Hipoksi durumunda nitrik oksit radikallerinin oluşumuna önderlik eden nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesinde artış olduğu gösterilmiştir. Bu radikaller kendi başlarına iken zayıf prooksidan etkiye sahiptirler veya süperoksitle birleşerek peroksinitriti oluşturur, böylece daha güçlü bir oksidan ajana dönüşürler. Ayrıca egzersiz ile birlikte artan ısı mitokondrilerde süperoksit üretiminde artmaya neden olarak oksidatif strese neden olabilmektedir (8, 10, 11).

Melatonin (MEL) ya da N-asetil-5-metoksitriptamin, pineal bezden salgılanan biyolojik bir amindir. MEL'in bir antioksidan olduğu, literatürde ilk kez 1991 yılında öne sürülmüş ve daha sonra yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarla bu özelliği desteklenmiştir (12, 13). Hem in vitro hem de in vivo çalışmalar melatoninin oldukça toksik olan hidroksil radikalini ve diğer oksijen merkezli radikalleri oldukça etkili bir şekilde ortadan kaldırdığını göstermişlerdir (14). MEL direk bir serbest radikal temizleyici olarak etki eder ve hem reaktif oksijen türlerini (ROS) hem de reaktif nitrojen türlerini (RNS) detoksifiye eder. Bununla birlikte MEL'in antioksidatif savunma sistemlerinin aktivitesini artırdığı da bilinmektedir. MEL'in, SOD, GPx, GR, CAT gibi birçok antioksidatif enzimin uyarıcısı olduğu bilinmektedir (15). Yapılan birçok çalışmada MEL takviyesinin egzersiz sonucu oluşan oksidatif stres üzerinde baskılayıcı etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (16, 17, 18).

MEL'in oksidatif stres ve antioksidan savunma üzerine etkilerinin araştırıldığı birçok çalışma bulunmasına rağmen akut egzersiz sonucu, kanda karbonil, MDA, NO gibi oksidatif stres parametreleriyle antioksidan enzimlerden SOD, CAT, GPx parametrelerinin topluca değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamaktadır. Bu parametrelerin topluca değerlendirilmesi akut egzersizin biyokimyası hakkında bize bilgiler verecektir. Bu çalışmanın amacı, akut egzersiz sonucu oluşan hasar markırlarına ve antioksidan enzim aktivitelerine melatoninin hangi yönde etki edeceğini araştırmaktır. Bu nedenle araştırmalarımızın sonucunda daha önce kısmen yapılmış olan akut egzersizdeki bu söz konusu parametrelerin topluca incelenmesi ve melatoninin bu parametrelere etkisini araştırarak literatüre katkıda bulunmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. SERBEST RADİKALLER VE ÇEŞİTLERİ

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kararsız, kısa ömürlü, molekül ağırlığı düşük, atomik veya moleküler yapısı nedeniyle oldukça etkin atom, molekül veya bileşiklerdir (7, 19, 20).

Serbest radikaller çok reaktif yapılardır ve tek elektronlarını çiftlemek üzere diğer moleküller ile hızla reaksiyona girmeye, dolayısıyla onların yapılarını değiştirmeye eğilimlidirler. Bu moleküller oldukça reaktif oldukları için özellikle hücresel lipidlerle, proteinlerle, nükleotidlerle ve karbonhidratlarla etkileşerek doku hasarlarına neden olabilirler. Serbest radikaller anyon, katyon ve nötral durumda bulunabilirler. Bağımsız olarak varlıklarını sürdürebilme yeteneğine sahiptirler. Kimyasal sembollerinin üst taraflarına, en dış orbitallerindeki çiftlenmemiş elektron temsili için nokta ile ($R^{\cdot}$) gösterilirler (21, 22, 23).

Serbest radikallerin, reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) olmak üzere iki yaygın formu bulunmaktadır. Süperoksit anyonu (O_2^{-}), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$), peroksil radikali (HO_2^{-}) ROS'a örnek verilebilirken, nitrik oksit ($NO^{\cdot}$), peroksinitrit ($ONOO^{-}$) ve nitroksil anyonu (NO^{-}) RNS'ye örnek verilebilir (24).

İçinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel ve kimyasal olaylar nedeniyle sürekli bir radikal oluşumu vardır. Hücrelerdeki metabolik olaylar sırasında farklı tür ve miktarlarda radikaller oluşmaktadır (25).

2.2. SERBEST RADİKAL KAYNAKLARI

Hücreler metabolik süreçlerinin bir parçası olarak sürekli serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerini üretirler. Serbest radikallerin üretim miktarı birçok faktörün dengesi tarafından belirlenir ve reaktif oksijen türleri hem endojen hem de eksojen olarak üretilir.

Endojen Kaynaklı Serbest Radikal Üretim Kaynakları:

- Mitokondriyal elektron transport sistemi reaksiyonları
- Sitokrom P450 metabolizması
- Peroksizomlar
- İnflamasyon sırasında nötrofiller ve makrofajlar tarafından üretilirler

Reaktif oksijen türleri aynı zamanda eksojen kaynaklar tarafından da üretilebilir.

Eksojen Kaynaklı Serbest Radikal Üretim Kaynakları:

- Ksenobiyotikler (Yabancı kimyasallar)
- Çevresel ajanlar
- Metaller (redoks ve redoks olmayan)
- İyonlar
- Atmosfer kirliliği ve radyasyon (26, 27).

2.3. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ

2.3.1. Süperoksit ($O_2^{\cdot -}$)

Süperoksit anyonu, biyokimyasal reaksiyonlarda başlıca ara ürün olarak oluşur. Hem çevresel etkenler, hem de organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle en çok ve en kolay oluşan oksijen radikali, süperoksit radikalidir. Esas önemi, hidrojen perokside kaynaklık etmesi ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Uzun bir yarı ömre sahiptir ve lipofilik özellik gösterir. Bu özelliğinden dolayı da oluştuğu yerden uzak bölgelere difüzyonla yayılabilmekte, böylece hücre içi potansiyel hedef sayısını artırabilmektedir. Ancak doğrudan hasar yapıcı etkisi çok fazla değildir. En çok mitokondri, endoplazmik retikulum ve kloroplast gibi hücresel organellerde, elektron transport zincirinin çeşitli komponentlerinden O_2'ye elektron sızması ile olur. Enfekte olmuş hücreler metabolik süreçlerinin bir parçası olarak diğer hücrelere göre daha yüksek miktarda süperoksit üretirler.

Serbest süperoksit radikal anyonu ($O_2^{\bullet -}$) hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelir.

$$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\cdot -}$$

Aerobik canlılarda süperoksitlerin H_2O_2'ye çevrilmesi, katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenir ve SOD enziminin yüksek katalitik aktivitesi sebebiyle hücrelerde süperoksit birikimine izin verilmez (11, 28).

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

2.3.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit meydana gelir. Peroksit molekülü de iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi oluşturur.

SOD tarafından katalizlenen reaksiyon sonucunda ortaya çıkar ve reaksiyon sonucu radikal türler meydana geldiğinden bu reaksiyon bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir.

$$2O_2 + 2H^+ \xrightarrow{SOD} 2H_2O_2 + O_2$$

Hidrojen peroksit kararlı, zarlardan geçebilen ve hücre içerisinde uzun bir ömre sahiptir. H_2O_2' nin pK' sı 10,6 olduğundan nötral ve asidik koşullarda net yük taşımaz, biyolojik zarlardan kolayca geçebilir. Eşlenmemiş elektrona sahip olmadığı için serbest radikal değildir. Hidrojen peroksidin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin sebebi toksitesinin olması ve Cu, Fe gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalinin öncüsü gibi davranmasıdır (1, 11, 25, 28).

2.3.3. Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot}$)

Hidroksil radikali, oldukça güçlü ve çok kısa yarı ömre sahip oksijen merkezli bir radikaldir. Bu nedenle in vivo oluşan bir hidroksil radikali birçok biyomoleküle reaksiyona girer ve oluştuğu yerde büyük hasara neden olur. Biyolojik ve kimyasal sistemlerde üretilebilen hidroksil radikali canlılarda iki mekanizma ile oluşabilir. Bunlardan ilki, iyonlaştırıcı radyasyonun etkisi ile sulu ortamda su moleküllerinin iyonlaşmasıdır. Oluşan hidroksil radikali canlılarda radyasyonun toksik etkisinden sorumlu başlıca türdür. İkincisi ise hidrojen peroksidin eksik indirgenmesidir ve bu

vücutta en önemli hidroksil radikali kaynağıdır. Hidrojen peroksidin geçiş metalleri varlığında indirgenmesi (Fenton Reaksiyonu) ve hidrojen peroksidin süperoksit radikali ile reaksiyonu sonucu (Haber-Weiss Reaksiyonu) meydana gelen hidroksil radikali; organik ve inorganik bileşiklerde elektron transfer tepkimelerine neden olur (11, 23, 25).

Hidroksil radikali çok reaktif, oldukça toksik bir reaktif oksijen türü olmakla birlikte bu serbest radikale karşı koyacak bir antioksidan bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu reaktif oksijen türü lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonuna neden olmaktadır (1).

2.3.4. Hipokloröz Asit (HOCI)

Hipokloröz asit, bir serbest radikal olmamasına rağmen güçlü bir oksidandır. Özellikle nötrofiller içermiş oldukları myeloperoksidaz enzimi sayesinde hidrojen peroksidi (H_2O_2) klorür iyonuyla (Cl^-) birleştirerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan hipokloröz asit (HOCI)'e dönüştürürler. Hipokloröz asit bakterileri halojenasyon ve oksidasyon tepkimeleri ile saniyeler içinde tahrip eden güçlü bir toksindir. Saldırıya uğrayan aerobik bakteriler hızla zardan taşıma becerilerini yitirmekte olup bunun olası nedeni ATP sentaz veya elektron taşıma zincir bileşenlerinin hasara uğramasıdır.

$$H_2O_2 + Cl^- \longrightarrow HOCl + OH^-$$

Ayrıca hipokloröz asit hücre membranlarını geçerek çeşitli biyomoleküllerin hasar görmesine neden olabilmektedir (23, 28, 29).

2.3.5. Singlet Oksijen ($^1O_2$)

Oksijenin eşleşmemiş elektronlarından birinin verilen enerji sonucu bulunduğu orbitalden başka bir orbitale veya kendi spininin ters yönüne yer değiştirmesi ile oluşur. Singlet oksijenin delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır. Çok kısa yarı ömre sahiptir ancak zarlardan difüzyonla geçebilme özelliği vardır. Singlet oksijen eşleşmemiş elektrona sahip olmadığı için radikal değildir (11, 28).

Bilinen başlıca radikal türleri **Tablo 2.1**' de gösterilmektedir.

Tablo 2.1. Bazı Radikaller, Simgeleri ve Özellikleri (30)

Hidrojen	H+	Bilinen en basit radikal.
Süperoksit	$O_2^{\cdot -}$	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü.
Hidroksil	$OH^{\cdot}$	En Reaktif Oksijen Radikali.
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Reaktivitesi Düşük, Moleküler Hasar Yeteneği Zayıf
Singlet oksijen	$^1O_2$	Yarılanma ömrü hızlı, güçlü oksidatif oksijen formu.
Perhidroksil Radikali	$HO_2^{\cdot}$	Lipidlerde hızlı çözünerek lipid peroksidasyonunu arttırır.
Peroksil Radikal	ROO·	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipidlere lokalize olur.
Thiyl Radikali	RS·	Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içeren türlerin genel adı
Alkoksil	RO·	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metaboliti
Nitrojen Oksit	NO·	L-arjinin amino asitinden in vivo üretilir.
Nitrojen Dioksit	NO_2·	NO' in oksijen ile reaksiyonu sonucunda üretilir.
Peroksinitrit	$ONOO^-$	Nitrikoksit ve süperoksit radikalinin birleşmesi ile oluşur.

2.4. REAKTİF NİTROJEN TÜRLERİ

Nitrik oksit (NO), nitröz oksit (N_2O), peroksinitrit ($ONOO^-$) , nitroksil anyon (NO^-) ve peroksi nitröz asit (HNO_3)'i içeren reaktif nitrojen türleri sıklıkla reaktif oksijen türlerinin alt sınıfı olarak düşünülmüştür (24).

2.4.1. Nitrik oksit (NO)

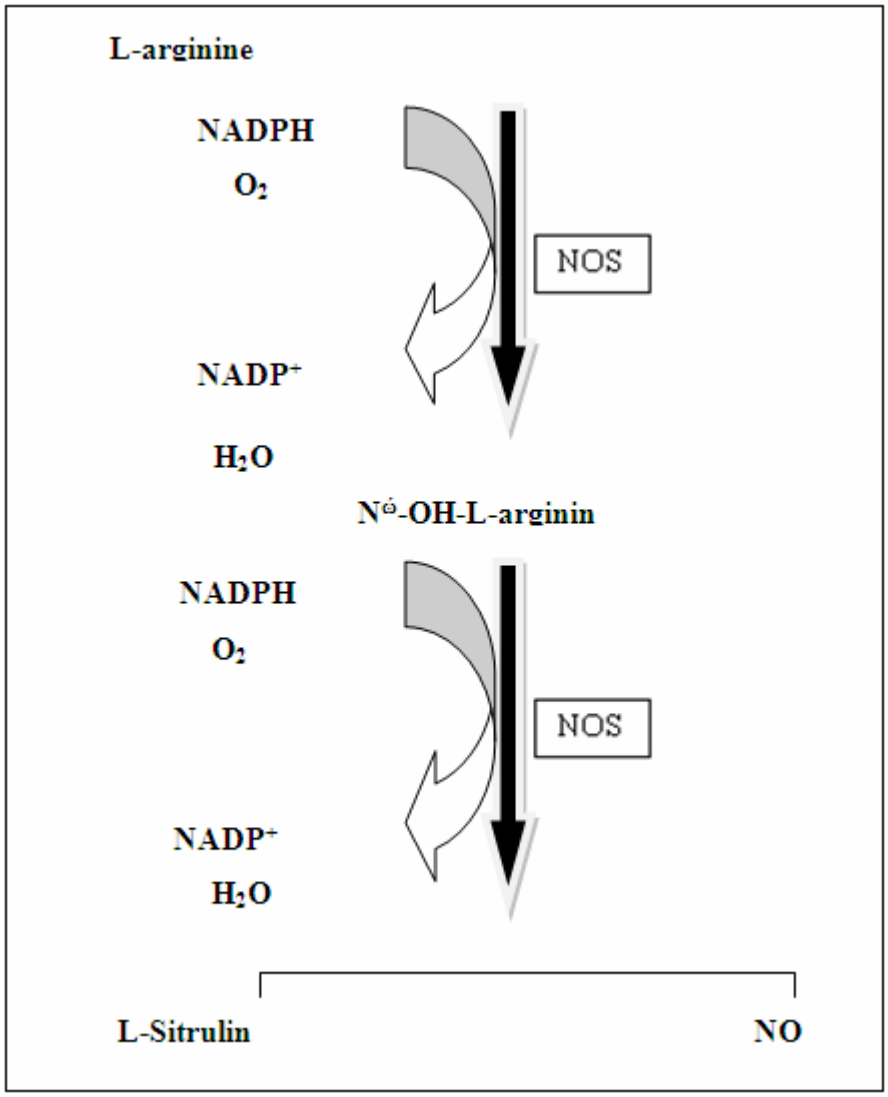
Serbest oksijen radikali bileşiklerinden ve biyolojik sinyal moleküllerinden biri olan nitrik oksit (NO) birçok hücre tipinde; nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesi ile arjininden üretilmekte ve organizmada çift yönlü etki gösterdiği bildirilmektedir. Hem birçok fizyolojik fonksiyonun gerçekleşmesi için gerekli olduğu ve antioksidan savunmaya katkıda bulunduğu, hem de aşırı üretim durumunda radikal etki gösterdiği ve peroksinitrit gibi daha güçlü radikal bileşiklerin oluşmasına yol açtığı vurgulanmaktadır. Nitrik oksit, tıpkı oksijen gibi yaşam için hem esansiyel hem de toksiktir. Bir tek elektrona sahiptir ve dolayısıyla Fe^{3+} gibi tek elektron içeren diğer bileşiklere bağlanır.

Bir gaz olarak sitozol boyunca ve lipid zarlardan hücre içine sızar. Düşük derişimlerde iken fizyolojik olarak bir nörotransmiter ve vazodilatasyona neden olan bir hormon olarak görev yapar. Öte yandan, yüksek derişimde bulunacak olursa hem azot hem oksijen içeren (RNOS) ilave tepkici ve toksik türler oluşturmak üzere O_2 veya süperoksitle birleşir. Süper oksitle etkileşen nitrik oksit (NO) oldukça reaktif nitrojen türlerini oluşturur. Süper oksit ile nitrik oksit etkileşimi sonucu peroksinitrit radikalleri oluşur (25, 29, 31, 32, 33).

NO biyolojik sistemlerde üretilen çok yönlü, inorganik bir serbest radikaldir. Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimiyle katalizlenir. Oluşan NO, içinde bulunduğu mikro çevreye göre nitrosonyum iyonu (NO^+), nitroksil anyonu (NO^-) ya da O^-_2 ile reaksiyona girerek oksidatif hasarda rol oynayan peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi çeşitli reaktif nitrojen ürünlerine (RNS) dönüşebilir ki bu da, oldukça güçlü doku hasarına yol açan bir maddedir. Bazı fizyolojik hallerde ara form olan S-nitroso-sistein ya da S-nitroso-glutatyon durumunda bulunabilir. NO oluştuktan sonra: 1-) Methemoglobin, nitrite (NO_2^-) ve nitrata (NO_3^-) dönüşerek inaktive olur; 2-) Süperoksit anyonları (O_2^-) ile birleşerek peroksinitrite ($ONOO^-$) dönüşür. Peroksinitrit, hidroksil radikalleri ($OH^\cdot$) ve tirozinle birleşerek nitrotirozini oluştururlar. $OH^\cdot$ ve $ONOO^-$ astım patogenezinde rol alan moleküllerdir; 3-) Guanil siklaz aktivasyonu ile cGMP (Siklik Guanozin Mono Fosfat)' yi artırarak düz kas gevşemesine neden olmaktadır. Nitrik oksit yüksek yapılı canlılarda amaçlı olarak ve çok önemli biyolojik fonksiyonları yerine getirmek üzere üretilen nitrojen merkezli bir radikaldir. Paylaşılmamış elektron aslında nitrojen atomuna ait ise de, bu elektronun hem nitrojen hem de oksijen atomu üzerinde delokalize olması nedeni ile tam radikal özelliği taşımaz. Bunun sonucu, bilinen diğer radikallere göre reaktivitesi baskılandığında oldukça uzun ömürlüdür. NO'in noradrenalin ve dopamin salınımı, bellek, serebrovasküler sistemin ve nosiseptif duyuların düzenlenmesi, koku alma, yemek yeme gibi birçok fizyolojik işlevin gerçekleşmesinde rolü vardır. NO düşük konsantrasyonda vasküler tonusun kontrolü, nörotransmisyon, öğrenme ve hafıza gibi fizyolojik süreçlerde görev yaparken, yüksek konsantrasyonda savunma amacı ile sitotoksin gibi rol oynar (11, 34).

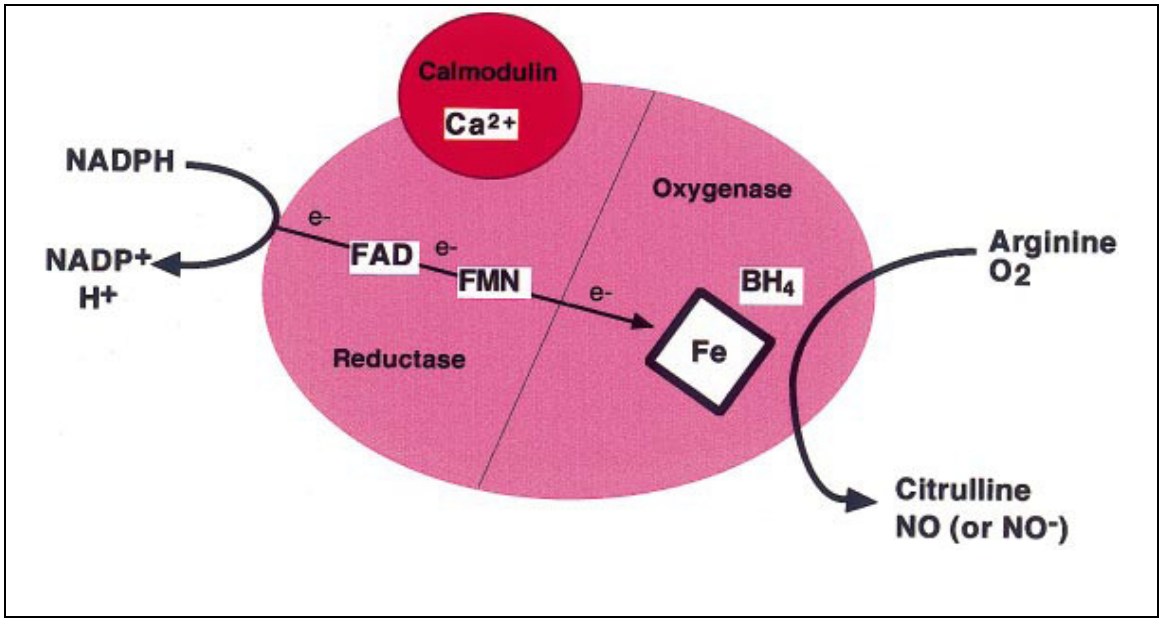
NADPH ve oksijen varlığında, nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından L-arginin'in L-sitrüllin'e oksidasyonu sırasında nitrik oksit ($NO^\cdot$) sentezlenmektedir. Bu reaksiyonun gerçekleşebilmesi için nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), kalsiyum/kalmodulin (CaM), Flavin mononükleotid (FMN) ve tetrahidrobiopterin

(BH_4) kofaktörlerinin varlığına gereksinim vardır. Memeli hücrelerinde nitrik oksit üretiminin biyokimyasal yolu **Şekil 2.1.** de verilmiştir (28, 35, 37).



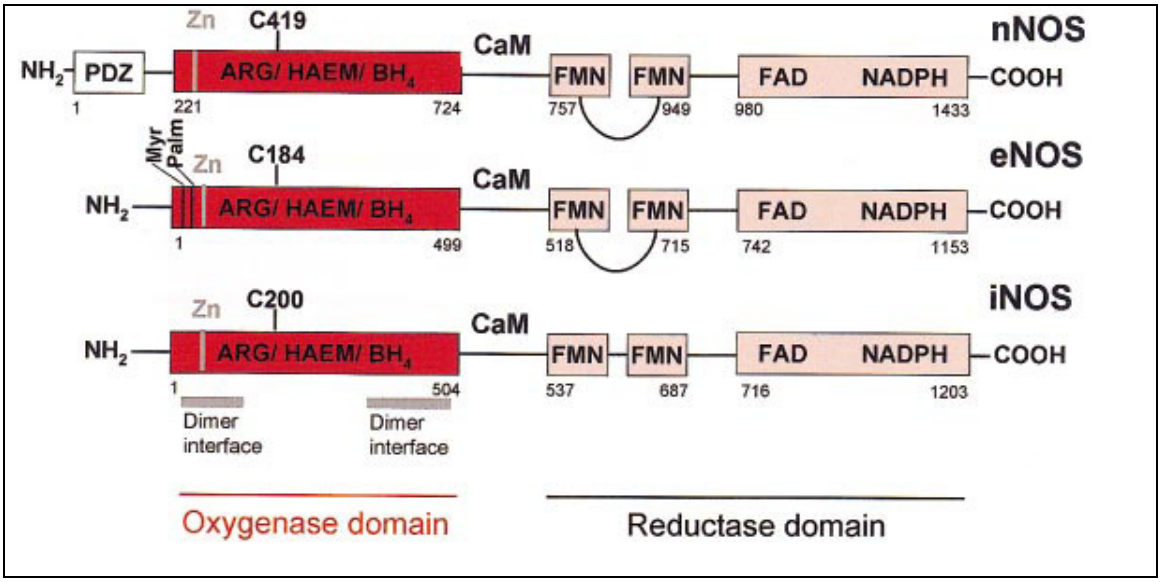
Şekil 2.1. Memeli hücrelerinde NO üretiminin biyokimyasal yolu (36).

Ayrıca enzimin (NOS) dimerik yapısı, katalizlediği reaksiyonların tamamı ve kofaktörleri **Şekil 2.2.** de gösterilmiştir (37).



Şekil 2.2. Nitrik oksit sentazın (NOS) yapısı, katalizlediği reaksiyonlar ve kofaktörleri (37)

Vücutta nitrik oksit sentaz (NOS)' ın nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS, izoform I ya da Tip I), indükte edilebilir nitrik oksit sentaz (iNOS, izoform II, ya da Tip II) ve endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS, izoform III ya da Tip III) olarak üç farklı dokuya özgü izoformu bulunmakta olup bunların her biri farklı bir gen tarafından şifrelenmiştir. NOS izoformlarını şifreleyen genler benzer genomik yapıya sahiptir. **Şekil 2.3.** de bu izoformların domain yapısı gösterilmiştir. N-terminal oksijenaz domain, hem, BH_4, ve L-arjinin için bağlanma bölgesi içerirken, C-terminal redüktaz domain FAD, FMN, ve NADPH için bağlanma bölgesi içerir. Nöronal NOS birçok hücre tipinde bulunacağı gibi spesifik olarak nöron dokularda, endotelyal NOS, asıl olarak endotelyal hücrelerde ve indüklenebilir NOS, bağışıklık sisteminin bir çok hücresinde ve makrofajlar gibi benzer bir hattan gelen hücre tiplerinde bulunmaktadır ve sentezi sitokinler ile bakteriyel toksinler tarafından indüklenir. nNOS ve eNOS, bir nörotransmiter ve bir hormon olarak rol oynadığı için gereken az miktarda NO' yu üretmek için Ca^{2+} derişimi tarafından sıkıca düzenlenmektedir. Bunun aksine iNOS, esas olarak gen transkripsiyonunun indüksiyonu ile düzenlenmekte olup Ca^{2+} derişimindeki değişiklikler iNOS'u etkilemez. Bu enzim saldırgan mikroorganizmaların öldürülmesine yardım etmek için yüksek ve toksik düzeylerde NO üretir.



Şekil 2.3. İnsan nNOS, eNOS ve iNOS izoformlarının domain yapısı (37)

Nitrik oksit zayıf bir indirgeyici ajandır. Oksijen ile reaksiyona girerek nitrik diokside ve çok hızlı bir şekilde süperoksit ile reaksiyon vererek peroksinitrit oluşumuna neden olur (28, 29, 37, 38).

2.4.2. Peroksinitrit (ONOO-)

Nitrik oksit çok yüksek derişimde bulunduğu zaman peroksinitrit ($ONOO^-$) yapmak üzere süperoksitle veya N_2O_3 yapmak üzere O_2 ile enzimatik olmayan yoldan birleşir. Peroksinitrit, bir serbest radikal olmamasına rağmen kararlı ve direkt toksik olan güçlü bir oksitleyici ajandır. Bu madde, protein metiyonin ve –SH grupları dâhil çok geniş bir hedef grubuyla etkileşmek üzere hücreler ve lipid zarlar üzerinden sızabilir. Bu madde, lipid peroksidasyonunun etkin bir başlatıcısı olan serbest radikal azot dioksit dâhil ek RNOS'lar oluşturmak üzere yıkılmaya da uğrar. Peroksinitrit ürünleri aromatik halkaları nitratlayarak nitrotirozin veya nitroguanozin gibi bileşiklerde türetebilir. Süperoksit ($O_2^{\cdot -}$) ile nitrik oksit (NO)'in reaksiyonu sonucu peroksinitrit oluşur.

$$O_2^{\cdot -} + NO^{\cdot} \longrightarrow ONOO^-$$

Peroksinitrit (veya protonlanmış formu ONOOH) çok güçlü bir oksitleyici ajandır ve tiyol gruplarının yıkılmasına, DNA hasarına ve proteinlerin nitratlanmasına neden

olabilir. Bunlara ilaveten peroksinitrit oluşumu süperoksit ve nitrik oksit (NO)' in biyoyararlılığında azalmaya neden olmaktadır (28, 29).

Peroksinitrit tek başına oldukça güçlü bir oksidandır ve elektronca zengin gruplarla direkt olarak reaksiyoan girebilir. Buna rağmen çözeltilerde şaşırtıcı bir şekilde stabil halde bulunur. Yarılanma ömrü çok kısadır ve membranlardan kolayca geçebilmektedir. Fizyolojik şartlar altında, peroksinitrit üretimi düşük seviyelerdedir ve endojen antioksidanlar sayesinde peroksinitrite bağlı oksidatif hasar alt seviyelerdedir. Buna rağmen inflamasyon, sepsis, bakteriyel enfeksiyonlar gibi patolojik durumlarda süperoksit ve NO üretimindeki artışa bağlı olarak peroksinitrit üretiminde aşırı bir artış meydana gelir. Bunun sonucunda $ONOO^-$ üretimindeki uzun süreli artışlar önemli hücresel süreçlerde aksamalara, hücresel sinyal yolaklarında kesilmelere ve apoptozis ve nekroza bağlı hücre ölümlerine neden olur. Bunun sonucu olarak, $ONOO^-$ üretimindeki artışlar birçok patolojik sürecin gelişmesine neden olabilmektedir (38).

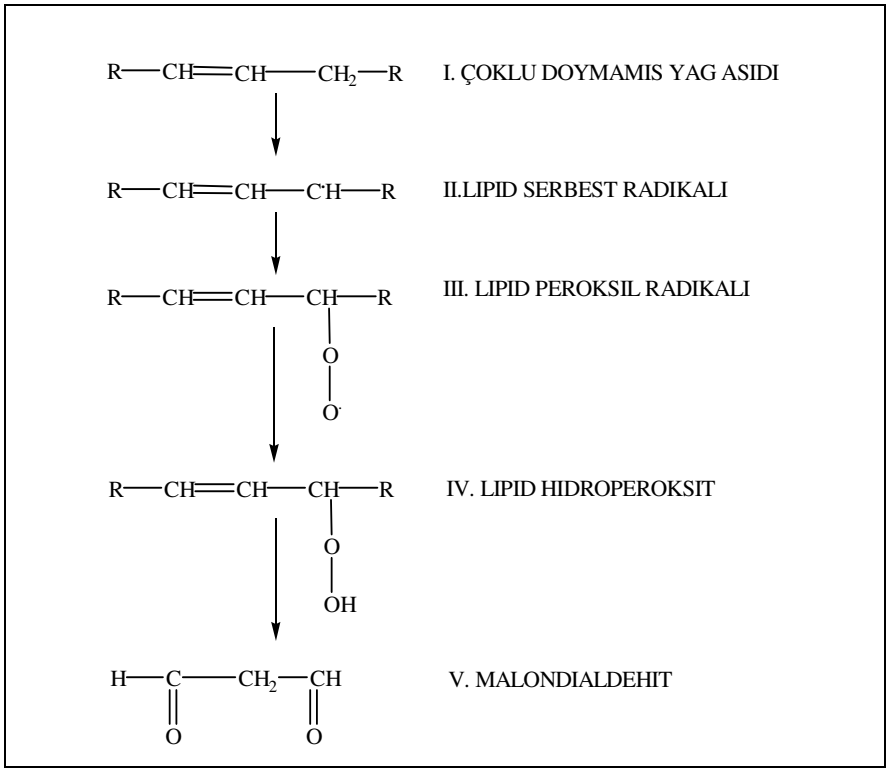
2.5. SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ

Yağlar, proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratlar dâhil olmak üzere bütün hücresel bileşenler serbest radikallerin potansiyel hedefi durumundadırlar. Serbest radikallerin aşırı üretimi durumunda, bu serbest radikaller lipidleri, proteinleri, karbonhidratları ve nükleik asitleri oksitlerler. Bu reaksiyonlar sonucunda lipid peroksidasyonu, karbonil grupları ve DNA hasarı meydana gelir (22, 26).

2.5.1. Lipidlere Etkileri ve Lipid Peroksidasyonu

Biyomembranlar üzerindeki çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) serbest radikaller ile etkileştiğinde bir dizi peroksidatif reaksiyon meydana gelir ve bunun sonucunda metan, etan, pentan gibi hidrokarbon gazlar ve malondialdehit (MDA) gibi aldehitler meydana gelir. Egzersiz süresince oksidatif doku hasarı belirteci olarak lipid peroksidasyonu sonucu oluşan yan ürünler sıklıkla kullanılmaktadır. Aldehitler, özelliklede MDA egzersize cevap olarak oluşan oksidatif stres markırı olarak sıklıkla kullanılır (3, 26). Tüm biyomoleküller serbest radikallerin ataklarına maruz kalır ancak bunların içinde lipitler en kolay etkilenenlerdir (25). Hücre; membranı ve diğer kompenentleri ile serbest radikal atakları ve peroksidasyon için potansiyel bir hedeftir (11). Lipid

peroksidasyonu, membranda bulunan (fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısında yer alan) poliansatüre yağ asitlerinin, serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehidler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur **(Şekil 2.4.)** (42). **Şekil 2.4.'** e göre reaktif türlerin hedefi çoklu doymamış yağ asitlerinin karbon-karbon çift bağlarıdır (I). Bu çift bağlar karbon-hidrojen bağını zayıflatır böylece hidrojenin bir serbest radikal tarafından ayrılmasını kolaylaştırır. Daha sonra serbest radikal hidrojen atomunu koparır ve lipid serbest radikali oluşur (II). Bu yapının oksidasyonu sonucu bir peroksil radikali oluşur (III). Bu peroksil radikali diğer çoklu doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girebilir ve bir elektron koparak diğer bir lipid serbest radikali olan lipid hidroperoksiti oluşturur (IV). Bu süreç zincir reaksiyon şeklinde ilerleyebilir. Lipid hidroperoksit kararsız bir yapıdır ve bu yapının parçalanması sonucu malondialdehit (MDA) oluşur (V) (42). Lipid hidroperoksitlerinin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak aktif olan aldehidler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiyobarbitürik asitle ölçülebilen malondialdehid (MDA) meydana gelir. Bu metod lipid peroksid seviyelerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır. MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir fakat lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Plazmada artmış konsantrasyondaki malondialdehit (MDA) yüksek lipid peroksidasyonunun bir göstergesidir. MDA, serbest oksijen radikallerinin dokularda oluşturduğu lipid peroksidasyonunun, dolayısıyla oksidatif stresin en duyarlı göstergelerinden biridir. Malondialdehit kan ve idrarda belirir ve serbest radikal harabiyetinin belirteci olarak kullanılır. Lipid peroksidasyonu hücre membranının akışkanlığını değiştirir, konsantrasyon gradyanının dengesini bozar ve membran geçirgenliğini ve inflamasyonu artırır (2, 29, 39, 40, 41).

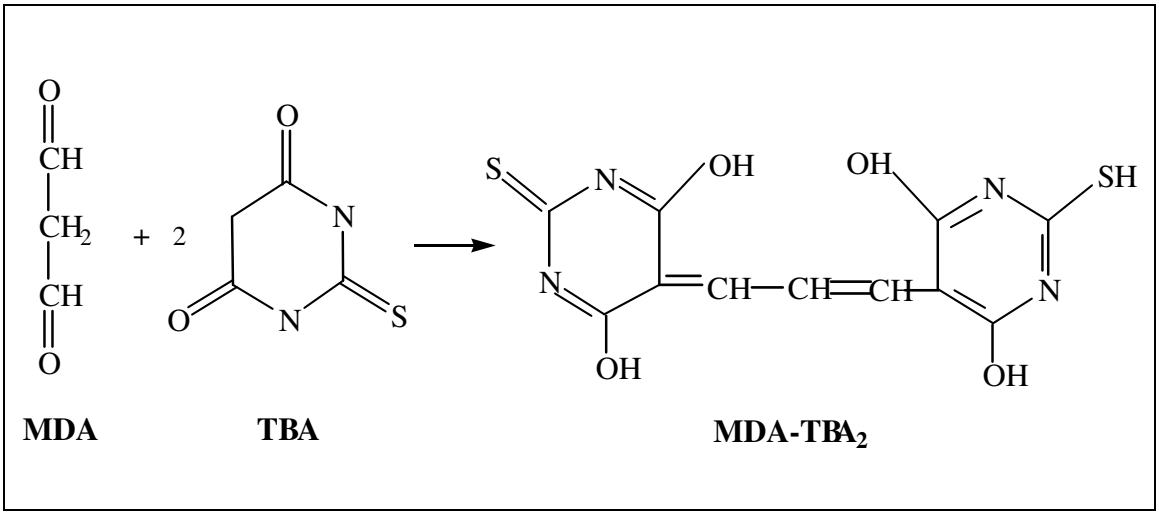


Şekil 2.4. Lipid peroksidasyonunun basamakları (42)

Lipid peroksidasyonu ya toplayıcı antioksidan reaksiyonlarla sonlandırılır ya da otokatalitik yayılma tepkimeleri ile devam eder. Lipid hidroperoksitlerinin membranlarda birikimi sonucu, membran fonksiyonları bozulur ve hücre kollabe olur. Lipit radikallerinin hidrofobik yapıda olması dolayısı ile reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerde meydana gelir. Peroksil radikalleri ve aldehitler, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur. Böylece membranlarda, reseptörleri ve membrana bağlı enzimleri inaktive etmek suretiyle membran proteinlerinde de ciddi hasarlar meydana getirebilirler. İyon transportunu etkileyebilirler. Plazma lipoproteinleri ve özellikle düşük dansiteli lipoproteinler de oksidasyona uğrayabilir. Okside lipoproteinler hücre fonksiyonlarının bozulmasına aracılık edebilirler (11).

Tiobarbitürik asit (TBA) ile MDA arasında 95 ^{o}C ve asidik ortamda gerçekleşen reaksiyonsonucunda MDA-TBA kompleksi oluşur. Bu ürün kolorimetrik (532-535 nm) veya florimetrik (eksitasyon 532 nm ve emisyon 535 nm) olarak ölçülebilmektedir.

MDA-TBA_2 oluşumu TBA' nın beşinci karbonuna ve MDA' nın birinci karbonuna nükleofilik ataklarla başlar bunu dehidratasyon ve ikinci TBA' nın benzer reaksiyonu izler, sonuç olarak pembe renkli bir kompleks oluşur. MDA-TBA kondansasyonu sonucu oluşan pembe rengin şiddeti lipid peroksidasyonunun derecesini gösterir. MDA ile TBA arasındaki reaksiyon **Şekil 2.5.** de gösterilmiştir. 2 molekül tiyobarbitürik asit (TBA), 2 molekül MDA ile asit ortamda kaynatıldığında birleşerek TBA-MDA kompleksini oluşturmaktadır (42).



Şekil 2.5. MDA ve TBA arasındaki reaksiyon sonucu MDA-TBA_2 oluşumu (42)

TBA-MDA reaksiyonunun hızı sıcaklık, pH ve TBA konsantrasyonuna bağlıdır. Maksimum renk şiddeti 60 dakika su banyosunda kaynatmakla elde edilir. Asidik ortamda reaksiyon hızı artmakta, TBA çözeltisi konsantrasyonunun 20 mM den 80 mM' e çıkarılması reaksiyon süresini 30 dakikadan yaklaşık olarak 5 dakikaya indirmektedir.

Bu metod kolay ve ucuz olmasına rağmen TBARS testi yıllardır çokça eleştiri almaktadır. En önemli problem metodun duyarlılığının ve özgünlüğünün eksikliğidir. TBA şekerler, aminoasitler, bilirubin ve albümin gibi çeşitli bileşiklerle tepkimeye girdiği için MDA' nın kolorimetrik ve florimetrik ölçümlerinde girişime neden olmaktadır. Bu yüzden TBARS testi oksidatif stresin temsilcisi olarak düşünülmemiştir. TBARS analizi MDA' ya özgü olmamasına rağmen bu metot lipid peroksidasyonunun genel belirteci olarak kullanılmaktadır, ama sonuçlar dikkat gerektirir (7, 42)

2.5.2. Proteinlere Etkileri ve Protein Oksidasyonu

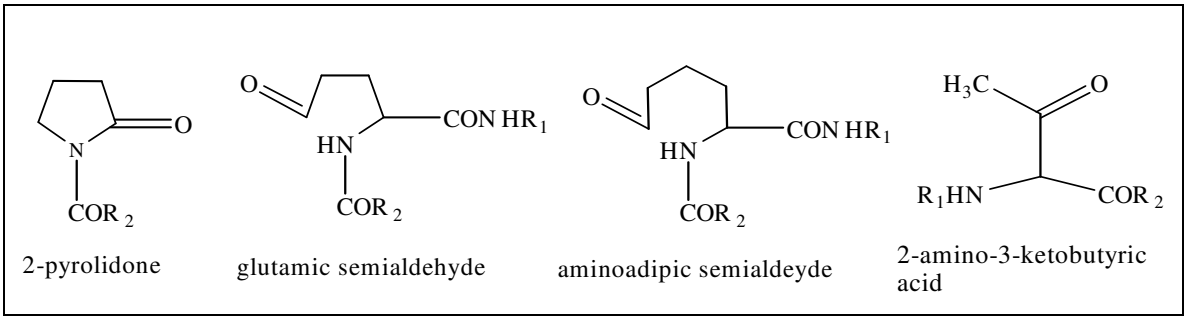
Proteinler biyolojik sistemlerde fazla miktarda bulundukları için oksidatif stresin önemli bir hedefidir. Protein oksidasyonu, reaktif oksijen türleri (ROS) ($OH^{\cdot}$, H_2O_2 gibi) ile direkt olarak veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyonu sonucu indirek olarak indüklenen, proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin üretimine neden olan tüm reaksiyonlar ve ajanlar protein oksidasyonuna yol açabilmektedir (43, 44, 45).

Protein oksidasyonunun biyokimyasal sonuçları enzim aktivitesindeki azalma, protein fonksiyonlarının kaybı, proteaz inhibitör aktivitenin kaybı, protein agregasyonu, proteolize artmış/azalmış yatkınlık, reseptör aracılı endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler, immünojen aktivitedeki artış olarak sıralanabilir (46).

Proteinler oksidanlara maruz kaldıklarında birçok kovalent değişikliğe uğrarlar. Bu değişikliklerden bazıları serbest radikallerin protein molekülleri üzerine direkt etkileri sonucu oluşabildiği gibi, bazıları da oksidasyon yan ürünlerinin proteinlere kovalent olarak bağlanması ile meydana gelir (11).

Reaktif karbonil gruplarının oluşumunda meydana gelen artış protein oksidasyonunun en önemli belirtecidir. Oksidatif stresle ilgili tüm olaylarda karbonil grubu artışı söz konusudur. Bundan dolayı, karbonil oluşumunun ölçülmesi proteinlerdeki serbest radikal hasarının belirlenmesinde en sık kullanılan ve en güvenilir metottur (26, 40, 43, 47).

Aminoasit yan zincirlerinin hidroksil veya karbonil derivelerine modifikasyonu, protein-protein çapraz bağlarının oluşumu ve polipeptid zincirlerinin fragmantasyonu proteinlerin oksidatif reaksiyonlarının muhtemel sonuçlarıdır. Bunlar arasında protein karbonil grubu içeriği genel bir indikatördür ve protein oksidasyonunun en yaygın kullanılan belirtecidir. Protein yan zincirleri oksitlendiği zaman karbonil grupları (aldehitler ve ketonlar) oluşmaktadır. Aşağıdaki şekilde aminoasit yan zincirlerinin direk oksidasyonu sonucu oluşan karbonil türevlerinin yapısı gösterilmiştir (**Şekil 2.6.**) (48).



Şekil 2.6. Aminoasit yan zincirlerinin direk oksidasyonu sonucu oluşan karbonil türevlerinin yapısı (48).

2.5.2.1. Protein Oksidasyonunun Başlıca Basamakları

Yirmi aminoasitten, protein oksidasyonu ile çok sayıda reaktif türevler ve stabil ürünler oluşur.

Proteinlerde yapısal değişikliğe yol açan başlıca mekanizmalar;

- ❖ Protein karbonil içeriğinin artmasına yol açan metal katalizli protein oksidasyonu,
- ❖ Protein tiol gruplarının (P-SH) kaybı,
- ❖ Nitrotirozin (NT) oluşumu,
- ❖ İleri protein oksidasyon ürünlerinin (AOPP) oluşumu olarak sıralanabilir (46, 49).

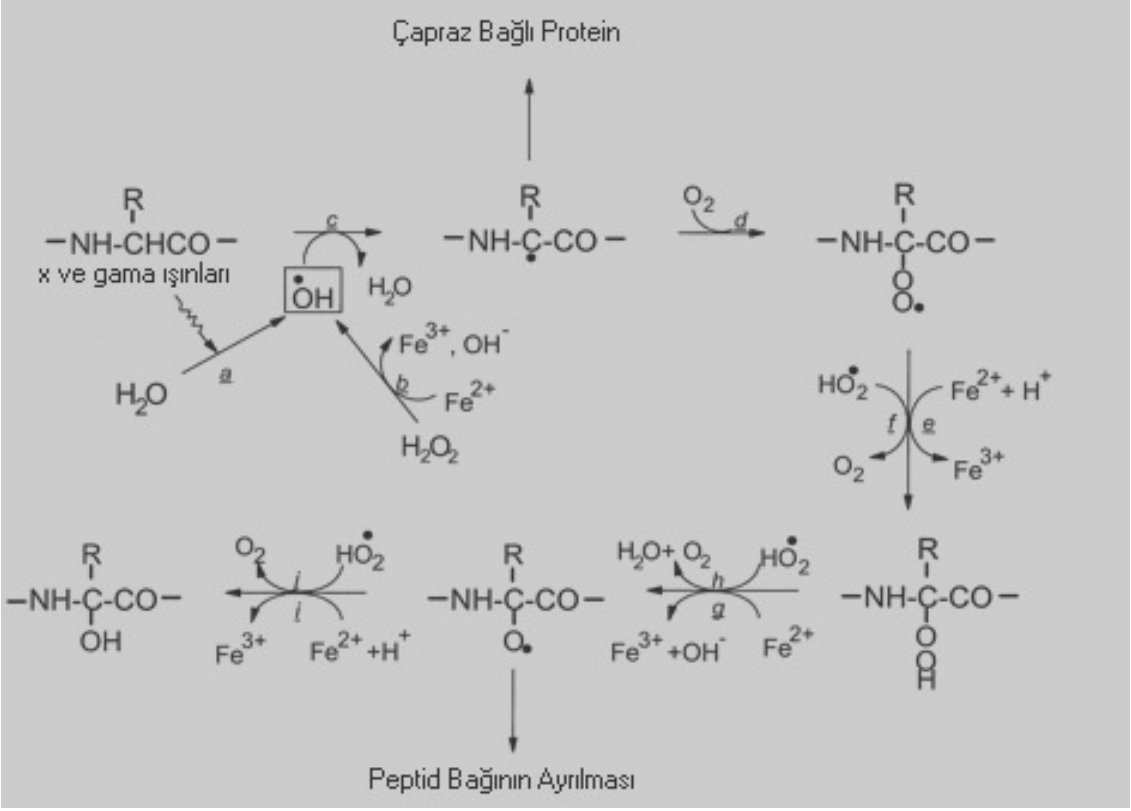
Reaktif türevlerin doğrudan proteinler (primer modifikasyon reaksiyonları), şekerler ve lipitlerle reaksiyona girmesi sonucunda oluşan ürünler, tekrar proteinler ile reaksiyona girerek sekonder modifikasyon reaksiyonlarına yol açmaktadır. Reaktif türevler ya peptit bağları ile yada amino asit yan zincirleri ile reaksiyona girer. Bu reaksiyonlar, redoks reaksiyonlarına giren demir ve bakır gibi metal katyonlardan etkilenir. Oksidatif modifikasyona uğramış proteinler ya düşük molekül ağırlıklı ürünlere ayrılır ya da çapraz bağlı yüksek molekül ağırlıklı ürünleri oluşturur. Proteinlerdeki oksidatif modifikasyonların sınıflandırılmasında bu özellikler esas alınsa da, genel olarak kabul edilmiş bir sınıflandırma sistemi mevcut değildir. Bununla birlikte proteinlerde modifikasyonlara yol açan reaksiyonların; oksidasyona ve peptit bağının ayrılmasına yol açan reaksiyonlar ve yan zincir modifikasyonuna yol açan reaksiyonlar olmak üzere iki grupta sınıflandırılmasının daha kolay bir sınıflandırma sistemi olacağı öne

sürülmektedir. Protein oksidasyonu esas olarak hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) ile başlar. Diğer taraftan oksidasyon sürecinde O_2 ile birlikte, süperoksit anyon radikali (O_2^{-}), ve sü peroksit radikalinin protonlanmış formu olan hidroperoksil ($HO_2^{\cdot}$)'in varlığı da gereklidir. Adı geçen bu reaktif oksijen türevleri aminoasitlerin yan zincirlerinin oksidasyonuna, protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna ve protein omurgasının oksidasyonu yolu ile protein fragmentasyonuna neden olur (46).

2.5.2.2. Protein Karbonil Türevlerinin Oluşumu

Aminoasitlerin α-karbon atomlarının veya –R yan zincirlerinin oksidatif modifikasyonuna ve bu modifikasyonun ardından oluşan protein karbonil türevlerinin artmasına yol açan primer modifikasyon reaksiyonları şekilde gösterilmiştir. Protein karbonil grupları protein oksidasyonunun en sık kullanılan belirteci olmakla beraber alzheimer, diabet, bağırsak iltihaplanması ve artrit gibi birçok hastalığın yanı sıra enflamasyon, fiziksel egzersiz ve iskemi reperfüzyon gibi durumlarda protein karbonil gruplarının birikimi artmaktadır (1, 48, 49).

Şekil 2.7. da gösterildiği gibi hidroksil radikali, polipeptid omurgasına oksidatif atak yaparak aminoasidin alfa hidrojen atomunu kendisine transfer eder ve karbon merkezli açil radikali oluşturarak zincirleme oksidasyon reaksiyonlarını başlatır (50).

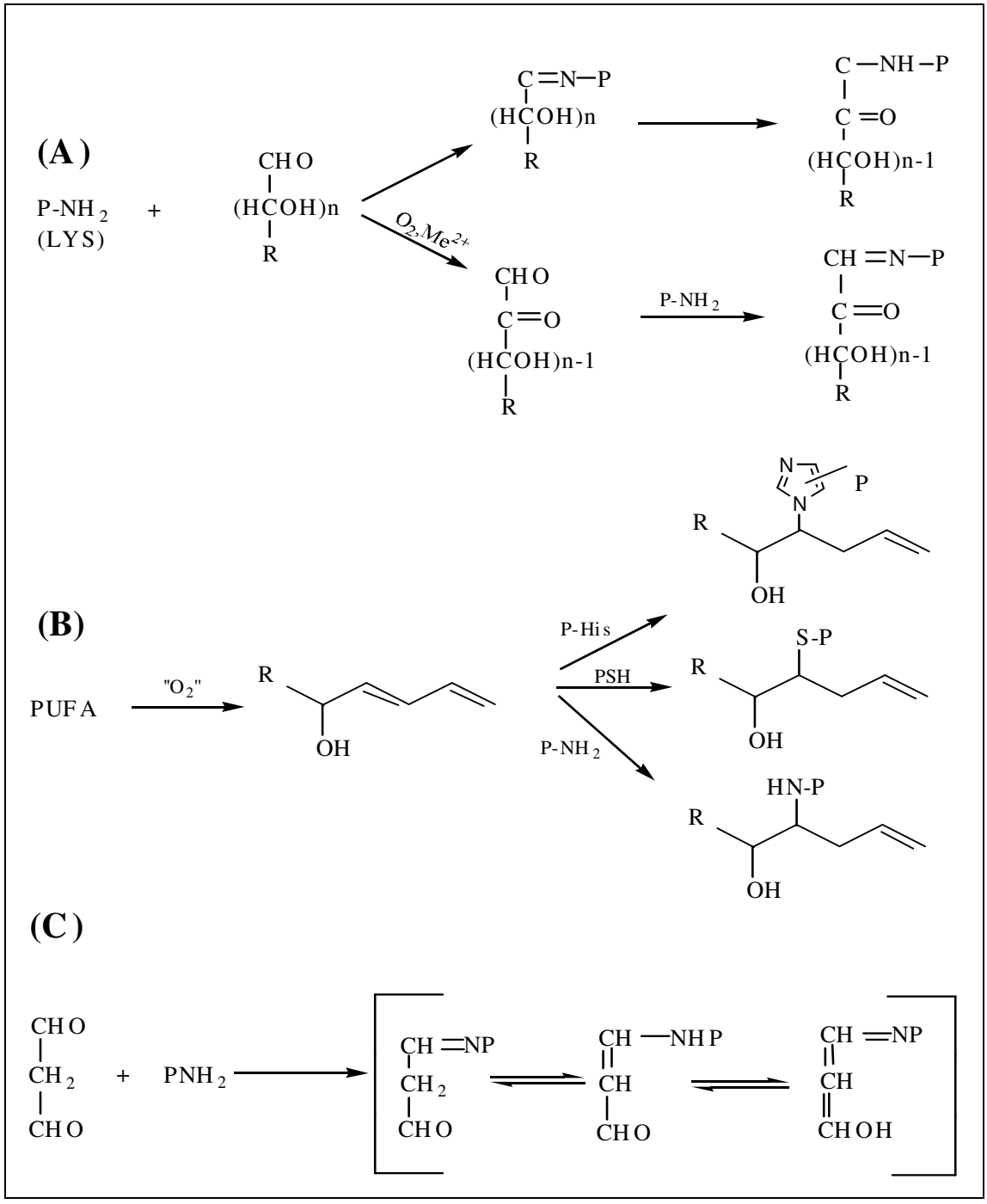


Şekil 2.7. Serbest oksijen radikal aracılı protein oksidasyonu (46).

Suyun radyolizi (x ve γ-ışınlarıyla) veya H_2O_2' in metal katalizli yıkımı sonucunda $OH^{\cdot}$ radikali açığa çıkar **(Şekil 2.7. reaksiyon a ve b)**. Polipeptid omurgasındaki α-karbon atomunun $OH^{\cdot}$ radikali ile reaksiyonu sonucu α-hidrojen atomunun ayrılması ile amino asit bakiyesi karbon merkezli radikal haline dönüşür (Şekil 2.7. reaksiyon c). Oluşan karbon merkezli radikal moleküler oksijen (O_2) ile hızla bir şekilde reaksiyona girer ve (reaksiyon d) daha sonra alkil peroksidi verecek olan alkilperoksil radikal ara ürününü oluşturur. Alkoksil radikalinin oluşumu (Şekil, reaksiyon g ve h) peptid bağının diamid veya α - amidasyon metabolik yolları ile ayrılmasına neden olmaktadır. Diamid metabolik yoluyla ayrılma sonucunda, N terminal bölgeden türevlenen peptid fragmentinin C terminal kısmında diamid, C terminal bölgeden türevlenen peptid fragmentinin ise N terminal kısmında izosiyanat yapısı görülür. α-amidasyon metabolik yolunda N terminal bölgeden türevlenen C terminalde amid, C terminal bölgeden türevlenen N terminalde ise N- α- ketoaçil yapısına sahip peptid fragmentleri oluşmaktadır. Alkilperoksit, alkoksil radikali (reaksiyon h) üzerinden hidroksi protein türevini vermektedir (reaksiyon j). Önemli bir şekilde, reaksiyon basamaklarının pek

çoğunda Fe^{+2} ve Cu^{+} varlığında $HO_2^{\cdot}$ ile etkileşim görülmektedir (reaksiyon e,g,i). Bu metabolik yolda oluşan alkil, alkilperoksil ve alkoksil radikal ara ürünleri aynı veya farklı protein molekülündeki R yan zincirleri ile reakiyona girerek yeni karbon merkezli radikallerin oluşumuna yol açmakta ve reaksiyonlar tekrarlanmaktadır. Oluşan karbon merkezli radikal oksijen yokluğunda, diğer bir karbon merkezli radikal ile etkileşerek protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna yol açmaktadır (reaksiyon d) (46, 50).

Buna ek olarak, proteinlerdeki karbonil grupları, lipid peroksidasyonu sırasında üretilmiş aldehidlerle (4-hidroksi-2-nonenal, malondialdehid) ilişki nedeniyle de oluşabilir (**Şekil 2.8. A**). Veya proteinlerle indirgenmiş sekerlerin reaksiyonlarının veya onların lizin rezidülerinin oksidasyon ürünleri (glikasyon ve glikoksidasyon reaksiyonları) ile reaksiyonları sonucu karbonil türevleri (ketoaminler, ketoaldehidler, deoksiozonlar) oluşabilir. (**Şekil 2.8. B**). Ayrıca proteinlerde x, γ ışınları ve metal katalizli oksidasyona bağlı reaksiyonlarla karbonil grupları oluşabilmektedir (49).



Şekil 2.8. Glikasyon, glioksidasyon ve poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) peroksidasyon ürünleri ile proteinlerin reaksiyonları sonucu, protein karbonil gruplarının oluşumu. A. Protein lizil amino gruplarıyla ($P\text{-}NH_2$) şekerlerin reaksiyonu. B. Protein lizin ($P\text{-}NH_2$), histidin (P-his) veya sistein (PSH) rezidülerine 4-hidroksi-2-nonenal'ın Michael reaksiyonu ile eklenmesi. C. Lipid peroksidasyon ürünleriyle, malondialdehid ve protein amino gruplarının (PNH_2) reaksiyonu (50).

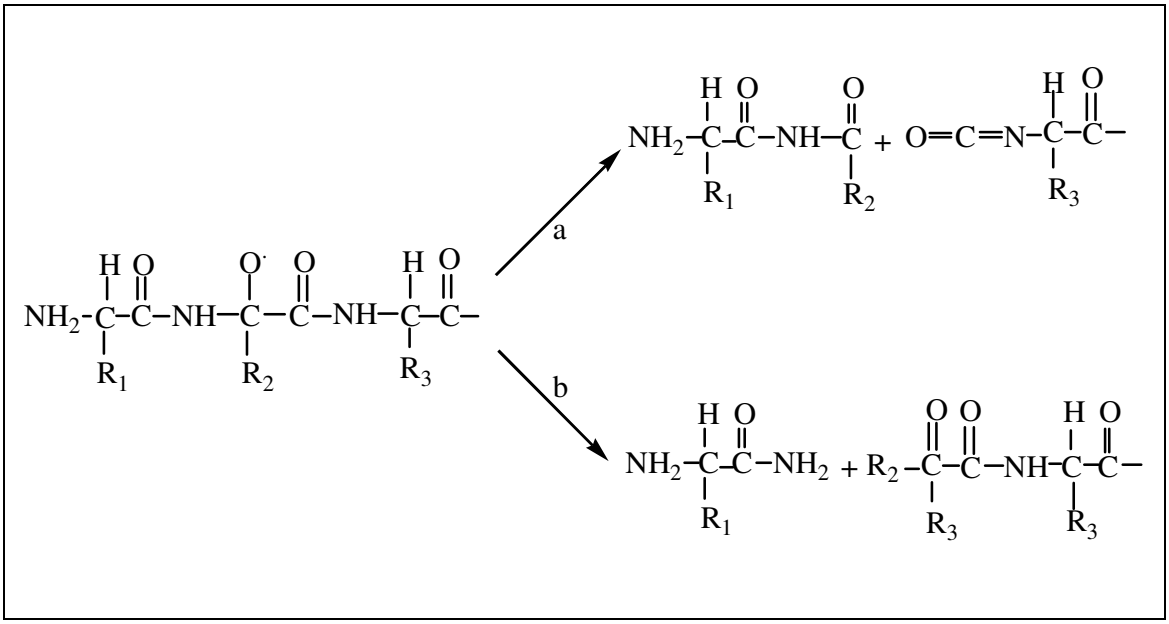
Tablo 2.2. de oksidasyona duyarlı bazı aminoasitler ve oksidasyon ürünleri gösterilmiştir. Bununla birlikte tabloda görüldüğü gibi, lizin, arginin, prolin direk oksidasyon ile karbonil türevlerini vermektedir (50).

Tablo 2.2. Oksidasyona yatkın olan aminoasitler ve oksidasyon ürünleri (50)

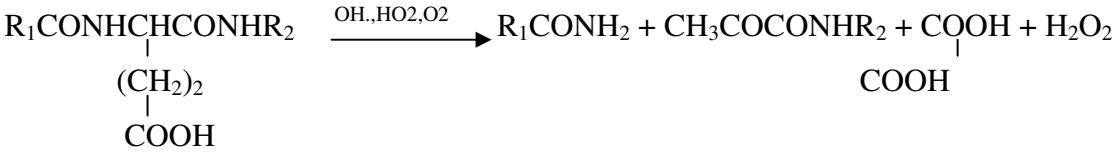
Aminoasit	**Oksidasyon ürünleri**
Sistein	Disülfitler, sisteik asit
Metionin	Metionin sülfoksit, metionin sülfon
Triptofan	2-,4-,5-,6- ve 7-Hidroksitriptofan, nitrotriptofan, kinürenin, formil ve hidroksikinürenin
Feninalanin	2,3-Dihidroksifenilalanin, 2-3-, ve 4-hidroksifenilalanin
Tirozin	3,4-Dihidroksifenilalanin, tirozin-tirozin çapraz bağları, Tyr-O-Tyr, çapraz bağlı nitrotirozin
Histidin	2-Oksohistidin, asparagin, aspartik asit
Arginin	Glutamik semialdehit
Lizin	α-Aminoadipik semialdehit
Prolin	2-Pirrolidon, 4- ve 5-Hidroksiprolin, piroglutamik asit, glutamik semialdehit
Treonin	2-Amino -3-ketobütirik asit
Glutamil	Okzalik asit, pirüvik asit

2.5.2.3. Protein Fragmantasyonu

Proteinlerin oksidatif kırılımı, ya α-amidasyon yolu (**Şekil 2.9.**) ya da reaksiyonda gösterildiği gibi glutamil yan zincirinin oksidasyonu ile bir peptidin oluşumuna neden olur. Peptidin N-terminal aminoasidi bir α -ketoaçil türeviyle bloklanır.

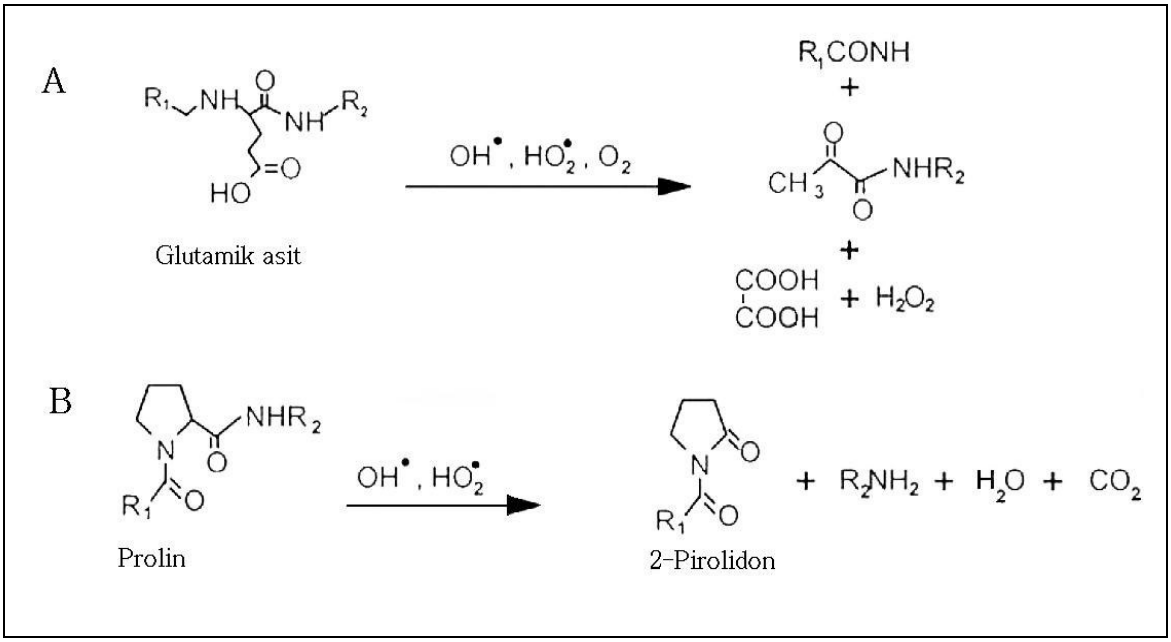


Şekil 2.9. Diamid (a) ve α-amidasyon (b) yolu ile peptid bağının ayrılması (50)



Diamid yolundaki kırılmaya bağlı olarak **(Şekil 2.9.a)**, C-terminal ucundaki diamid yapısı proteinin N-terminal kısmıyla birleşir ve peptid fragmenti oluşur. Buna karsın, α-amidasyon yolunda **(Şekil 2.9.b)**, C terminal ucundaki amid grubu ile N-terminal ucu birleşir, peptid oluşur. Fragmentin asit hidrolizine bağlı olarak diamid yolunda CO_2, NH_3 ve serbest karboksilik asit oluşur, α-amidasyon yolunda ise fragment hidrolizi ile NH_3 ve serbest α-ketokarboksilik asit oluşur.

Glutamil, aspartil ve prolil yan zincirlerine ROS atağının sonucu peptid bağ kırılımı meydana gelebilir. Glutamil rezidülerinin α-karbon atomundan bir hidrojenin $OH^{\cdot}$ bağımlı abstraksiyonu **(Şekil 2.10. A)**' da gösterilmiştir. Bu görüşler doğrultusunda protein radyolizisi sırasında oluşan peptidlerin sayısı yaklaşık olarak prolil rezidülerine eşittir. Prolil rezidülerinin oksidasyonu peptid bağ kırılımına yol açar. **(Şekil 2.10. B)**' de 2-pirolidon'un asit hidrolizi ile 4-aminobütirik asit oluşturduğu gösterilmiştir. 4-aminobütirik asit'in varlığı ise prolin oksidasyonu yolu tarafından meydana gelen peptid bağ kırılımı için önemli bir kanıttır (49).



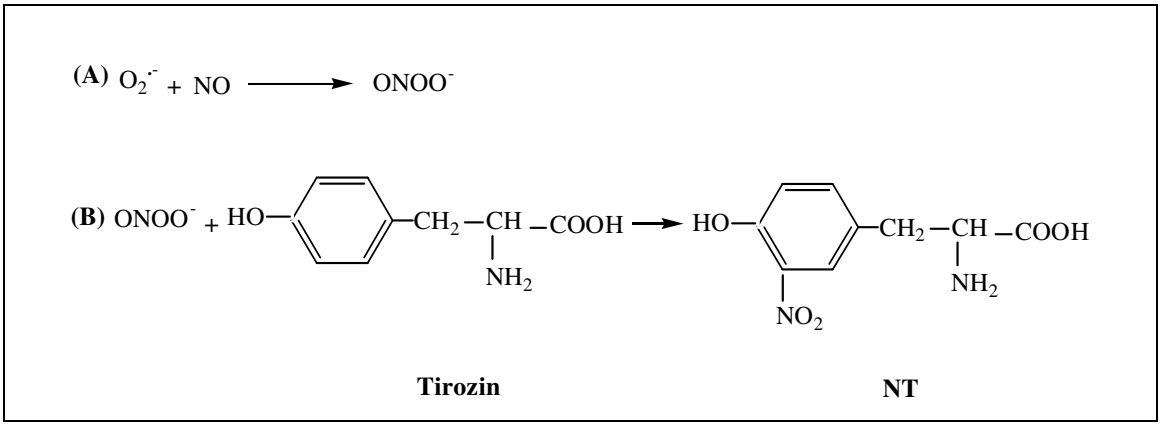
Şekil 2.10. Glutamik asit ve prolin rezidülerinde hidroksil radikali atağı sonucunda oluşan peptid fragmantasyonu (49)

2.5.2.4. Tiyol Gruplarının Oksidasyonu

Proteinlerdeki tiol gruplarının (-SH) serbest radikaller tarafından oksidasyona uğradığı bilinmektedir. Sisteindeki –SH grubunun oksidasyona yatkın olması nedeniyle, buna denk -SH grubundan değişik mekanizmalarla tiil radikali (-S˙) oluşur ve sonuç olarak disülfid bağları meydana gelir. Bu ise radikal aracılı protein oksidasyonunun en önemli belirtisidir (49).

2.5.2.5. Nitrotirozin Oluşumu

Nitrotirozin (NT) oluşumu protein oksidasyonuna yol açan moleküler mekanizmalardan biridir. Perokisinitrit ($ONOO^-$), nitrik oksidin (NO), $O_2^{\cdot-}$ ile in vivo reaksiyonu sonucunda oluşan sitotoksik bir türevdir. Nitrotirozin oluşumu **(Şekil 2.11.)** reaksiyon (A) ve (B)'de görülmektedir.



Şekil 2.11. Nitrotirozin oluşumu (46).

Peroksinitrit oluşumu oksidatif protein hasarının hem ortaya çıkışına, hem de ilerlemesine sebep olmaktadır. $ONOO^-$'in proteinler üzerine atağının ana ürünü tirozinin *orto* pozisyonunda nitrolanmasıdır, bu da nitrotirozin oluşumuna yol açar (46).

2.5.2.6. İleri Oksidasyon Protein Ürünleri

Son zamanlarda protein oksidasyonunun yeni bir marker'ı olan ileri oksidasyon protein ürünleri (Advanced Oxidation Protein Products-AOPP) çeşitli araştırmacıların dikkatini çekmeye başlamıştır. İleri oksidasyon protein ürünleri, ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak bilinmektedir. İleri oksidasyon protein ürünlerinin tayini, protein oksidasyonunun derecesini belirlemekte kullanılır (46, 49).

2.5.3. Karbonhidratlar Üzerine Etkisi

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Glukoz otooksidasyonu, taşıyıcı metallerin katalizlediği reaksiyonlar sonucunda glukozun kısmen radikal olan anyonları oluşturması ile meydana gelir. Bu radikaller, daha sonra O_2'i indirgeyerek $O_2^{\cdot-}$ anyonunu meydana getirirler. Bu da diğer ROS' larin oluşumunu tetikler.

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucunda H_2O_2, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelir. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı çeşitli hastalıkların patolojisinde önemli rol oynarlar (11).

2.5.4. Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Etkileri

Oksidatif stres, yaşlılık, sigara, hipertansiyon, hiperlipidemi ve şeker hastalığı gibi birçok endojen ve eksojen faktör DNA hasarına neden olmakta buna karşılık mevcut antioksidan sistemler DNA hasarını önlemektedir. Yoğun egzersizin DNA hasarını artırdığı gösterilmiştir (51). Reaktif oksijen türlerinin DNA sarmalının parçalanmasına ve baz tamir sisteminde hasara neden oldukları bilinmektedir. DNA'nın her parçası reaktif oksijen türlerinin saldırısına karşı hassastır (7). Oksijenden türeyen serbest radikaller DNA harabiyetinin de önemli bir kaynağıdır. Özellikle hidroksil radikali olmak üzere bir çok reaktif oksijen türü (ROS), DNA da farklı mekanizmalar ile pürin ve pirimidin bazlarının kimyasal yapısında değişiklik yapma, tek veya çift zincir kırıkları, abazik bölgelerin oluşması, DNA-protein çapraz bağlanması ve DNA üzerinde baz ve şeker modifikasyonları oluşturma gibi oksidatif hasar verebilme yeteneğine sahiptir. Reaktif oksijen türleri DNA'da 20'den fazla oksidatif baz hasar ürününün oluşmasına yol açar. İnsan idrarında 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG)**,** 8-hidroksi-adenin ve 7-metil-8-hidroksiguanin gibi birçok DNA baz hasar belirteci belirlenmiş olmasına rağmen bu hasara uğrayan bazlar arasında 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) oldukça duyarlı ve en sık karşılaşılan oksidatif DNA hasarı belirtecidir (23, 29, 53, 54).

2.6. ANTİOKSİDAN SAVUNMA MEKANİZMALARI

Hücreler metabolik süreçlerinin bir parçası olarak devamlı serbest radikal ve reaktif oksijen türleri üretirler (8, 26). Vücudumuzda reaktif oksijen türlerine karşı birçok antioksidatif sistem bulunmaktadır (55). Bu antioksidan sistem organizmaları serbest radikallerin zararlı etkilerinden korumak için kullanılır. Antioksidan savunma sistemleri enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar şeklinde sınıflandırılmaktadır. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar **(Tablo 2.3.)** de gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Enzimatik ve Enzimatik Olmayan Antioksidanlar (34).

EnzimatikAntioksidanlar	
Süperoksit dismutaz(SOD)	O^{-}_{2} radikalini katalitik olarak uzaklaştırır.
Katalaz (CAT)	Yüksek konsantrasyonlardaki H_2O_2‘ yi ortadan kaldırır.
Gulutatyon (GPx)	H_2O_2 düzeyi düşük miktarda ise GPx tarafından katalizlenir. Ayrıca organik hidroperoksitleri ortamdan uzaklaştırır.
Glutatyon Peroksidaz(GSH)	GPx için substrat olup tek oksijen OH, H_2O_2, lipit peroksitlerin ortadan kaldırılmasında etkilidir.
Sitokrom oksidaz (Sit 0)	O_2 oksijen taşıma zinciri içinde suya indirgenirken elektron kaçaklarını önleyerek O_2^-, H_2O_2, OH salınımını engeller.
Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	
Transferrin	Her bir molekül başına iki adet Fe^{+3} bağlar.
Laktoferrin	Her bir molekül başına iki adet Fe^{+3} ü düşük pH’ da bağlar.
Haptoglobulin	Hemoglobini bağlar.
Hemopeksin	Hemi bağlar.
Albumin	Bakırı ve Hemi bağlar.
Seruloplazmin	Ferroksidaz aktivitesini gösterir. Cu iyonlarını non-pasifik olarak bağlar. O_2^- radikalini temizler.
EC-SOD	Katalitik olarak O_2^- radikalini uzaklaştırır.
EC-GSHPx	H_2O_2 ve hidroperoksitleri katalitik olarak uzaklaştırır.
Bilirubin	Peroksil radikalini temizler (< 0,09µmol/L)
Ürat	Radikal temizleyicisi ve metal bağlayıcısı (0,08µmol/L)
Glukoz	$OH^{\cdot}$ radikalini temizler (4-6µmol/L)
Askorbik asit	$OH^{\cdot}$ radikalini temizler (65 µmol/L)
Eritrositler	H_2O_2‘ yi difüzyon ile O_2^- ise anyon kanalı ile eritrosit içine alır. Bu moleküller burada bulunan SOD ve enzimleri ile uzaklaştırılır.

Tablo 2.3. de belirtildiği üzere birçok antioksidan bulunmasına rağmen biz aşağıda tek tek açıkladığımız enzimatik antioksidanlar üzerinde yoğunlaşacağız.

2.6.1.Enzimatik Antioksidanlar

2.6.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz, süperoksit radikallerine karşı temel savunmadır ve oksidatif strese karşı ilk savunma hattını oluşturur. SOD, $O_2^{\cdot -}$ dismutasyonunu katalizleyerek süperoksitin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. Enzimin süperoksit radikalinin dismutasyon tepkimesi aşağıdaki gibidir (28, 32, 56, 57).

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2^-$$

Süperoksit dismutaz birkaç izoform halinde bulunmaktadır ki bu izoformlarda aktif metal bölgesi, aminoasit kompozisyonu, ko-faktörler ve diğer özellikler açısından farklılıklar bulunmaktadır. İnsanlarda SOD, sitozolik Cu, Zn-SOD, mitokondriyal Mn-SOD ve ekstrasellüler SOD olmak üzere üç izoenzim halinde bulunmaktadır. SOD izoformlarının dağılımı dokudan dokuya farklılık gösterir. Bu izoformlardan ilk ikisi hücre içerisinde değişik yerleşim gösterirler. Cu, Zn-SOD sitozolde ve nükleus da bulunurken, Mn-SOD mitokondri de bulunur, ancak ekstrasellüler alana da yayılabilir (27, 33, 44, 58).

Cu, Zn-SOD un molekül ağırlığı yaklaşık olarak 32000 kDa dur ve birbirinin aynı olan iki protein alt biriminden oluşur. İkiside katalitik olarak aktif bakır ve çinko atomu içerir. Her subünitede bir Cu atomu, bir Zn atomu, bir zincir içi disülfür köprüsü, bir sülfidril grubu ve bir asetilenmiş terminal amino grubu bulunduğu tespit edilmiştir. Çinkonun stabiliteyi sağladığı bakırın ise aktiviteden sorumlu olduğu düşünülmektedir.

Mn-SOD un molekül ağırlığı yaklaşık 40000 kDa dur ve dört protein alt biriminden oluşur, bu alt birimlerin her biri muhtemelen yalnızca mangan atomu içerir ve tetramerik yapıdadır. Ayrıca Mn-SOD un protein alt birimlerinin aminoasit dizilimi Cu, Zn-SOD un aminoasit diziliminden tamamen farklıdır. Aynı tepkimeyi katalizlemeleri dışında Mn-SOD ile Cu, Zn SOD arasında hiçbir ortak yapısal özellik yoktur.

Ekstrasellüler SOD sadece fibroblast ve endotelyal hücrelerinde dâhil olduğu birkaç hücre tipinde sentezlenir ve vasküler tonusun düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Ayrıca SOD enzim aktivitesinde yaşlanmaya bağlı bir azalma olmaktadır.

SOD enziminin canlılardaki dağılımı katalaz ile birlikte incelenmelidir. Çünkü SOD ile katalizlenen tepkime sonunda oluşan ürün, oksijenin toksik ürünlerinden biridir ve katalaz tarafından birikimi önlenmektedir (11, 58).

2.6.1.2. Katalaz (KAT)

Katalaz başlıca peroksizom veya mikroperoksizomlarda bulunan, hidrojen peroksiti su ve oksijene parçalayan ve demir içeren homotetramerik antioksidan bir enzimdir (20, 44).

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{\text{Katalaz}} 2H_2O + O_2$$

Katalaz, her biri bir hem grubu ve bir molekül NADPH içeren dört protein alt biriminden oluşur (58).

Katalazın molekül ağırlığı 240 kDa dur ve hücre içerisinde geniş bir dağılım gösterir. Demir (Fe^{+3}), enzimin aktif bölgesine bağlanması gereken bir kofaktördür (28).

Bu antioksidan enzim hücre içerisinde geniş bir şekilde yayılmıştır ancak başlıca mitokondri ve peroksizomlarda aktivite gösterir. Dokularda ise kan, kemik iliği, mukoz membranlar, karaciğer ve böbreklerde yüksek miktarda bulunmaktadır. En yüksek aktivite yüksek peroksizomal içeriğe sahip dokularda (böbrek ve karaciğer) bulunur (26, 29, 58).

Birçok memeli hücresinde bulunan katalaz, genellikle sitoplâzmada bulunmadığı için büyük ölçüde peroksizomlardaki hidrojen peroksiti etkisiz hale getirir. Sitoplazmik hidrojen peroksit ise büyük ölçüde glutatyon peroksidaz tarafından etkisiz hale getirilir (56).

Katalaz ve glutatyon peroksidaz aynı fonksiyona sahip fakat substrat olan H_2O_2' ye farklı afinite gösteren enzimlerdir. Memeli glutatyon peroksidazı, katalaz ile karşılaştırıldığında düşük konsantrasyonlarda bile H_2O_2' ye daha yüksek afinite göstermektedir (11).

2.6.1.3. Glutatyon peroksidaz (GPx)

Antioksidan enzimlerden katalaz ve glutatyon peroksidaz H_2O_2 nin detoksifikasyonundan sorumlu en önemli enzimlerdir (59, 60). Hem glutatyon peroksidaz hem de katalaz hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüşümünü katalizlerler, ancak glutatyon peroksidaz H_2O_2 nin uzaklaştırılmasında katalaza göre daha önemli göreve sahiptir. Çünkü katalaz, daha çok peroksizomlarda bulunurken glutatyon

peroksidaz mitokondri ve sitozolde bulunmaktadır. GPx, lipid peroksidasyonu sonucu oluşan hasarın onarılmasında rol almaktadır. Membranlardan lipid peroksitleri uzaklaştırabilen benzer enzimler gibi glutatyon peroksidaz katalitik fonksiyon için aktif bölgesinde selenyum içerir (19, 23, 57, 58).

GPx‘ in selenyuma bağımlı ve selenyuma bağımsız olmak üzere iki ayrı formu bulunmaktadır. Selenyuma bağımlı grupta hidrojen peroksit ve diğer organik peroksitleri indirgeyen beş üye vardır, selenyuma bağımsız glutatyon peroksidaz ise hidrojenperoksit ile ihmal edilebilir bir aktifliğe sahip olup sadece organik hidroperoksitleri redükler (27).

Memelilerde farklı genler tarafından kodlanan GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 ve GPx5 olmak üzere beş çeşit GPx izoenzimi bulunmaktadır. Her dokuda bulunmalarına karşın, her izoformun miktarı doku tipine göre değişir. Bunlardan ilk üçü tetramerik, GPx4, monomerik ve GPx5 dimerik yapıdadır. Bu GPx izoenzimlerinin hepsi indirgenmiş glutatyon (GSH)’ ı kullanarak H_2O_2’yi veya organik hidroperoksitleri su (H_2O) ve alkol (ROH)’e çevirir. Bunun sonucunda redükte glutatyon (GSH), okside glutatyon (GSSG)’a yükseltgenir. Bu tepkimelerde iki glutatyon molekülü tek bir glutatyon disülfid yapmak üzere okside edilir ve indirgeyici güçlerini yitirirler (**Şekil 2.12.**) (28, 29, 58).

$$2GSH + H_2O_2 \xrightarrow{GPx} GSSG + 2H_2O$$

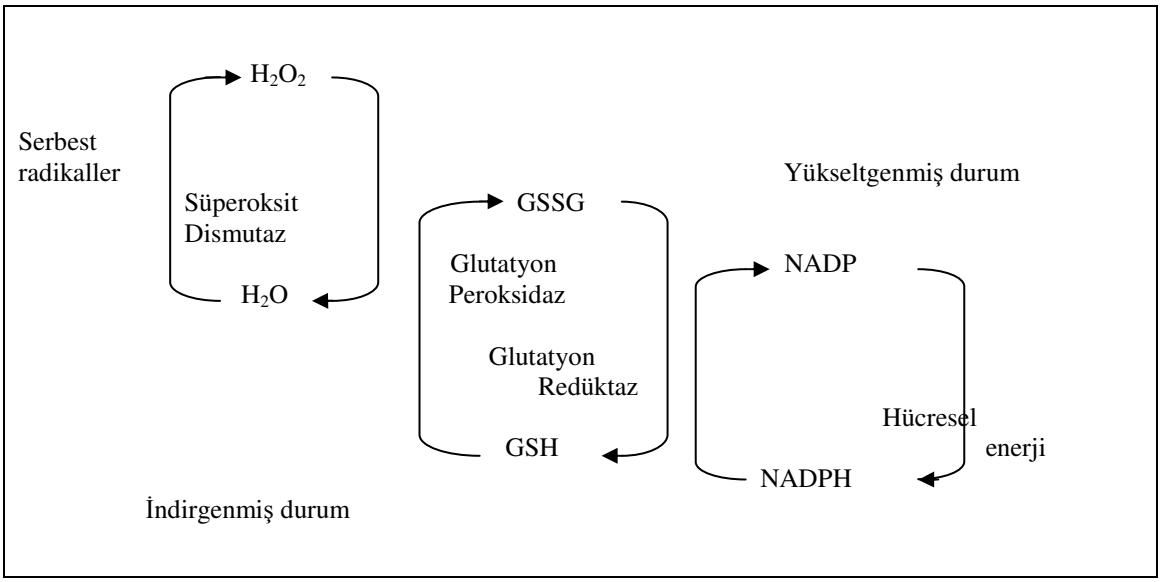
$$2GSH + ROOH \xrightarrow{GPx} GSSG + ROH + H_2O$$

Bütün izoenzimlerin katalizlediği reaksiyonlar aynı görünmesine rağmen, izoenzimler kullandıkları substrat ve hücresel yerleşim bakımından farklılık gösterir. GPx1, sitozol ve mitokondride, GPx2, sitozolde, GPx3, ekstrasellüler alanda ve sitozolde, GPx4, nükleus ve mitokondride ve GPx5, ekstrasellüler alanda bulunur (28).

Glutatyon peroksidaz sistemi, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz enzimi, glutatyon (GSH) ve nikotinamid adenozin dinükleotid fosfat (NADPH) olmak üzere birkaç bileşenden oluşur (20).

GPx' in izoenzimlerinden birçoğu elektron sağlayıcısı olarak GSH' a ihtiyaç duyar. Enzimin aktivitesi sürekli olarak indirgenmiş glutatyon (GSH) sağlanmasına bağlıdır. GSH, GPx tarafından okside edildiği için hücreler GSH'ı tekrar üretebilme yollarına sahip olmalıdırlar. Okside GSSG, glutatyon redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyonla tekrar redükte hale (GSH) dönüşür. Reaksiyonun gerçekleşmesi için NADPH' a ihtiyaç vardır. Birçok doku glukoz-6- fosfat dehidrojenaz enzimini kullanarak pentoz fosfat yoluyla NADPH üretir (28, 58).

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



Şekil 2.12. Glutatyon döngüsü. Glutatyon (GSH) glutatyon disülfite (GSSG) oksitlenirken su (H_2O) hidrojen peroksite (H_2O_2) redüklenir (26).

2.7. PİNEAL BEZ VE MELATONİN

Epifiz bezi olarak da bilinen pineal bez, beyinde bulunan önemli bir nöroendokrin organdır. Pineal bez insan beyninde hipotalamusun dorsal yüzeyinde, iki serebral yarım kürenin arasında merkezi bir pozisyonda yerleşim gösterir. Dış çevrenin ışık veya karanlık olmasına göre organizmada başta endokrin sistem olmak üzere birçok sistemin fonksiyonunu düzenler ve hipotalamusta bulunan suprakiyazmatik nükleus (SCN) ile birlikte bir biyolojik saat gibi fonksiyon yapar. Güçlü bir antioksidan olan melatonin pineal bezin salgıladığı ana hormondur. Pineal bez sirkadiyan bir ritimde ve karanlıkta

salgıladığı melatonin hormonu vasıtasıyla vücudun diğer kısımlarına zaman sinyalleri gönderir. Böylece, günün ve yılın farklı zamanlarına bağlı fizyolojik siklusların düzenlenmesinde görev alır (12, 13, 16).

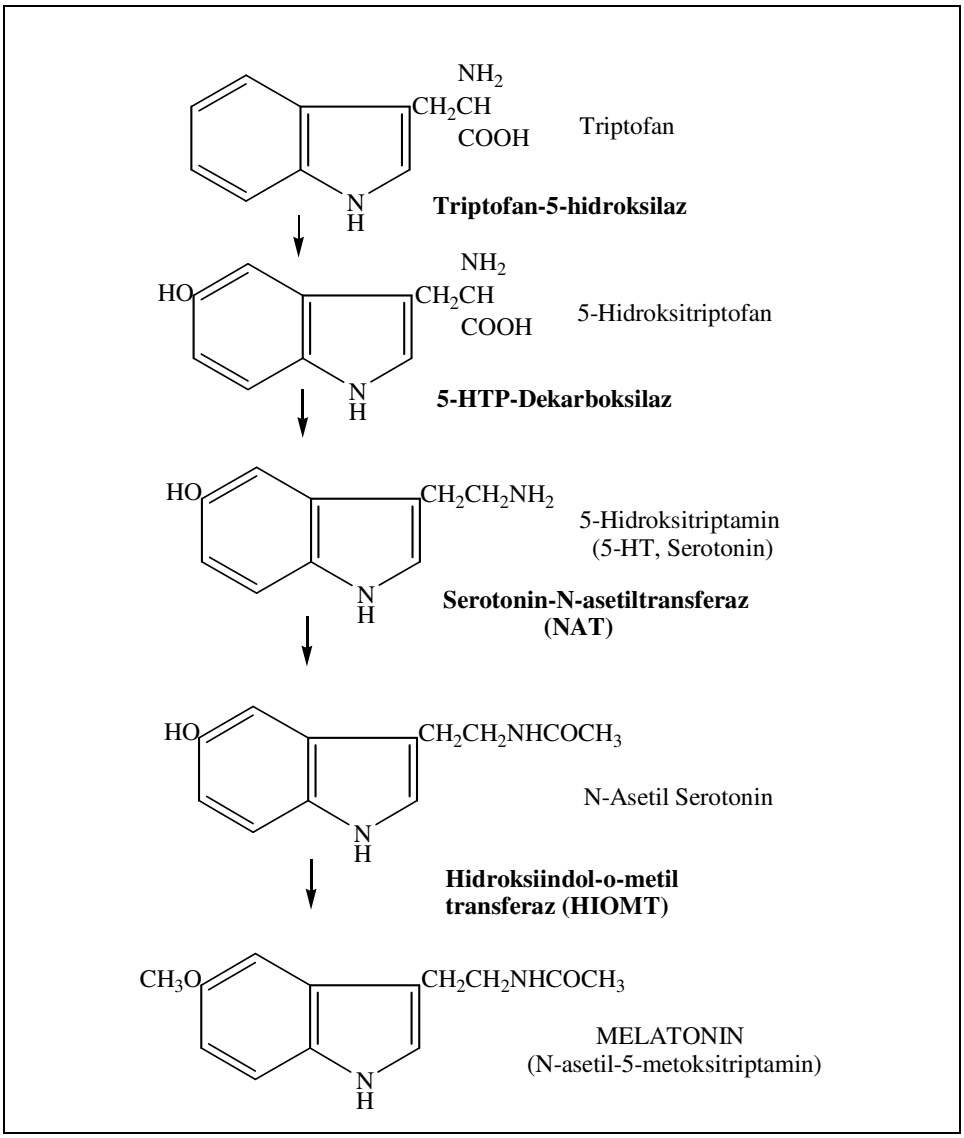
Bugün melatoninin, ruhsal durumun sıkı bir düzenleyicisi, uyku, retinal fizyoloji, seksüel davranışlar, mevsimsel üreme fizyolojisi ve üreme davranışları, sirkadiyan ritimler ve immünolojik fonksiyonda güçlü bir biyolojik modülatör olduğu bilinmektedir. Ayrıca, yaşlanma ve yaşla ilgili süreçlerde ve hastalık durumlarındaki etkisini gösteren deneysel çalışmalar onun güçlü bir antioksidan olduğunu ileri sürmektedir. Çeşitli deneysel çalışmalarda oksidatif stresi ve lipid peroksidasyonunu azalttığı bildirilmiştir. Melatonin, lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonlarını kırmada C vitamini ve α-tokoferol den 10 kat daha güçlü etkiye sahiptir (12, 16, 61, 62).

2.7.1. Melatonin Sentezi ve Salınımı

Melatonin, pineal bezin yanı sıra retina, bağırsak, mononükleer lökositler gibi diğer organ ve dokular tarafından da seratoninden sentezlenir. Bununla birlikte kandaki melatonin konsantrasyonunun önemli bir kısmı pineal bezden kaynaklanmaktadır. Pineal bezin çıkarılması ile dolaşımdaki MEL düzeyleri azalmakta ancak tamamen yok olmamaktadır. Diffuz nöroendokrin sisteminin bir kısmı olan APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation) hücrelerinde, gastrointestinal kanaldaki enterokromaffin (EC) hücrelerinde küçümsenmeyecek düzeyde MEL sentezi olmaktadır. Ayrıca solunum yolları, karaciğer, böbrek, adrenal bezler, timus, tiroit, plasenta, mast hücreleri gibi nöroendokrin karakterde olmayan hücrelerde ve natural killer (NK) hücreler ile eozinofilik lökositlerde de tespit edilmiştir. İnsanlardaki melatonin salınımı gece 02:00-04:00 saatleri arasında maksimum düzeydedir, gecenin ikinci yarısı dereceli olarak düşmeye başlar (13, 63, 65).

Melatonin ya da N-asetil-5-metoksitriptamin, biyolojik bir amindir. MEL sentezinin başlangıç maddesi, pineal bez tarafından plazmadan alınan ve bir indol aminoasidi olan triptofan'dır. İlk önce triptofan, pinealositlerde, triptofan-5- hidroksilaz enzimi yardımıyla 5-hidroksitriptofan'a hidroksillenir. 5-hidroksiriptofan, aromatik-L-aminoasit dekarboksilaz (dopa dekarboksilaz) enzimi ile 5-hidroksitriptamin (serotonin)'e dekarboksillenir. Serotonin, seratonin N-asiltransferaz olarak da bilinen N-asetil transferaz (NAT) enzimi ile N-asetil serotonin'e ve bu da, hidroksiindol-0 metil

transferaz (HIOMT) enzimi etkisiyle melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin)'e dönüşür (**Şekil 2.13.**) (12, 14).



Şekil 2.13. Melatonin sentezi (13)

2.7.2. Melatoninin Takviyesinin Serbest Radikal Giderici Etkisi

MEL' in bir antioksidan olduğu, literatürde ilk kez 1991 yılında öne sürülmüş ve daha sonra yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarla desteklenmiştir. Bu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, MEL' in antioksidan özelliği üç ana başlık altında toplanmıştır (13).

1. Direkt antioksidan etki: Melatonin, oldukça lipofilik olması nedeniyle hücre içerisine kolayca yayılarak antioksidan etki gösterir. Melatoninin, H_2O_2, HOCI (hipoklorik asit),

O_2, $OH^{\cdot}$, NO (nitrik oksit), $ONOO^{-}$ (peroksinitrit) gibi oksidatif strese neden olabilen serbest radikalleri detoksifiye ederek onların biyomoleküller üzerindeki zararlı etkilerini direkt olarak önleyebildiği ayrıca lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği bildirilmektedir. Ayrıca melatonin GSH, C vitamini, E vitamini gibi güçlü antioksidanlardan daha güçlü etkiye sahiptir. Lipid peroksidasyonunu önleme kapasitesi E vitamininden 2 kat daha fazladır. Melatonin özellikle hidroksil radikalini nötralize etmekte büyük öneme sahiptir. Melatonin'in $HO^{\cdot}$ radikalini nötralize etme kapasitesi GSH (glutatyon)' dan 5 kat ve mannitolden 15 kat fazladır. Bunlara ilave olarak melatoninin DNA' yı serbest radikallerden kaynaklanan oksidatif hasara karşı koruduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Hatta DNA hasarını önlemede askorbat ve alfa-tokoferol gibi bazı klasik antioksidanlardan 60- 70 kat daha etkilidir.

2. Antioksidan enzim aracılı etki: Melatoninin, SOD, GPx, GR ve CAT gibi antioksidan enzimleri uyararak aktivitelerini artırdığı ve bu sayede oksidatif stresi baskıladığı bildirilmektedir. Ayrıca Mn-SOD, Cu, Zn-SOD ve GPx gibi bazı antioksidan enzimlerin gen ekspresyonu artırdığı bildirilmektedir (12, 15).

3. Prooksidan enzim aracılı etki: MEL' in bazı prooksidan enzimleri inhibe ederek serbest radikal oluşumunu azalttığı ve bu yolla da antioksidan sistemi desteklediği öne sürülmektedir.

MEL direk bir serbest radikal temizleyici olarak etki eder ve hem ROS hem de RNS' yi detoksifiye eder. Bununla birlikte MEL'in antioksidatif savunma sistemlerinin aktivitesini artırdığı da bilinmektedir (15).

Ratlara 60 dakikalık treadmill egzersizine tabi tutulmadan 30 dakika önce kg başına 1,0 mg melatonin verilmesi kaslarda akut egzersiz nedeniyle oluşan oksidatif hasara karşı melatoninin potansiyel koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermiştir (16).

Başka bir çalışmada streptozotosin etkili diabetik sıçanlarda melatonin uygulamasının plazma süper oksit radikal seviyelerini düşürdüğü ayrıca SOD ve GPx antioksidatif enzimlerinin aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (17).

Melatoninin antioksidan etkisinin değerlendirildiği bir başka çalışmada 30 dakika yüzme egzersizi yaptırılan ratlarda melatonin takviyesinin lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzimler üzerine etkisi araştırılmıştır. 30 dakikalık yüzme egzersizi kaslarda GSH ve GSH/GSSG oranında düşmeye neden olmuştur. Buna karşın, melatonin takviyesinden sonra karaciğerde GSH (Glutatyon) ve GSSG (Glutatyon disülfat) seviyelerinin önemli derecede yükseldiği GSH/GSSG oranında da düşüş gözlendiği

bildirilmiştir. Ayrıca melatonin takviyesinin kaslarda lipid peroksidasyonunu önlediği de bu çalışmada bildirilmiştir (18).

Metabolik sendrom (MS) hastalarında 2 aylık melatonin takviyesi uygulaması sonucunda hastalarda lipid peroksidasyonunda azalma antioksidan enzim aktivitesinde artış gözlenmiştir (65).

Venereso ve ark (66) melatonin takviyesinin akut egzersizin kalp kasında oluşturduğu hasarı azalttığını bildirmişlerdir (66).

Sonuç olarak, MEL direk bir serbest radikal süpürücü olarak etki eder ve hem reaktif oksijen hem de reaktif nitrojen türlerini detoksifiye eder. Ayrıca indirekt olarak da antioksidatif savunma sistemlerinin aktivitesini artırır (13).

2.8. EGZERSİZ VE AKUT EGZERSİZİN KAN VE DOKULARDAKİ ANTİOKSİDAN ENZİMLER VE OKSİDATİF STRES HASAR MARKIRLARI ÜZERİNE ETKİSİ

Son yıllarda egzersizin; radikal üretimi ve antioksidan sisteme etkisi üzerinde yoğun bir çalışma dikkat çekmektedir. Konu üzerindeki araştırmaların yoğunlaşmasında en önemli faktör, fiziksel aktivite ve egzersiz sırasında serbest radikallerin arttığının saptanmış olmasıdır. Akut egzersizin çeşitli dokularda ve kanda oksidatif strese neden olarak çeşitli hasar markırlarının seviyelerinde ve antioksidan enzim aktivitelerinde değişikliklere neden olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (4, 5, 8, 77). Egzersize bağlı olarak serbest radikal üretiminin mekanizmaları ve bunun sonucunda antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki ve oksidatif stres sonucu oluşan hasar markırlarının seviyelerindeki değişmeler aşağıda açıklanmıştır.

2.8.1. Egzersiz, Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem

Egzersizin serbest radikal üretimini artırdığı ilk kez 1982 yılında gösterilmiş; o zamandan beri egzersizin oksidatif stres üzerine etkisi birçok çalışmada araştırılmıştır. Bu çalışmaların birçoğu aerobik egzersiz (koşma, bisiklet, yüzme) şeklinde yaptırılmıştır. Çalışmaların önemli bir kısmında da dayanıklılık egzersizlerinin oksidatif stresi ve kas tahribatını artırdığı ayrıca enzimatik antioksidan aktivitelerinde ve enzimatik olmayan antioksidan konsantrasyonlarında bazı modifikasyonlara neden olduğu gösterilmiştir (1).

Fiziksel egzersiz egzersizin tipi ve yoğunluğuna bağlı olarak oksidatif stres ile ilişkilidir. Egzersiz esnasında oksijen tüketiminin artması serbest radikal üretiminde artışa yol açar. Oluşan serbest radikaller enzimatik ve nonenzimatik antioksidanları içeren bir savunma sistemi tarafından nötralize edilir. Egzersiz, ROS ve antioksidanlar arasında oksidatif stres olarak adlandırılan bir dengesizlik oluşturur (26). Düzenli antrenmanın sağlık açısından çok sayıda faydası varken, şiddetli fiziksel stresörler muhtemelen ROS üretimindeki artıştan dolayı oksidatif hasarı artırabilir (67, 68).

Hücreler metabolik süreçlerinin bir parçası olarak sürekli serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri üretirler. Üretilen bu serbest radikaller enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemiyle etkisiz hale getirilir. Egzersizin oksijen tüketimini arttırdığı bilinmektedir. Oksijen tüketiminin artması mitokondrideki süper oksit radikal anyonunun artışına yol açar. Tüketilen oksijenin aerobik metabolizma süresince %95-98'i suya indirgenmekte fakat geri kalan kısım reaktif oksijen türleri gibi oksidatif yan ürünlere dönüştürülebilmektedir. Egzersiz süresince oksijen tüketimi dinlenme durumuna göre 10-15 kat artabilmekte bunun sonucunda dinlenim durumuna göre yüksek miktarda serbest radikal üretimi olmaktadır. Egzersiz süresince ve ağır bir egzersizin ardından reaktif oksijen türlerinin üretimi, mitokondrial solunum zinciri, ksantin oksidaz, NADPH oksidaz, fagositler gibi birçok hücresel kaynak tarafından arttırılır. Egzersiz reaktif oksijen türleri ve antioksidanlar arasında oksidatif stres olarak adlandırılan bir dengesizlik yaratabilmektedir. Bunun sonucunda da lipidler, proteniler ve DNA gibi hücresel makromoleküllerde hasar meydana gelmektedir (6, 8, 69, 70, 71).

Fiziksel egzersizin, sağlık üzerine pek çok faydalı etkilere sahip olmasının yanında, reaktif oksijen türlerinin ve serbest radikal oluşumunun özellikle şiddetli egzersiz sırasında arttığına ve oksidatif hasarın kas, karaciğer, kan ve diğer dokularda oluştuğuna dair bulgular da mevcuttur. Fiziksel egzersizle ilgili olan oksidatif hasar, egzersizin tipi ve yoğunluğuna bağlıdır. Egzersizin yoğunluğu ne kadar yüksek olursa, oksidatif stres ve serbest radikal oluşumu da o kadar fazla olur. Özellikle akut, yoğun egzersizlerin oksidatif strese neden olduğu belirtilirken, düzenli dayanıklılık antrenmanlarının egzersiz sonrası oksidatif stresi ve kas hasarını düşürdüğü ve antioksidan savunma kapasitesini geliştirdiği ileri sürülmektedir (2).

Bütün bunlara rağmen egzersiz yoğunluğunun düşük olduğu durumlarda (<50% maksimum oksijen tüketimi) antioksidan kapasite aşılmaz ve serbest radikallerin neden olduğu hasar ortaya çıkmaz. Bununla birlikte egzersiz yoğunluğu, serbest radikal

üretimi ve oksidatif stres oluşumunda önemlidir. İnsanlar ve hayvanlar üzerinde yapılan birçok çalışmada yoğun olarak yapılan fiziksel egzersizin serbest radikal üretimini artırdığı bildirilmiştir (1).

Aerobik antrenmanların antioksidan enzimler üzerine etkileri kas, plazma, karaciğer ve kalpte incelenmiştir. Dayanıklılık antremanları sonucunda plazma ve diğer dokularda antioksidan enzim aktivitelerinde artışların olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte bazı çalışmalarda antioksidan uyumunun egzersiz yoğunluğu ve VO_{2max} (maksimum oksijen kullanımı) ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Düzenli antrenmanın SOD ve GPx gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırmak suretiyle oksidatif stresin zararlı etkilerini ortadan kaldırdığı gösterilmiş, bu artışın antioksidan enzimlerin mitokondriyal biyosentezini uyaran serbest radikal miktarındaki artışın sonucu olduğu ileri sürülmüştür (1, 7).

171 km lik bir dağ bisikleti etabı sonucunda bisikletçilerin katalaz, glutatyon redüktaz aktivitelerinde ve okside glutatyon ve ürik asit seviyelerinde artış, glutatyon peroksidaz aktivitelerinde ise azalma olduğu bildirilmiştir (8).

Sonuç olarak egzersizin serbest radikal üretimini artırdığı, bunun sonucunda oksidatif strese neden olduğu, bunun aksine antioksidan savunma sistemini de uyararak antioksidan enzim aktivitelerinde artışa yol açtığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda ise antioksidan enzim aktivitelerde azalma olduğu da bildirilmiştir (5, 8, 78).

2.8.2. Akut egzersizde oksidatif stres

Akut egzersizin oksidatif stresi uyardığı son on yılda iyi bir şekilde belgelenmiştir (8). Akut egzersizin oluşturduğu oksidatif stres özellikle son 10 yılda geniş bir şekilde araştırılmıştır. Bu çalışmalarda akut egzersizden sonra kandaki oksidatif stres belirteçlerinde artış tanımlanması, oksidatif stresin sadece hücresel elemanlarla sınırlı olmadığına işaret etmektedir (7). Akut egzersiz serbest radikallerin ve süper oksit ve hidrojen peroksit gibi diğer reaktif oksijen türlerinin artışıyla sonuçlanır (9).

Egzersiz, radikal oluşumunda birçok farklı sistemin aktivasyonuna neden olabilir. Primer kaynaklar aerobik solunum esnasında mitokondriden elektron sızıntısı, prostanoid metabolizması, katekolaminler, ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz enzimleridir. Sekonder kaynaklar ise fagositik hücreler, demir içeren proteinlerin parçalanması ve aşırı kalsiyum birikmesidir (72).

Özellikle yüksek şiddette yapılan akut aerobik egzersizin oksidatif strese neden olduğu birçok çalışmada bildirilmiştir. Akut aerobik egzersizde oksidatif stresle bağlantılı iki mekanizma bulunmaktadır:

a) Oksijen kullanım hacmi (VO_2), istirahat seviyelerinin 10-15 kat üzerine çıktığı zaman kütle olayı etkisiyle prooksidan aktivite artar.
b) Antioksidan aktivite prooksidanlarla kıyaslandığında yetersiz kalır (6, 8).

Yapılan birçok çalışmada; fiziksel egzersiz, oksijen kullanımında artma ve serbest radikal üretimi arasında bir bağlantı olduğu gösterilmiştir. Her 25 molekül O_2' nin normal solunum sürecinde indirgenmesiyle bir serbest radikalin üretildiği tahmin edilmektedir. Egzersiz sırasında da oksijen kullanımı 10-15 kat artmaktadır. Ancak egzersiz sonucu oksijen tüketimi artsa da serbest radikal üretiminin tek yolu oksijen tüketimindeki artış değildir (3).

Egzersize bağlı serbest radikal üretiminin birçok yolu bulunmaktadır:

1. Egzersizde oksijen tüketimi birçok kat artmaktadır. Mitokondrial elektron zincirinden sızan elektronlar süperoksit anyonunun üretimiyle sonuçlanır. Solunum zinciri enzim komplekslerinden farklı olarak diğer mitokondrial enzimlerde egzersizle bağlantılı serbest radikal üretiminde artışa neden olabilir. Son hayvan deneylerinde mitokonidrial membran-bağlı gliserol 3-fosfat dehidrojenaz (mGPHD) enziminin solunum zinciri enzimlerine göre çok daha önemli bir serbest radikal kaynağı olduğu öne sürülmüştür.
2. Şiddetli egzersiz süresince, aktif olan kaslar hipoksik olabilirler. İskemi süresince anaerobik metabolizma yoluyla ksantin üretilir ve ksantin, ksantin oksidaz enzimi yardımıyla ksantin oksidaza (XO) dönüştürülür. Reperfüzyon sürecinde ise, artan oksijen yüklemesinin sonucunda, ksantin oksidaz, hipoksantini ürik asite dönüştürmeye devam eder ve oksijen elektron alıcı olarak kullanılarak süper oksit oluşur.

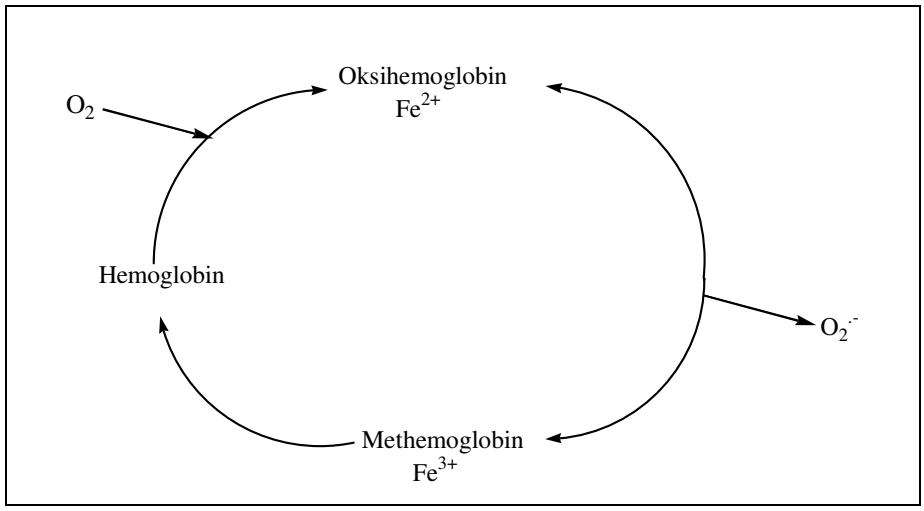
$$\text{Ksantin} + H_2O + 2O_2 \longrightarrow \text{Ürik asit} + O_2^{\bullet -} + 2H^+$$

3. Egzersiz sonucu meydana gelen doku hasarı nötrofiller gibi inflamatuar hücrelerin aktivasyonuna neden olabilir. Bu da daha sonra NADPH oksidaz tarafından serbest radikal üretimiyle sonuçlanabilir. Fiziksel egzersizin lenfositler, granülositler ve makrofajlar gibi birçok lökositin görevlerinde değişikliğe neden olduğu bildirilmiştir. Egzersiz sonucu gelişen inflamatuar yanıt sonucu nötrofiller ve diğer fagositik hücreler solunumsal patlama sonucu süperoksit, hidrojen peroksit ve diğer reaktif oksijen türlerini üretirler.

4. Egzersiz süresince katekolamin konsantrasyonu artar ve bu katekolaminlerin otooksidasyonu sonucunda reaktif oksijen türleri oluşabilir.

5. Artan sıcaklık mitokondrilerde süper oksit üretiminde artmaya neden olur. Bu yüzden egzersizin neden olduğu hipertermi oksidatif strese neden olabilir.

6. Oksihemoglobinin methomoglobin'e otooksidasyonu süper oksit üretimiyle sonuçlanır ve methemoglobin oluşumu egzersize birlikte artabilir **(Şekil 2.14.)**

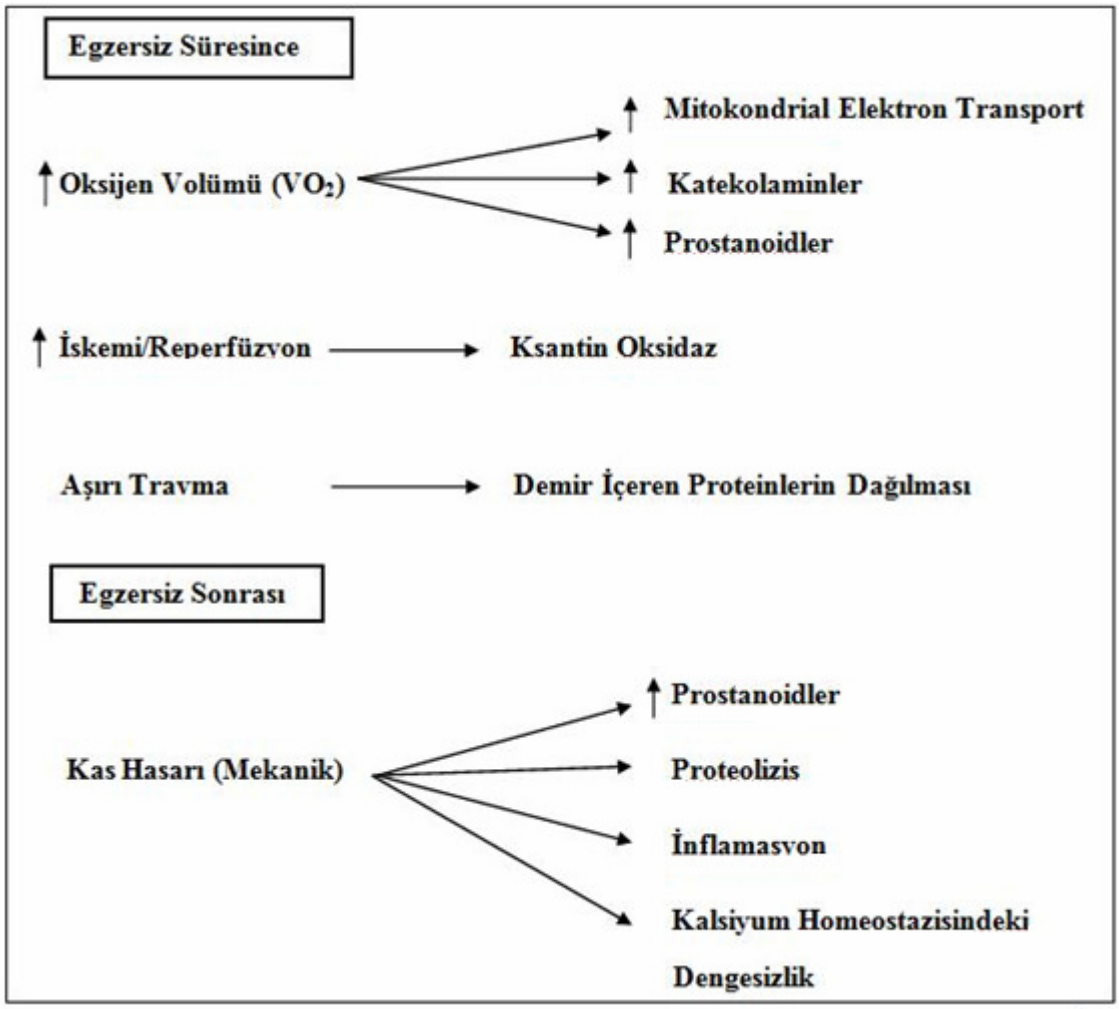


Şekil 2.14. Oksihemoglobinin methemoglobine oksidasyonu sırasında süperoksit anyonlarının oluşumu (73).

7. Oksijen kullanımının artmasına bağlı olarak prostanoid metabolizmasındaki artış oksidatif strese neden olur (3, 45, 68, 73, 75, 76).

8. Hipoksi durumunda nitrik oksit radikallerinin oluşumuna önderlik eden nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesinde artış olduğu gösterilmiştir. Bu radikaller kendi başlarına iken zayıf prooksidan etkiye sahiptirler veya süperoksitle birleşerek peroksinitriti oluşturur, böylece daha güçlü bir oksidan ajana dönüşür (11).

Akut egzersiz süresince reaktif oksijen türlerinin potansiyel üretim sebepleri **Şekil 2.15.** de gösterilmiştir (45).



Şekil 2.15. Akut egzersizle ilişkili reaktif oksijen türlerinin üretiminin olası mekanizmaları (45)

2.8.3. Akut Egzersizde Lipit Peroksidasyon, Protein Oksidasyonu ve Antioksidan Sistem

Biyolojik antioksidanlar, hücreleri egzersizle uyarılan oksidatif strese karşı korumakta hayati öneme sahiptirler. Dayanıklılık egzersizleri enzimatik olmayan antioksidan konsantrasyonlarında ve enzimatik antioksidan aktivitelerinde bazı değişikliklere neden olmaktadır. Hem insanlar hem de hayvanlar üzerinde yapılan birçok çalışmada aerobik egzersiz sonucunda kanda ve iskelet kası, kalp ve karaciğer gibi çeşitli dokularda SOD, GPx, CAT gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinde artış olduğu gösterilmiştir. Bu artış serbest radikal üretiminden sonra çok hızlı bir şekilde gerçekleşir (yaklaşık 5 dakika sonra). Bununla birlikte antioksidan aktivitesindeki artış egzersiz şiddeti ile

orantılı değildir. Akut egzersiz karaciğer, böbrek ve kalp gibi organlarda da antioksidan profilini etkiler. Bazı çalışmalar egzersiz süresince GSH veya GSH/GSSG‘ nin yükselmesinin serbest radikallere karşı bunların kullanımlarındaki artıştan kaynaklandığını öne sürmüşlerdir (1, 3, 7).

SOD, CAT, GPx ve GR egzersize bağlı oluşan reaktif oksijen türlerine karşı ilk savunma mekanizmalarını oluşturur. Bundan dolayı akut bir egzersizin bu enzimlerin aktivitelerini direkt etkileyebileceği belirtilmektedir (34).

SOD, egzersizle serbest radikal oluşumunda en çok incelenen ve araştırılan enzimdir. Akut bir egzersizi takiben kalp, karaciğer, akciğer dokusu ve eritrositlerdeki SOD aktivitesinde artışlar değişik araştırıcılar tarafından ortaya konmuştur. Değişik çalışmaların sonuçlarının derlendiği yazılar incelendiğinde ise; akut egzersizlerden sonra SOD enziminin aktivitesinin arttığı, azaldığı veya değişiklik olmadığını belirten çelişkili sonuçlara rastlanmaktadır (34).

Akut egzersizin iskelet kası, kalp ve karaciğerde süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzim aktivitelerinde artışa yol açtığı bilinmektedir (3).

Antioksidan durum, egzersizin tipine ve organa bağlı olarak büyüklük ve yön açısından farklılıklar gösterir. Farklı egzersiz tiplerinin farklı seviyelerde oksidatif hasarla sonuçlandığı bilinmektedir (78).

Ratlarda kısa süreli ve şiddetli egzersizin rat akciğerlerinde protein oksidasyonu sonucu oluşan reaktif karbonil türevlerinde artışa neden olduğu bulunmuştur (4). Ayrıca akut egzersizin eritrositlerde lipid peroksidasyonu belirteci olan malondialdehit (MDA) seviyelerini önemli derecede arttırdığı, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz aktivitelerinde ise önemli miktarda azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (77).

Groussard ve ark (78) akut egzersizin oksitatif strese yol açtığını göstermişler, akut egzersiz sonrasında plazma malondialdehit (MDA) seviyesinde artış, eritrosit glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz enzimlerinde ve glutatyon seviyelerinde düşüş olduğunu göstermişlerdir (78).

Ayrıca akut egzersizin rat kalbinde mitokondrial glutatyon peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz antioksidan enzim aktivitesinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (5).

Profosyonel bisikletçilerin katıldığı bir dağ etabında yarış sonu katılımcıların glutatyon peroksidaz aktivitelerinde %40-%50 düşüş, nötrofil myeloperoksidaz (MPO)

aktivitelerinde %39 artış, lenfosit GPx aktivitelerinde ise % 87 artış olduğu bildirilmiştir (8).

Öztaşan ve ark (70) ratlar üzerinde yaptığı bir çalışmada akut egzersizin eritrosit malondialdehit (MDA) seviyelerinde yükselmeye, yine eritrosit süperoksit dismutaz aktivitesinde azalmaya ve eritrosit glutatyon peroksidaz aktivitesinde artışa neden olduğunu göstermişlerdir (70).

Liu ve ark (76) akut egzersizin sıçanlarda karaciğer MDA içeriğinde önemli artışa yol açarken, karaciğer glutamin sentetaz aktivitesinde düşmeye yol açtığını ayrıca herhangi bir organın protein karbonil seviyelerinin önemli miktarda değişmediğini göstermişlerdir. Böbrek içeriğinde, MDA ve protein karbonil düzeyleri veya glutamin sentetaz aktivitesi akut egzersiz sonucunda değişmemiştir. Organlar arasındaki farklılık oksijen tüketimi, oksidanlara ve antioksidan enzim aktivasyonuna duyarlılık, antioksidan seviyeleri ve diğer tamir mekanizmaları gibi birçok faktöre bağlı olabilir. Kas ve kalp oksidatif strese beyin ve karaciğer gibi organlardan farklı cevap verir görünmektedir; bu muhtemelen mitokondriyal biyoyararlanımdaki farklılıktan dolayıdır (76).

Beyin, karaciğer, kalp, böbrek, hızlı ve yavaş kaslardaki nükleer DNA da önemli bir hasar görülmemiştir. Ayrıca akut egzersiz, beyin ubikinon, karaciğer sistein ve sistin ve yavaş kas askorbik asit seviyelerinde azalmaya, kalp GSH ve askorbik asit seviyelerinde artışa neden olur (78).

Ratlarda kısa süreli ve yoğun egzersizin lipid ve protein oksidasyonunda artış neden olduğu bulunmuştur (8).

Sureda ve ark (59) egzersizin eritrosit ve lenfositlerde oksidatif hasarı artırdığını bildirmişlerdir (59).

Akıl M ve ark (80) akut yüzme egzersizi yaptırdıkları ratlarda eritrosit GSH, serum GPx ve SOD ayrıca plazma MDA değerlerine bakmışlar, deney sonucunda akut yüzme egzersizinin, lipid peroksidasyonu belirteci olan plazma MDA değerlerinin yüksek seviyelerde olduğunu belirtmişlerdir (80).

Somani ve ark (81) akut egzerisizin rat kalbi mitokondrial süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinde artışa neden olduğunu bildirmişlerdir (81).

Bir saatlik yüzme egzersizinin erkek ratlarda katalaz seviyelerini karaciğerde %462, kalpte % 302, böbrekte % 598 ve akciğerde % 253, dişi ratlarda ise karaciğerde % 436, kalpte % 251, böbrekte % 760 ve akciğerde % 271 artırdığı gösterilmiştir (59).

2.8.4. Düzenli Egzersizde Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma

Akut egzersizin neden olduğu oksidatif stres ile ilgili son on yılda önemli bilgi birikimi elde edilmiştir. Akut fiziksel egzersizin ROS ve nitrojen türlerinin oluşumunu artırdığı ve bununla bağlantılı oksidatif hasara neden olduğu, düzenli antrenmanın ise ROS' un neden olduğu lipit peroksidasyonuna karsı direnci artırdığı ve oksidatif proteinleri ve DNA hasarını azalttığı bilinmektedir. Diğer taraftan düzenli egzersizin ROS' a karşı direnci artırdığı ve oksidatif protein birikimi ile DNA hasarını azalttığı bilinmektedir (8). Düzenli ve yorucu olmayan fiziksel egzersizin faydalı etkisi uzun zamandır bilinmektedir. Ancak egzersiz yorucu bir şekilde yapıldığında faydalı etkisi kaybolmaktadır. Yorucu fiziksel egzersizin kas, karaciğer, kalp gibi birçok dokuda serbest radikal üretimini arttırarak oksidatif hasara neden olduğu bilinmektedir. Özellikle de ara sıra yapılan ağır egzersizler kas dokusu gibi bazı dokulara ağır yapısal zararlar vermektedir (80, 82).

Egzersiz ağır bir şekilde de yapılsa orta derecede de yapılsa ROS üretimiyle sonuçlanır (72). Düzenli bir şekilde yapılan fiziksel egzersizin sağlığa olan faydasının yanı sıra yaşam süresini de uzattığı hayvan deneylerinde gösterilmiştir (83). Orta şiddetteki kronik egzersizler yüksek şiddetteki akut egzersizlere zıt etkiler gösterir. Toksikolojiden alınan bir terim olan "hormesis" bir maddenin düşük dozda iken faydalı, yüksek dozda veya konsantrasyonda iken zararlı olduğunu ifade eder ve bu terim egzersizin etkisini tanımlamak için de kullanılmaktadır (84). Düzenli egzersiz, akut egzersizin yol açtığı oksidatif stresi azaltarak adaptasyona neden olabilir. Antrenmana cevap olarak antioksidan enzim aktivitesinin artması, sistemin reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerine karşı korunmayı kolaylaştırmak için antioksidan oluşturma ihtiyacından dolayıdır. Çok hafif egzersiz adaptasyon sağlamada başarısız olur, çünkü oluşan reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türleri antioksidan savunma sistemi tarafından yeterince elimine edilir. Yeterli şiddet ve sürede tekrarlanan egzersizlerin biriken etkileri sonucunda adaptasyon gerçekleşir. Özetle, aerobik antrenmanlar egzersizin neden olduğu oksidatif stresi baskılamaya ilaveten antioksidan üretimini de uyarır (7, 13).

Düzenli antrenmanın SOD ve GPx gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırmak suretiyle oksidatif stresin zararlı etkilerini ortadan kaldırdığı gösterilmiş, bu artışın antioksidan enzimlerin mitokondriyal biyosentezini uyaran serbest radikal miktarındaki artışın sonucu olduğu ileri sürülmüştür. İki temel antioksidan enzim olan mitokondriyal SOD ve sitozolik GPx aktivitesi antrenman yapan hayvanlarda yapmayanlara göre

önemli ölçüde yüksek bulunmuş, CAT ve sitozolik SOD' de ise küçük bir farklılık gözlenmiştir (7).

Çalışmaların çoğunda akut egzersizin, lipid peroksidasyonunda artışa yol açtığı düzenli egzersizin antioksidan statüsünde pozitif değişime neden olduğu bildirilmektedir. Antrenmanlı bireylerde, gerek kas hücreleri gerekse diğer hücrelerde yerleşik sabit bir oksidatif stresin varlığı, egzersize bağlı gelişebilecek riskten korunmaya yönelik güçlü bir antioksidan sisteme neden olmaktadır. Ancak hazırlıksız yapılan egzersizde oluşabilecek aşırı oksidatif strese karşı korunma zordur. Çalışmalar, programlı fiziksel aktivitenin, getirdiği kronik oksidatif strese bağlı olarak, kanın antioksidan statüsünü geliştirdiği, böylece bireylerde güçlü bir antioksidan mekanizmanın oluşmasında rol oynadığını göstermektedir (34).

Sonuç olarak akut egzersiz oksidan seviyelerini artırarak oksidatif strese neden olurken uzun süreli yapılan düzenli egzersiz, oksidan üretimini azaltarak ve antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırarak oksidatif strese karşı koymaktadır (8).

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları ve Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)'da yapılmıştır.

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Ksantin, ksantin oksidaz (XO), nitroblue tetrazolium (NBT), Na_2CO_3, bovin serum albümin (BSA), $CuCl_2$, kloroform, etanol, KH_2PO_4, K_2HPO_4, H_2O_2, Glutatyon (GSH), nikotinamid adenozin dinükleotit fosfat redükte form (NADPH), glutatyon redüktaz (GR), NaN_3, Tiyobarbitürik asit (TBA), triklorasetik asit (TCA), n-Butanol tetraetoksipropan, flavin adenin dinükleotid (FAD), $ZnSO_4$, NaOH, sülfanilik asit, naftiletilendiamin, $NaNO_2$, HCl, $CuSO_4$, nitrat redüktaz (NR) vb. kimyasallar Merck® (Almanya) ve Sigma-Aldrich® (Amerika Birleşik Devletleri) firmalarından alındı.

3.1.2. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

1. UV-VIS spektrofotometre (CHEBIOS)
2. Soğutmalı santrifüj (Nüve NF 1200R)
3. Hassas terazi (OHAUS)
4. pHmetre (WTWI 320)
5. Su banyosu (Nüve ST402)
6. Deiyonize su cihazı (Millipore- Elix5)
7. Distile su cihazı (Nüve NS 112)
8. Otomatik pipetler
9. Muhtelif cam malzemeler

3.1.3. Çalışma Popülasyonu

Erciyes Üniversitesi DEKAM'dan sağlanan ve ağırlıkları 200-300 g arasında değişen (ortalama 250g), sekiz haftalık erkek Wistar ratları bu çalışma için kullanılmıştır. Ratlar rastgele seçilerek toplam 3 grup oluşturulmuş (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Akut yoğun egzersiz, Grup 3: Melatonin) ve her grupta 10 adet olmak üzere toplam 30 adet rat bu çalışmalarda kullanılmıştır.

3.2. METODLAR

3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması ve Yapılan İşlemler

Çalışmaya başlamadan önce; herhangi bir enfeksiyondan korumak amacıyla hayvanlar, ayrı bir yerde özel bakıma alındılar ve deney işlemine kadar hayvanların diyetlerine ve sularına dikkat edilmiştir.

Kontrol Grubu

Kontrol grubunu oluşturan ratlara yüzme egzersizi yaptırılmadı. Enjeksiyonun uygulanması esnasında oluşan stres, bazı biyokimyasal parametrelerin değişimine yol açabileceği düşüncesiyle, kontrol grubu hayvanlara da aynı stresi oluşturmak amacıyla, steril serum fizyolojik ip olarak enjekte edildi. Serum fizyolojik enjeksiyonundan sonra eter anestezisi altında ratların kanları alındı.

Akut Yoğun Egzersiz Grubu:

Akut Yoğun Egzersiz Protokolü:

Egzersiz, yüksekliği ve genişliği yaklaşık olarak 100 cm olan, ısıya dayanıklı ve içindeki suyun 37^{o}C'de sabit kalmasını sağlayacak şekilde termostat yerleştirilen yüzme tankında gerçekleştirilmiştir. Yüzme egzersizleri bir defalık (30 dakika süreli) akut yoğun egzersizler şeklinde yapılmıştır (85). Egzersizin bitiminde, deney hayvanlarından eter anestezi altında kanları alındı.

Melatonin Grubu:

Melatoninin koruyucu etkisini araştırmak amacıyla, bu gruptaki hayvanlara 25 mg/kg tek doz olacak şekilde ip olarak melatonin enjekte edildi ve melatonin enjeksiyonundan

20 dk. sonra ratlara akut yoğun yüzme egzersizi uygulandı (86, 87, 88). Egzersizin bitiminde, deney hayvanlarının eter anestezi altında kanları alındı.

Tüm gruplardan alınan kan numuneleri bekletilmeden hemen +4^{o}C' de 3000 rpm' de 5 dk. santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Serumar çalışma yapılana kadar -80 ^{0}C'de tutuldu.

3.2.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

Sun Y ve ark. (89) tarafından tanımlanan yöntem kullanıldı. Bu yöntem, ksantin-ksantin oksidaz enzimatik reaksiyonu ile oluşan süperoksit radikallerinin ortamda bulunan NBT'yi indirgemesi esasına dayanır. Renksiz NBT iyonu, süperoksit radikali ile indirgendiğinde 560 nm'de maksimum absorbans veren mavi renkli formazona dönüşür. SOD aktivitesi oranında da bu indirgenmenin engellenmesi söz konusudur.

Reaktifler

Stok ksantin, NBT, Na_2CO_3, BSA, $CuCl_2$, XO enzim çözeltisi, Kloroform/etanol karışımı.

Reaktif karışımı

40 ml 10 kat dilüe edilmiş stok ksantin çözeltisi

+ 20 ml NBT

+12 ml Na_2CO_3

+ 6 ml BSA karıştırıldı, 250 ml'ye tamamlandı.

Deneyin yapılışı

Numuneler, kloroform / etanol karışımı ile 1/1 (v/v) oranında karıştırıldı. 5000 x g'de +4 ºC'de 2 saat santrifüj edildi. Enzim aktivitesi tayini bu süpernatandan yapıldı.

Tablo 3.1. SOD aktivite ölçümünde uygulanan işlem.

Reaktifler	**Numune (µl)**	**Kör (µl)**
Reaktif karışımı	2900	2900
Numune	50	-
Distile su	-	50
Ksantin oksidaz çözeltisi	50	50

Tablo.3.1. de gösterildiği gibi 2.9 ml alınan reaktif karışımına 50 µl süpernatan ve 50 µl XO çözeltisi eklendi. 25 ºC'de 20 dakika inkübasyondan sonra tüplere 0,8 mM $CuCl_2$'den 1 ml eklendi ve 560 nm'de örneklerin optik dansiteleri okundu.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(\text{Kör abs} - \text{Numune abs})}{\text{Kör abs}} \times 100$$

% 50 inhibisyonu 1Ü aktivitenin sağladığı düşünülerek hesap yapıldı. SOD enzim aktivitesi ölçümünde, elde edilen sonuçlar Ü/mg protein şeklinde ifade edildi.

3.2.2. Katalaz Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

Yasmineh WG ve ark. (90) tarafından tanımlanan yöntem kullanıldı. pH'sı 7 olan fosfat tamponlu ortamda, örnekte bulunan katalaz enziminin etkisi ile hidrojen peroksidin yıkılması, 240 nm' de absorbans azalmasına neden olur. Yöntem, hidrojen peroksidin yıkımından kaynaklanan absorbans azalmasının ölçülmesi esasına dayanır.

Reaktifler

Fosfat tamponu: KH_2PO_4/K_2HPO_4 bileşenlerinden hazırlandı.

Substrat solüsyonu: Fosfat tamponunda hazırlanmış H_2O_2

Deneyin yapılışı

Tablo 3.2. Katalaz aktivite ölçümünde uygulanan işlem.

Reaktifler	Numune (µl)	Kör (µl)
-	5	-
Fosfat tamponu	395	600
Substrat solüsyonu	200	-

5 µl'lik numuneye 395 µl fosfat tamponu eklendi. Daha sonra 200 µl substrat solüsyonu eklenerek reaksiyon başlatıldı **(Tablo.3.2.).** 240 nm de H_2O_2'nin absorbans azalması 5 dk. boyunca takip edilerek reaksiyon oranı yani dakikadaki absorbans değişimi bulundu. Hesaplamalarda, elde edilen bu absorbans azalması için eğrinin lineer bölgesi kullanıldı. Katalaz aktivitesi; dakikadaki absorbans değişiminin, H_2O_2'nin molar absorbsiyon katsayısı ve numunenin dilüsyon faktörüyle çarpımından elde edildi. Sonuçlar ku/L olarak verildi.

3.2.3. Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

Glutatyon peroksidaz aktivitesi Paglia ve Valentina'nın (91) tanımladığı yöntem izlenerek yapıldı. Reaksiyon ortamına eklenen H_2O_2 ve GSH'dan numunedeki glutatyon peroksidaz ile GSH oksitlenir. Okside GSH nın glutatyon redüktaz ile tekrar indirgenmesi, NADPH oksitlenmesine neden olur. NADPH nın NADP ye oksitlenmesi, 340 nm dalga boyunda absorbans azalması şeklinde meydana gelir.

$H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$ (glutatyon peroksidaz katalizi)

$GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP$ (glutatyon redüktaz katalizi)

Reaktifler

Reaktif Karışımı: KH_2PO_4/K_2HPO_4 bileşenlerinden hazırlanan fosfat tamponu içinde; NaN_3, GSH ve NADPH karışımı.

Glutatyon redüktaz, H_2O_2

Deneyin Yapılışı

Tablo 3.3. Glutatyon peroksidaz aktivite ölçümünde uygulanan işlem

Reaktifler	**Numune**
Reaktif karışımı	2 ml
Numune	0.2 ml
Glutatyon redüktaz	25 µl
5 dk. oda ısısında inkübasyon	
H_2O_2	50 µl

Tablo 3.3. e göre H_2O_2 eklenmesiyle beraber reaksiyon başlatılmış olur. 37.2 ^{0}C de 340 nm de 5 dk. boyunca absorbans azalması izlendi. NADPH için molar absorbsiyon katsayısı ($6.22x10^3$ $M^{-1}.cm^{-1}$), dakikadaki absorbans değişimi ve numune dilüsyon faktörü de dikkate alınarak sonuçlar, Ü/mg protein olarak ifade edildi.

3.2.4. Malondialdehit Ölçüm Yöntemi

Malondialdehit ölçümü, Yoshoiko T ve ark. (92) tarafından tanımlanan yöneteme göre yapıldı. Yöntem, MDA ile TBA'nın asidik ortamda reaksiyonu sonucu pembe renkli kompleks oluşturması temeline dayanmaktadır. Oluşan bu renkli kompleks 535 nm'de maksimum absorbans vermektedir. Dolayısıyla kompleksin renk oluşum şiddeti numunede bulunan MDA miktarıyla orantılıdır.

Reaktifler

TCA, TBA**,** n-Butanol, 1.1.3.3. tetraetoksipropan (standart).

Deneyin yapılışı

Tablo 3.4. Malondialdehit ölçümünde uygulanan işlem.

Reaktifler	Numune (ml)	Standart (ml)
Numune	0.5	-
Standart	-	0.5
TCA	2.5	2.5
TBA	1	1
Su banyosunda 30 dk. kaynatılır ve hızla soğutulur		
n-Butanol	4	4

Tablo 3.4. deki işlemlerden sonra n-Butanol eklenmesiyle karışım vortekslenip 3000 rpm de 10 dk santrifüj edildi. Oluşan üstteki fazın absorbansları 532 nm dalga boyunda ölçüldü. Standart değerlerden numune MDA konsantrasyonları µmol/L MDA şeklinde ifade edildi.

3.2.5. Nitrik Oksit Ölçüm Yöntemi

NO˙, çok kararsız bir molekül olduğundan dolayı biyolojik örneklerdeki ölçümü zordur. Ancak oluşan NO˙, nitrit ve nitrat metabolitlerine dönüşür. Ölçülen nitrit ve nitrat konsantrasyonları endojen oluşan NO˙ ile orantılıdır (93).

Nitrit ve nitrat ölçümleri Smarason ve ark. tarafından tanımlanan enzimatik yöntemle ve

Griess reaksiyonu kullanılarak yapıldı (94). Nitratlar, nitrat redüktaz enzimi ile nitrite redüklenerek toplam nitrit ölçümü yapılmaktadır. Daha sonra enzimatik dönüşüm olmaksızın mevcut nitrit düzeyleri yine Griess reaksiyonu ile ölçülebilir. Yöntem, Griess reaksiyonuna dayanan spektrofotometrik bir ölçüm olup, reaksiyon sonucunda oluşan pembe renk 548 nm'de maksimum absorbans verir.

Reaktifler

Fosfat tamponu: KH_2PO_4/K_2HPO_4 bileşenlerinden hazırlandı.

NADPH, FAD, Nitrat redüktaz, $ZnSO_4$, NaOH

Sülfanilik asit: %1 oranında hazırlandı (Griess 1 reaktifi).

Naftiletilendiamin: %1 oranında hazırlandı (Griess 2 reaktifi).

Stok standart: 1000 µ mol/L $NaNO_2$

Çalışma standartları: Stok standarttan 5-12,5-25-50-100 µ mol/L konsantrasyonlarında hazırlandı.

Deneyin Yapılışı

Tablo 3.5. NO ölçümünde uygulanan işlem.

Reaktifler	**Deney karışımı (µl)**
Numune	150
Tampon	150
NADPH	25
FAD	25
Nitrat Redüktaz	25
Oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon	
$ZnSO_4$	250
NaOH	35
5000 devir/dk. hızda 15 dk santrifüj edilerek süpernatanlar alınır	
Süpernatan	375
Griess 1 Reaktifi	500
10 dk. oda ısısında inkübasyon	
Griess 2 Reaktifi	375

Tablo 3.5. deki eklenen Griess reaktiflerinden sonra oluşan pembe rengin absorbansı 548 nm dalga boyunda okundu. Çalışma esnasında değişik konsantrasyonlardaki standartlara da yukarıdaki işlem uygulandı. Elde edilen standart değerlere göre,

numunelerden elde edilen absorbans değerlerinden numune konsantrasyonları hesaplandı.

Nitrat redüktaz enzimi kullanılmadan da aynı deney prosedürü takip edilerek mevcut nitrit konsantrasyonları ölçülebilir.

3.2.6. Karbonil Grubu Ölçümü

Protein karbonil grubu düzeyleri ölçümünde, Evans, Levine ve Abraham'ın (95, 96, 97) tanımladıkları yöntem kullanıldı. Yönteme göre; protein karbonil gruplarının, 2,4-dinitrofenilhidrazin ile reaksiyonu sonucu 2,4-dinitrofenilhidrazon oluşturması prensibi söz konusudur. Oluşan ürün 370 nm maksimum absorbans vermektedir.

Reaktifler:

TCA, HCl, 2,4 DNPH, Etanol/Etil asetat karışımı, TFA, Guanidin HCl (pH=2,3).

Deneyin Yapılışı:

Kör tüpü ve numune tüpleri alınarak her iki tüpede 0,4 er ml numune eklendi. Daha sonra kör ve numune tüplerine %20 lik 0,4 er ml TCA eklenerek vortekslendi ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. 11000g' de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatan dikkatlice atıldı ve pellet kısmıyla çalışmaya devam edildi. Daha sonra sadece kör tüpüne 0,5 ml 2M HCI ve sadece numune tüplerine 10mM DNPH eklenerek 1 saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi bu süre içerisinde her 5-10 dakikada bir iyice vortekslendi. Sonra kör ve numune tüplerine %20 lik TCA çözeltisinden 0,5 er ml ilave edilerek 11000g' de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatan atıldı. 1/1 etanol/etil asetat eklenerek 11000g' de 10 dakika santrifüj edildi. Bu işlem 3 defa tekrarlandı. Son pelletlere 1.25 ml guanidin HCI eklenerek vorteksle çözüldü.

Numunelerin absorbansları 370 nm'de, her biri kendi körüne karşı spektrofotometrede okutuldu.

Hesaplamalarda, 2,4-dinitrofenilhidrazin için molar absorbsiyon katsayısı $\varepsilon = 22000\ M^{-1}\ cm^{-1}$ dikkate alınarak, protein karbonil düzeyleri hesaplandı (karbonil (M)=[(AbsN-AbsK)/22000 $M^{-1}\ cm^{-1}$]×Dilüsyon faktörü) ve karbonil düzeyleri nmol/ml olarak ifade edildi. Elde edilen sonuçlar, mg protein başına nmol/mg olarak verildi.

3.2.7. Protein Miktarının Tayini

Örneklerdeki protein konsantrasyonu Bradford yöntemine göre belirlendi (98). Yöntem organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik gruparıyla etkileşerek renk oluşturmasını esas alır. Boya-bağlama temelli yöntemlerin en yaygını, bradford tarafından geliştirilen ve Comassie Brillant Blue G-250 boyasının kullanıldığı metoddur.

Kullanılan Reaktifler: Comassie Brilliant Blue G-250, Etanol, O- Fosforik Asit.

Bradford Ayracı (Boyanın) Hazırlanışı

1 litrelik balon jojeye sırayla aşağıdaki maddeler eklendi:

İlk olarak, 50 ml %95'lik etanol hazırlanıp eklendi. Daha sonra üzerine 100 mg Comassie Brilliant Blue G-250 eklendi ve karıştırıldı. Dilisyon işlemi için 850 ml distile su eklendi. Daha sonra, dilüe edilmiş boyaya %85'lik 100 ml fosforik asit eklendi ve karıştırıldı.

Boya, 2 parça P5 (medyum-slow) filtre kâğıdı kullanılarak süzüldü. Filtre kâğıdı sık sık değiştirildi. Boya ışığa karşı hassas olduğu için hazırlandıktan sonra etrafı folyo kâğıdı ile sarıldı ve 0-5^{o} C de saklandı.

Deneyin Yapılışı:

Her bir numuneye aşağıdaki dilüsyon işlemleri uygulandı:

1. Dilüsyon: 50 µL numune alınarak 450 µL distile ile dilüe edildi (A dilüsyonu).

2. Dilüsyon: A dilüsyonundan 300 µL alınarak 2700 µL distile su ile dilüe edildi (B dilüsyonu).

3. Dilüsyon: B dilüsyonundan 100 µL alınarak 400 µL dH_2O ile dilüe edildi (C dilüsyonu).

Ölçümler, C dilüsyonu üzerinden yapıldı. C dilüsyonundan 500 µL alınarak üzerine 5 ml Bradford ayıracı (boya) konuldu ve tüpler vortekslendi. Her bir numunenin 595 nm de absorbansları okundu. Aynı zamanda, bir seri protein standartları hazırlanarak yukarıdaki ölçüm işlemleri uygulandı. Numunelerin ölçülen absorbans değerlerinden, standart yardımı ile numune protein miktarları hesaplandı.

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile varyans homojenliği Levene testi ile değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi ile çoklu karşılaştırmalar ise Tamhane's T2 testi ile değerlendirildi. Varyans homojenliğinin sağlanmadığı durumlarda Brown-Forsythe testinden faydalanıldı. Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi. Ayrıca değişkenlerin gruplar arası karşılaştırması grafiksel olarak güven aralığı grafiği ile gösterildi. Verilerin analizi IBM Statistics 20.0 programı ile değerlendirildi. $P<0,05$ anlamlılık düzeyi kabul edildi.

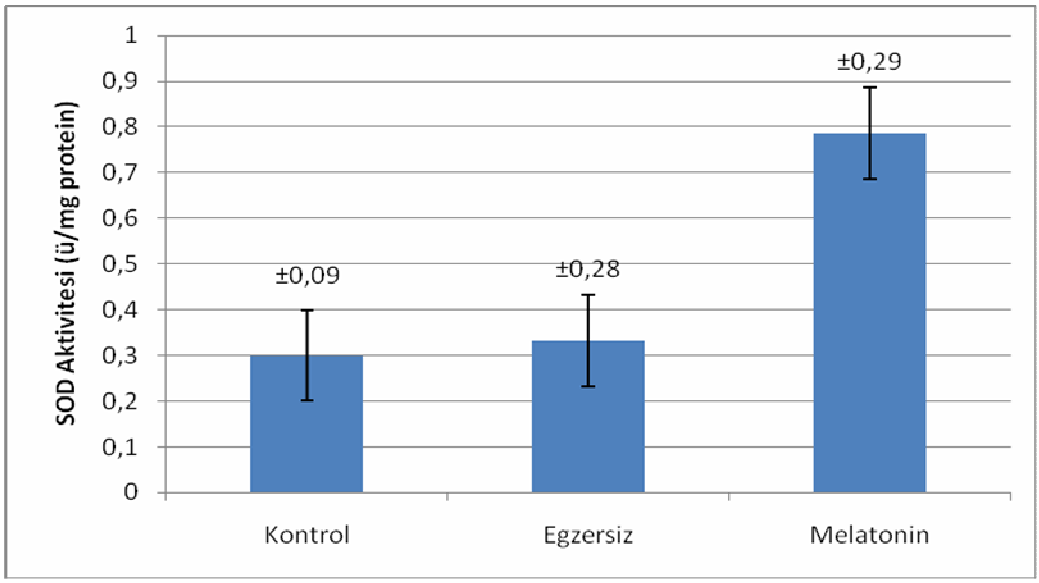
4. BULGULAR

4.1. SOD ÖLÇÜM SONUÇLARI

Kontrol grubunun ortalama SOD düzeyleri (0,3 ± 0,09 Ü/mg protein) ile egzersiz grubu ortalama SOD düzeyleri (0,332 ± 0,28 Ü/mg protein) karşılaştırıldığında, egzersiz grubunun ortalama SOD düzeyleri ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Ancak; kontrol grubunun ortalama SOD düzeyi (0,3 ± 0,09 Ü/mg protein) ile melatonin grubu ortalama SOD düzeyi (0,786 ± 0,29 Ü/mg protein) karşılaştırıldığında; melatonin ortalama SOD düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu bulundu ($p<0,05$). Veriler **Tablo 4.1** ve **Şekil 4.1**'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Gruplara ait SOD aktivite değerleri (Ü/mg protein)

Örnek No	Kontrol	Egzersiz	Melatonin
1	0,474	0,045	1,173
2	0,313	0,657	1,091
3	0,379	0,089	1,091
4	0,304	0,02	0,762
5	0,369	0,125	0,933
6	0,246	0,594	0,554
7	0,285	0,69	0,415
8	0,282	0,566	0,873
9	0,171	0,039	0,617
10	0,176	0,499	0,346
Ortalama	0,3 ± 0,09	0.332 ± 0,28	0.786 ± 0,29



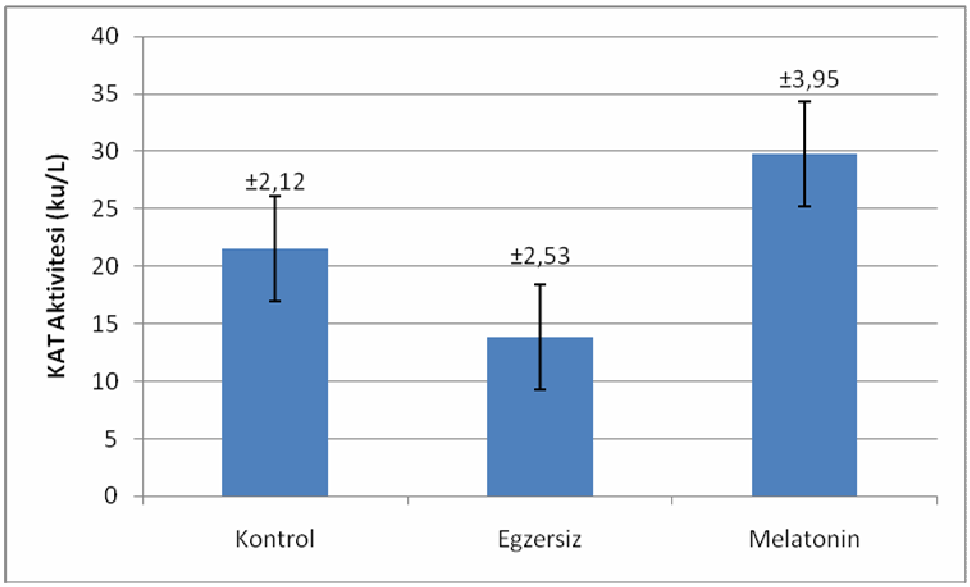
Şekil 4.1. Kontrol, Egzersiz ve Melatonin grubunun ortalama SOD düzeyleri.

4.2. KAT ÖLÇÜM SONUÇLARI

Kontrol grubunun ortalama CAT düzeyi (21,525 ± 2,12 ku/L) ile egzersiz grubu ortalama CAT düzeyi (13,875 ± 2,53 ku/L) karşılaştırıldığında; egzersiz ortalama CAT düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük olduğu bulundu ($p<0,05$). Kontrol grubunun ortalama CAT düzeyleri ile melatonin grubu ortalama CAT düzeyleri (29,775 ± 3,95 ku/L) karşılaştırıldığında ise, melatonin grubunun ortalama CAT düzeylerinin kontrol grubundan yüksek olduğu bulundu ($p<0,05$). Veriler **Tablo 4.2** ve **Şekil 4.2**'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Gruplara ait KAT aktivite değerleri (ku/L protein)

Örnek No	Kontrol	Egzersiz	Melatonin
1	20,25	13,5	32,25
2	22,5	16,5	23,25
3	21,75	15,75	29,25
4	22,5	14,25	27
5	19,5	12	32,25
6	21	13,5	26,25
7	17,25	12,75	34,5
8	23,25	16,5	27,75
9	22,5	15,75	36
10	24,75	8,25	29,25
Ortalama	21,525 ± 2,12	13,875 ± 2,53	29,775 ± 3,95



Şekil 4.2. Kontrol, Egzersiz ve Melatonin grubunun ortalama KAT düzeyleri.

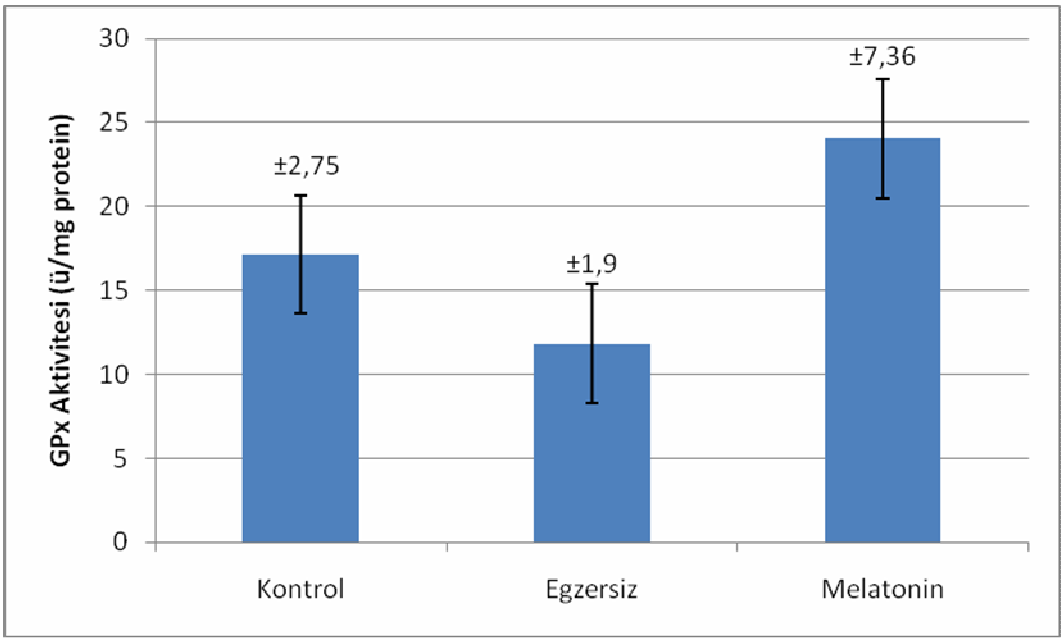
4.3. GPx ÖLÇÜM SONUÇLARI

Kontrol grubunun ortalama GPx düzeyi (17,159 ± 2,75 Ü/mg protein) ile egzersiz grubu ortalama GPx düzeyi (11,844 ± 1,9 Ü/mg protein) karşılaştırıldığında; egzersiz ortalama GPx düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük olduğu bulundu ($p<0,05$). Kontrol grubunun ortalama GPx düzeyleri ile melatonin grubu ortalama GPx düzeyleri (24,069 ± 7,36 Ü/mg protein) karşılaştırıldığında ise, melatonin grubunun

ortalama GPx düzeylerinin kontrol grubundan yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Veriler **Tablo 4.3** ve **Şekil 4.3**'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Gruplara ait GPx aktivite değerleri (Ü/mg protein)

Örnek No	Kontrol	Egzersiz	Melatonin
1	16,212	10,558	19,439
2	14,217	10,076	17,633
3	19,572	10,812	30,101
4	22,241	14,732	30,505
5	17,03	12,783	21,573
6	17,268	15,194	20,213
7	20,320	12,367	15,717
8	15,088	11,700	19,412
9	13,980	9,919	26,990
10	15,662	10,305	39,106
Ortalama	17,159 ± 2,75	11,844 ± 1,9	24,069 ± 7,36



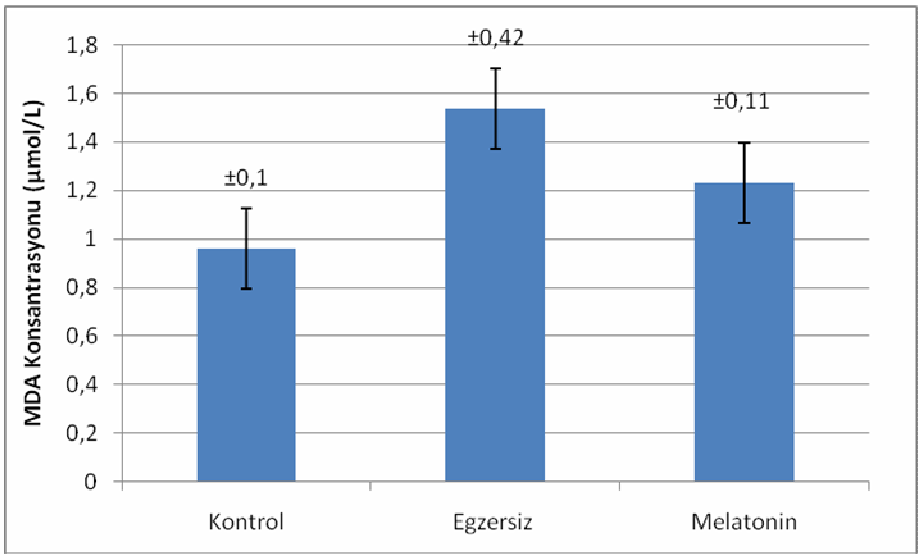
Şekil 4.3. Kontrol, Egzersiz ve Melatonin grubunun ortalama GPx düzeyleri.

4.4. MDA ÖLÇÜM SONUÇLARI

Kontrol grubunun ortalama MDA düzeyi (0,961 ± 0,1 µmol/l) ile egzersiz grubu ortalama MDA düzeyi (1,535 ± 0,42 µmol/l) karşılaştırıldığında; egzersiz grubu ortalama MDA düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu bulundu ($p<0,05$). Kontrol grubunun ortalama MDA düzeyleri ile melatonin grubu ortalama MDA düzeyleri (1,232 ± 0,11 µmol/l) karşılaştırıldığında ise, melatonin grubunun ortalama MDA düzeylerinin kontrol grubuna yakın değerlerde olduğu bulundu ($p>0,05$). Veriler Tablo 4.4 ve Şekil 4.4'de **gösterilmiştir.**

Tablo 4.4. Gruplara ait MDA değerleri (µmol/l)

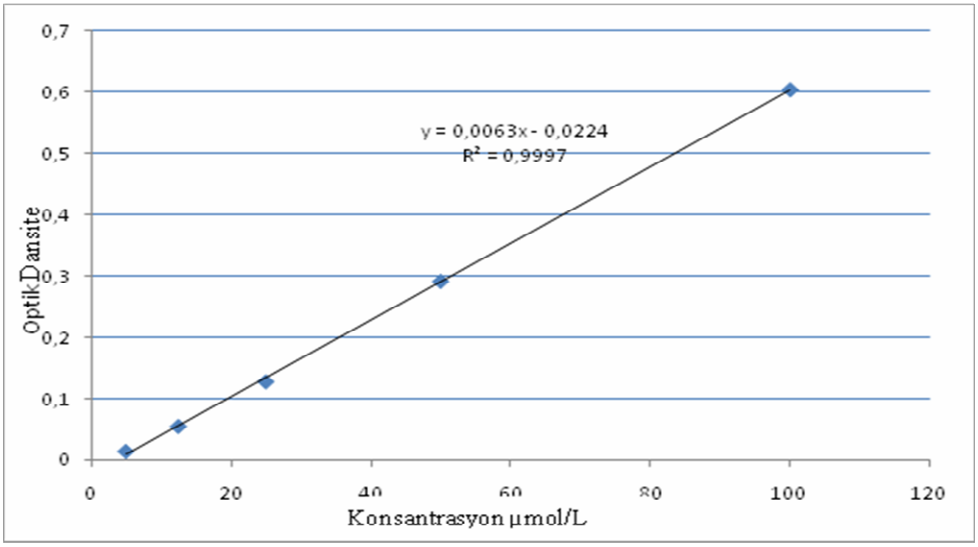
Örnek No	Kontrol	Egzersiz	Melatonin
1	1,076	1,3	1,249
2	0,872	1,3	1,229
3	0,913	1,473	1,045
4	0,974	1,154	1,269
5	0,852	1,249	1,239
6	1,106	2,44	1,269
7	0,842	1,239	1,045
8	1,096	1,412	1,229
9	0,893	1,687	1,402
10	0,994	2,104	1,351
Ortalama	0,961 ± 0,1	1,535 ± 0,42	1,232 ± 0,11



Şekil 4.4. Kontrol, Egzersiz ve Melatonin gruplarına ait MDA düzeyleri

4.5. NO ÖLÇÜM SONUÇLARI

Kalibrasyon ve lineerite çalışmaları için nitrit standartlarına ait standart eğri ve doğrusallık denklemi **Şekil 4.5'**de gösterilmiştir. Eğriden de görüldüğü gibi, 5 µmol/L nin altındaki nitrit konsantrasyonları için yöntem hassas değildir.

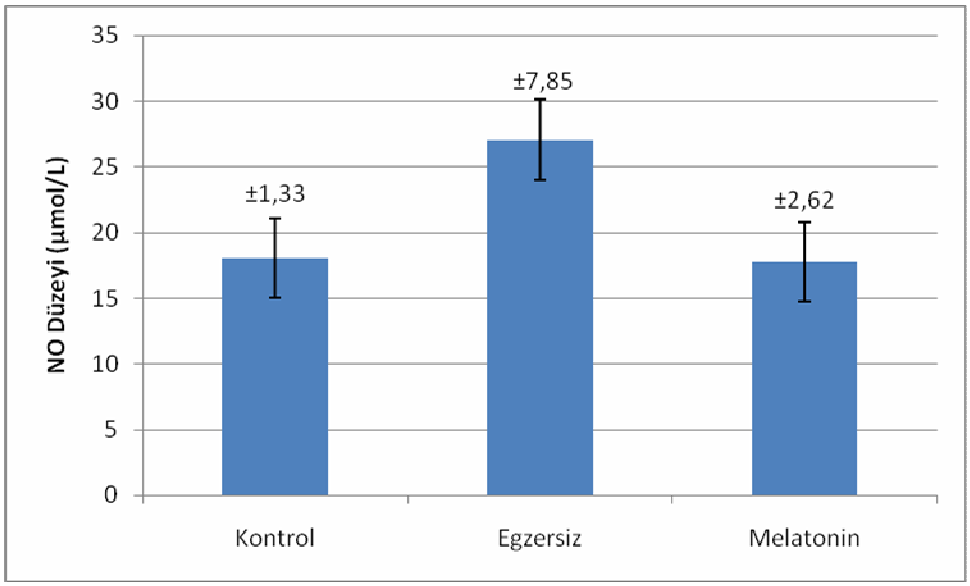


Şekil 4.5. Nitrit kalibrasyon ve doğrusallık eğrisi

Kontrol grubunun ortalama $NO^{\cdot}$ düzeyi ile (18,063 ± 1,33 µmol/L) ile egzersiz grubu ortalama $NO^{\cdot}$ düzeyi (27,047 ± 7,85 µmol/L) karşılaştırıldığında; egzersiz grubu ortalama $NO^{\cdot}$ düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu bulundu ($p<0,05$). Kontrol grubunun ortalama $NO^{\cdot}$ düzeyleri ile melatonin grubu ortalama $NO^{\cdot}$ düzeyleri (17,746 ± 2,62 µmol/L) karşılaştırıldığında ise, aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamsız olduğu bulundu ($p>0,05$). Veriler **Tablo 4.5' de ve Şekil 4.6.** da verilmiştir.

Tablo 4.5. Gruplara ait NO değerleri (µmol/L)

Örnek No	Kontrol	Egzersiz	Melatonin
1	16,730	24,667	11,968
2	19,904	20,857	16,571
3	17,841	16,571	17,841
4	17,365	32,445	19,904
5	18,317	24,507	18,158
6	19,587	26,412	14,984
7	16,889	33,556	19,587
8	20,063	27,365	19,904
9	16,730	20,38	20,223
10	17,206	43,714	18,317
Ortalama	18,063 ±1,33	27,047 ± 7,85	17,746 ± 2,62



Şekil 4.6. Kontrol, Egzersiz ve Melatonin gruplarına ait NO düzeyleri

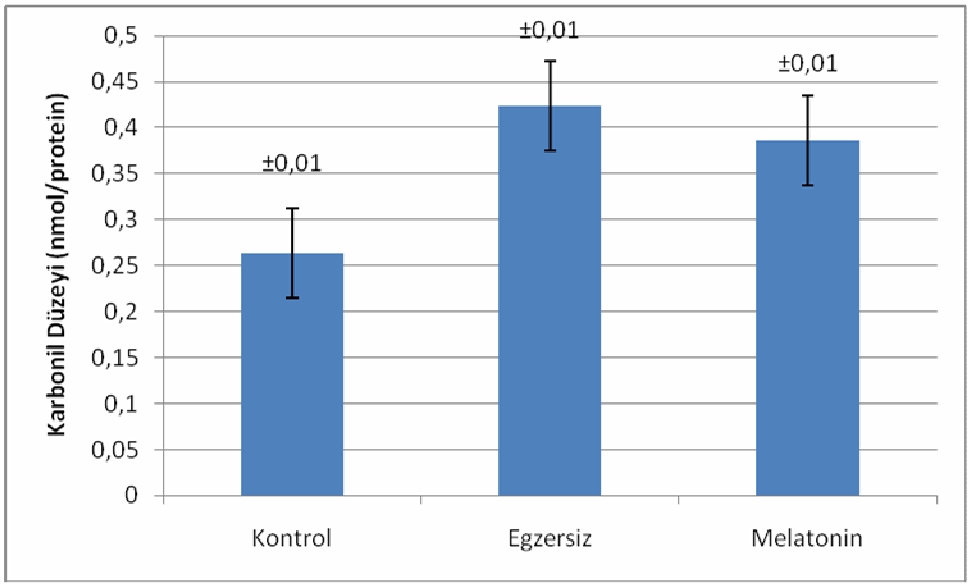
4.6. KARBONİL GRUBU ÖLÇÜM SONUÇLARI

Kontrol grubunun ortalama karbonil grubu düzeyi (0,263 ± 0,01 nmol/mg protein) ile egzersiz grubu ortalama karbonil grubu düzeyi (0,424 ± 0,01 nmol/mg protein) karşılaştırıldığında; egzersiz grubu ortalama karbonil grubu düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu bulundu ($p<0,05$). Kontrol grubunun

ortalama karbonil grubu düzeyleri ile melatonin grubu ortalama karbonil düzeyleri (0,386 ± 0,01 nmol/mg protein) karşılaştırıldığında ise, melatonin grubunun ortalama karbonil grubu düzeylerinin kontrol grubuna yakın değerlerde olduğu bulundu ($p>0,05$). Veriler **Tablo 4.6** ve **Şekil 4.7**'de gösterilmiştir.

Tablo 4.6. Gruplara ait karbonil grubu değerleri (nmol/mg protein)

Örnek No	Kontrol	Egzersiz	Melatonin
1	0,35	0,41	0,31
2	0,24	0,4	0,33
3	0,32	0,39	0,63
4	0,51	0,71	0,72
5	0,09	0,23	0,53
6	0,26	0,53	0,46
7	0,24	0,24	0,27
8	0,23	0,45	0,25
9	0,28	0,44	0,19
10	0,11	0,44	0,17
Ortalama	0,263 ± 0,01	0,424 ± 0,01	0,386 ± 0,01



Şekil 4.7. Kontrol, Egzersiz ve Melatonin gruplarına ait karbonil grubu düzeyleri

4.7. GRUPLARIN TOPLUCA DEĞERLENDİRİLMESİ

Kontrol, egzersiz ve melatonin gruplarına ait tüm oksidan ve antioksidan parametrelerin ortalama ± SD değerleri Tablo 4.7. de gösterilmiştir.

Tablo.4.7. Grupların topluca değerlendirilmesi

	Kontrol	**Egzersiz**	**Melatonin**	**P**
MDA (µmol/L)	0,961 ± 0,1	1,535 ± 0,42	1,232 ±0,11	*P<0,05 **P<0,05
Karbonil (nmol/mg protein)	0,263 ± 0,01	0,424 ± 0,01	0,386 ±0,01	*P<0,05 **P>0,05
NO (µmol/L)	18,063±1,33	27,047±7,85	17,746±2,62	*P<0,05 **P>0,05
SOD Ü/mg protein	0,3±0,09	0,332±0,2	0,786±0,29	*P>0,05 **P<0,05
KAT (ku/L)	21,525±2,12	13,875±2,53	29,775±3,95	*P<0,05 **P<0,05
GPx (Ü/mg protein)	17,159±2,75	11,844±1,90	24,069±7,36	*P<0,05 **P>0,05

*Kontrol grubuna göre egzersiz

**Kontrol grubuna göre melatonin grubu

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Akut veya düzenli olarak yapılan egzersize yanıt olarak çeşitli oksidatif stres markırları ve antioksidan enzim aktivitelerindeki değişikliklerin araştırıldığı çeşitli çalışmalar vardır. Bu çalışmaların çoğunda oksidatif stres hasar markırı olarak lipid peroksidasyonu belirteci olan MDA, DNA hasar markırı 8-OHdG, bunların yanı sıra SOD, CAT, GPx gibi antioksidan enzim aktivitelerindeki değişimler araştırılmış zaman zaman çelişkili sonuçlar, çoğunluklada paralel sonuçlar bildirilmiştir. Egzersiz düzenli olarak yapıldığında vücut için birçok yararlı etkiye sahip olmakta ancak akut olarak yapılan yoğun egzersiz oksidatif strese neden olarak oksidan ve antioksidan seviyeleri arasında bir dengesizlik oluşturmaktadır. Bu bölümde akut egzersiz sonucu meydana gelen oksidatif strese bağlı bazı hasar markırlarının seviyelerinin ve bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerinin nasıl değiştiği tartışılacaktır.

Biçer ve ark. (99), streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş ratlara akut yüzme egzersizi yaptırmışlar ve akut yüzme egzersizinin lipid peroksidasyonuna neden olarak plazma MDA değerlerini artırdığını bildirmişlerdir. Akut egzersizin eritrosit GSH, serum GPx ve SOD aktivitelerinde azalmaya neden olarak antioksidan aktivitede baskılanmaya neden olduğunu bildirmişler ayrıca akut yüzme egzersizinin plazma laktat seviyelerini artırarak kas yorgunluğuna neden olduğunu bildirmişlerdir.

Akıl ve ark (80), ratlarda akut yüzme egzersizi ve selenyum uygulaması sonucunda plazma MDA, eritrosit GSH, serum SOD ve serum GPx bakmışlar ve sonuç olarak en yüksek plazma MDA değerlerinin sadece akut yüzme egzersizi yaptırılan grupta olduğunu, en yüksek eritrosit GSH ve serum SOD düzeylerinin selenyum uygulanan yüzme grubunda elde edildiğini, yine en yüksek serum GPx seviyelerinin selenyum uygulamasının yapıldığı yüzme grubunda bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlara göre oksidatif stres, akut egzersiz sonucu artmakta, antioksidan enzim aktivitleri ise akut egzersiz sonucu azalmaktadır.

Aguilo ve ark (71), akut yoğun egzersizin eritrosit GPx aktivitesinde önemli bir azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir.

Harmandora eren (13), sıçanlarda melatonin desteğinin akut (hafif ve ağır) egzersizle çeşitli dokularda oluşan lipid peroksidasyonu ve antioksidan durum üzerine etkilerini araştırmış sonuç olarak melatonin desteğinin beyin dokusunda hem hafif hem de ağır egzersizle birlikte, karaciğerde ve plazmada ağır egzersizde bir antioksidan enzim olan SOD aktivitesini artırdığını bildirmiştir. Ayrıca MEL takviyesinin beyin dokusunda bir antioksidan enzim olan SOD aktivitesini hem hafif hem de ağır egzersizde artırdığını ve hafif egzersizle oluşan MDA artışını engellediğini, egzersizde MDA artışı karaciğer, böbrek ve plazmada MEL ile engellenmediğini, ayrıca, SOD aktivitesinin ağır egzersizde de karaciğerde ve plazmada önemli ölçüde arttığını gözlemlemiştir. Bu çalışmada beyin, karaciğer, böbrek ve plazmada MDA seviyelerinin kontrol grubuna göre hem hafif hem ağır egzersizle arttığını, MEL uygulamasının, hafif egzersizin oluşturduğu beyin MDA'sını düşürüp; beyin SOD aktivitesini artırdığını, karaciğer, böbrek ve plazmayı etkilemediğini bildirmiştir. Ayrıca MEL uygulamasının ağır egzersizde beyin, karaciğer ve plazmada SOD aktivitesini kontrol grubuna oranla önemli ölçüde artırdığını bildirmiştir. Sonuç olarak MEL'in hafif egzersizde beyin dokusunda lipid peroksidasyonu azaltıp antioksidan sistemi stimüle ederek etki oluşturabileceği kanaatine varmışlardır.

Bachur ve ark (100), ratlarda akut yüzme egzersizi sonucunda kas MDA seviyelerinin kontrol grubuna göre arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca egzersizin süresinin ve yoğunluğunun artmasının MDA oluşumunda artışa yol açtığını ileri sürmüşlerdir.

Belviranlı (7), sıçanlarda akut egzersizin (plazma MDA seviyelerindeki artış ile gösterilen) lipid peroksidasyonunu artırırken, kronik egzersizin lipid peroksidasyonu seviyelerini kontrollerin de altına indirdiğini ayrıca düzenli egzersizin oksidatif hasarı önlemede yararlı olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada plazma NO seviyesi antrenmana cevaben artarken akut egzersizde herhangi bir değişiklik olmamıştır. Plazma SOD ve GPx aktiviteleri akut egzersiz ile azalırken, antrenmanla yükselmiştir. Bu verilerin sonucunda, sıçanlarda akut egzersizin oksidatif strese ve sonuçta lipid peroksidasyonuna ve iskemi benzeri durumlara neden olduğunu, yeterli şiddet ve sürede yapılan antrenmanların ise antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırarak antioksidan savunmayı güçlendirdiğini bildirmiştir.

Diğer bir çalışmada; 3, 6 ve 12 aylık yüzme antrenmanının sıçanlarda plazma NO seviyelerini kontrollere kıyasla artırdığı bildirilmiştir (103).

Boyalı (34), E vitamini uygulamasının akut taekwondo egzersizinde lipit peroksidasyonu, antioksidan enzimler ve laktat düzeylerine etkilerini incelemiş, akut taekwondo egzersizinin sporcularda serbest radikal üretiminde artışa yol açtığını, akut taekwondo egzersizi yaptırılan sporcularda antioksidan aktivitedeki artışın serbest radikal üretimini engelleyemediğini belirtmiştir.

Radak ve ark (4) kısa süreli ve yoğun egzersizin rat akciğerinde, lipid ve protein oksidasyonunu artırdığını bildirmişlerdir.

Prigol ve ark (10) akut fiziksel egzersizin sıçan iskelet kası ve akciğerlerinde oksidatif strese neden olduğunu bildirmişlerdir.

Benzer şekilde Pinho ve ark (67) egzersiz sonucu kas protein karbonil grubu seviyelerinde önemli bir artışın olduğunu bildirmişlerdir.

Liu ve ark (76) akut egzersizin karaciğer MDA içeriğinde ve glutamin sentetaz aktivitesinde önemli artışa yol açtığını, herhangi bir organın protein karbonil seviyelerinde önemli bir değişikliğe neden olmadığını göstermişlerdir. Böbrekte MDA, protein karbonil seviyeleri veya glutamin sentetaz aktivitesi herhangi bir egzersiz tipiyle değişmemiştir.

Bejma ve ark (101), akut egzersizin kas MDA seviyelerinde önemli yükselmeye neden olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca akut egzersiz sonucu kas protein karbonil seviyelerinde önemli bir değişiklik olmadığını iddia etmişlerdir.

Bloomer ve ark (72) akut aerobik ve anaerobik egzersiz sonucu plazma MDA, protein karbonil grubu ve glutatyon oksidasyonu düzeylerine bakmışlar, protein karbonil grubu düzeylerinin ve MDA düzeylerinin egzersiz öncesine göre arttığını bildirmişlerdir. Ancak MDA değerleri istatiksel öneme ulaşamamıştır. Ayrıca egzersizin hemen ardından glutatyon oksidasyonununda artışın da gerçekleştiği bildirilmiştir.

Berzosa ve ark (102) insanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada akut egzersiz sonucunda plazma MDA değerlerinde önemli bir değişiklik bulunmadığını ancak plazma protein karbonil grubu seviyelerinin yorucu bir egzersizin ardından dinlenme durumuna göre yükseldiğini belirtmişlerdir.

Bizim yaptığımız çalışmada da yukarıdaki çalışmalara benzer şeklide akut egzersiz sonucunda serbest radikal oluşumu artmakta bunun sonucunda plazma MDA seviyelerinde ve protein oksidasyonunun belirteci olan protein karbonil grubu

seviyelerinde artış meydana gelmiştir. Melatonin uygulaması, melatonin grubunda plazma MDA seviyelerini kontrolden daha aşağılara çekmiş bu da melatoninin oksidatif stresi baskılamadaki olumlu etkisini göstermektedir. Ayrıca egzersiz grubunda plazma nitrik oksit (NO) seviyelerinde artış gözlenmiştir. Bununla birlikte akut egzersiz, plazma antioksidan enzim aktivitelerinde azalmaya neden olurken melatonin takviyesi plazma antioksidan aktivitelerinde artışa neden olmuştur.

Bunların yanı sıra bizim çalışmamıza benzer şekilde, melatonin takviyesinin oksidatif stresi baskılayıp antioksidan enzim aktivitelerinde artış sağladığını bildiren çalışmalar mevcuttur.

Hara ve ark (18), melatonin takviyesinin antioksidan sistem üzerine etkisini araştırdıkları bir çalışmada, sıçanlarda 60 dakika yüzme egzersizinin karaciğer dokusunda GSSG miktarlarında artmaya yol açtığını ve GSH/GSSG oranında azalmaya neden olduğunu, kasta GSH konsantrasyonunun ve GSH/GSSG oranının azaldığını bununda oksidatif hasarlarla direk ilgili olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca yüzme öncesi melatonin takviyesinin lipid peroksidasyonunda azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlara göre melatonin oksidatif stresi baskılamaktadır.

MEL'in serbest radikal giderici etkisinin incelendiği bir başka çalışmada Alonso ve ark. (16), sıçanları 60 dakikalık treadmill egzersizine tabi tutmadan 30 dakika önce 1.0 mg/kg i.p. MEL uygulamış, kaslarda MEL'in NOS enzim aktivitesini inhibe ederek akut egzersiz nedeniyle oluşan oksidatif hasara karşı potansiyel koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Araştırmaların sonuçları incelendiğinde, Alonso ve ark. MEL'in, NO oluşumunu kas dokuda engelleyerek, egzersizde lipid peroksidasyonu üzerine etkili olduğunu bulmuşlardır.

Klepac ve ark. (17), streptozotosin ile diabet oluşturdukları ratlara 20mg/kg MEL uygulamışlar, uygulama sonucunda melatonin takviyesinin plazma süperoksit radikal seviyelerini azalttığını, total antioksidan kapasiteyi artırdığını ve SOD ve GPx antioksidan enzimlerin aktivitelerinde artış sağladığını bildirmişlerdir. Bu sonuçlara göre melatoninin güçlü bir antioksidan olduğunu ve antioksidan enzim aktivitelerinde artışa neden olduğunu bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda da melatonin grubunda akut yoğun egzersiz grubuna göre antioksidan enzim aktivitelerinde artış gözlenmiştir. Bu da melatoninin oksidatif stresi baskıladığı ve antioksidan sistem üzerinde olumlu etkilerinin olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak; akut egzersiz lipid peroksidasyon markırı MDA, protein oksidasyonu markırı protein karbonil grubu ve nitrik oksit seviyelerinde artışa neden olurken melatonin uygulaması bu etkileri baskılamaktadır. Ayrıca melatonin takviyesi antioksidan enzim aktivitelerinde artış sağlayarak oksidatif stresin etkilerini azaltmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative Stress Relationship with Exercise and Training. Sports Med 2006; 36 (4): 327-58

2. Revan S, Erol AE. Farklı dayanıklılık antrenmanlarının oksidatif stres oluşumu ve antioksidan düzeyleri üzerine etkisi. S.Ü. BES Bilim dergisi 2008; 10: (1):11-20

3. Banerjee A.K, Mandal A, Chanda D. ‘’et all’’ Oxidant, antioxidant and physical exercise. Mol. and Cellular Bio. 2003; 253:307-12.

4. Radak Z, Nakamura A, Nakamoto H, Asano K, Ohno H, Goto S. A period of anaerobic exercise increases the accumulation of reactive carbonyl derivatives in the lungs of rats. Pflugers Arch. 1998; 435(3): 439-41.

5. Somani SM, Frank S, Rybak LP. Responses of antioxidant system to acute and trained exercise in rat heart subcellular fractions. Pharmacol Biochem Behav. 1995; 51(4): 627-34.

6. Gupta C, Gupta PH, Singh B**.** Effect of Vitamin Supplementation on Exercise Induced Oxidative Stress in Trained Elite Indian Cyclists. Am. J. Biomed. Sci. 2009; 1(2): 166-170

7. Belviranlı M. Üzüm çekirdeği ekstresinin sıçanlarda akut ve kronik egzersizin neden olduğu oksidatif hasar ve antioksidan savunma üzerine etkileri, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya 2009: 125

8. Belviranlı M, Gökbel H. Acute exercise induced oxidatıve stress and antioxidant changes. Eur J Gen Med 2006; 3: (3): 126-131

9. Çiçek D. Exercise and oxidative stress. Anadolu Kardiyol. Derg. 2006; 6: 141-2

10. Prigol M, Luchese C, Nogueira CW. Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative stress caused by acute physical exercise in skeletal muscle and lungs of mice. Cell Biochem Funct 2009; 27: 216–222

11. Demirayak I.D. Egzersiz yapan sıçanlarda oksidatif stres ve paraoksonaz enzimi, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Denizli 2007: 90

12. Beyer CE, Steketee JD, Saphier D. Antioxidant Properties of Melatonin—An Emerging Mystery. Biochemical Pharmacology 1998; 56: 1265-1272

13. Harmandaro Eren S, Sıçanlarda Melatonin Desteğinin Akut (Hafif ve Ağır) Egzersizle Çeşitli Dokularda Oluşan Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Durum Üzerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya 2008: 39

14. Brzezinski A. Mechanisms of disease: Melatonin in humans. N England J Med. 1997; 336(3): 186-95

15. Anisimov VN. Effects of exogenous melatonin. A Review, Toxicol Pathol. 2003; 31: 589-603

16. Alonso M, Collado PS, González-Gallego. Melatonin inhibits the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase and nuclear factor kappa B activation in rat skeletal muscle. J Pineal Res. 2006; 41(1): 8-14.

17. Klepac N, Rudes Z, Klepac R. Effects of melatonin on plasma oxidative stress in rats with streptozotocin induced diabetes. Biomed Pharmacother. 2006; 60(1): 32-5.

18. Hara M, Abe M, Suziki T ‘’et all’’ Tissue changes in glutathione metabolism and lipid peroxidation induced by swimming are partially prevented by melatonin. Pharmacol Toxicol. 1996; 78(5):308-12.

19. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause, consequence? The Lancet 1994; 334: 721-24.

20. Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. Alcohol Research & Health 2003; 27: 4

21. Nohl H. Involvement of Free Radicals in ageing: a Consequence or Cause of defence. British Medical Bulletin 1993; 49: 3: 653–667

22. Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress & male infertility. Indian J Med Res 2009; 129: 357-367

23. Aruoma OI. Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. JAOCS 1998; 75: 2: 199-212

24. Kothari S, Thompson A, Agarwal A, Plessis SS. Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm function. Indian Journal of Experimental Biology 2010; 48: 425-435

25. Cheeseman K.H. Slater T.F. An Introductıon to Free Radıcal Biochemistry. Brıt. Med. Bull 1993;49:3:481-493

26. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. Toxicology 2003; 189: 41-54

27. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. Clinical Interventions in Aging 2007; 2: 219-236

28. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. Physiol Rev 2008; 88: 1243-1276

29. Smith C. Marks A.D. Lieberman M. Marks' temel Tıbbi Biyokimyası Klinik Yaklaşım (2.Baskı), Prof.Dr. Mine Erden İnal, Prof.Dr. Uğur Atik, Doç.Dr. Nurten Aksoy, Yrd. Doç.Dr. Adnan Haşimi, Güneş Tıp Kitabevleri, 2007: 976

30. Güllü E. Sedanterlerde ve Dayanıklılık Sporcularında Maksimal ve Submaksimal Egzersiz Sonrası Oluşan Oksidan Stres ve Antioksidan Düzeylerinin Karşılaştırılması, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beden Egitimi ve Spor Anabilim Dalı, Ankara 2007: 71

31. Pauli JR, Ropelle ER, Cintra DE ‘’et all’’ Acute physical exercise reverses *S*-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate1 and protein kinaseB/ Akt in diet-induced obese Wistar rats. J Physiol 586. 2 2008; 659–671

32. Locatelli F, Canaud B, Eckardt K-U ‘’et all’’ Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. Nephrol Dial Transplant 2003; 18: 1272-1280

33. Maritim AC, Sanders R.A, Watkins JB. Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. j bıochem molecular toxıcology 2003; 17: 1

34. Boyalı E. E vitamini Uygulamasının Akut Taekwondo Egzersizinde Lipit Peroksidasyonu, Antioksidan Enzimler ve Laktat Düzeylerine Etkileri, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya 2009: 62

35. Ugusman A, Zakaria Z, Hui CK ‘’et all ‘’ Pıper sarmentosum increases nitric oxide production ın oxidative stress: a study on human umbilical vein endothelial cells. Clinics 2010; 65(7): 709-14

36. MacMicking J, Xie Q, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. Annu. Rev. Immunol. 1997; 15: 323–50

37. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases : structure, function and inhibition. Biochem. J. 2001; 357: 593-615

38. Pal Pacher, Joseph S. Beckman, And Lucas Liaudet. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. Physiol Rev. 2007; 87: 315– 424.

39. Mekki K, Taleb W, Bouzidi N ‘’et all’’ Effect of hemodialysis and peritoneal dialysis on redox status in chronic renal failure patients: a comparative study. Lipids in Health and Disease 2010; 9: 93

40. Aleynik I.S, Leo A.M. Ma, X, ‘’et all’’ Polyenylphosphatidylcholine Prevents Carbon Tetrachloride- Induced Lipid Peroxidation while it Attenuates Liver Fibrosis. J. Hepatol. 1997; 27: 554-561

41. Radák Z, Pucsok J, Mecseki S, ‘’et all’’ Muscle soreness-induced reduction in force generation is accompanied by increased nitric oxide content and DNA damage in human skeletal muscle. Free Radic Biol Med. 1999; 26: 1059-1063.

42. Denise Grotto, Lucas Santa Maria, Juliana Valentini, Clóvis Paniz, Gabriela Schmitt E. Solange Cristina Garcia, Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde Quantification. Quim. Nova 2009; 32: 1: 169-174

43. Atalay M, Laaksonen DE. Diabetes, oxidative stress and physical exercise. Journal of Sports Science and Medicine 2002; 1: 1-14

44. Fisher K, Bloomer W, Bloomer R. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. Dynamic Medicine 2009; 8: 1

45. Gülbahar Ö. Protein oksidasyonunun mekanizması, önemi ve yaşlılıkla ilişikisi. Turkish Journal of Geriatrics 2007; 10: 1: 43-48

46. Kayalı R, Çakatay U. Protein oksidasyonunun ana mekanizmaları. Cerrahpaşa Tıp Dergisi 2004; 35: 83-89.

47. Morabito F, Cristani M, Saija A, ‘’et all’’. Lipid peroxidation and protein oxidation in patients affected by Hodgkin’s lymphoma. Mediators of Inflammation 2004; 13 : (5/6): 381-383

48. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, ‘’et all’’. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clinica Chimica Acta 329 2003; 23-38

49. Kılıç A. Plazmada okside protein tayini, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2007: 73

50. S. Berlett B. Stadtman E.R. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. The journal of biol. Chem. 1997; 272: (33): 20313-20316

51. Demirbağ R, Yılmaz R, Güzel S ‘’et all’’. Effects of treadmill exercise test on oxidative/antioxidative parameters and DNA damage. Anadolu Kardiyol Derg 2006; 6: 135-40

52. Jenner A, England TG, Aruoma O.I, ‘’et all’’ Measurement of oxidative DNA damage by gas chromatography–mass spectrometry: ethanethiol prevents artifactual generation of oxidized DNA bases. Biochem. J. 1998; 331: 365-369

53. Martinis BS, Bianchi MLP. Effect of Vitamin C Supplementation Against Cisplatin-induced Toxicity and Oxidative DNA Damage in Rats. Pharmacological Research 2001; 44: 4

54. Hırata Y, Satonaka H. Hypertension and Oxidative Stress. JMAJ 2001; 44: (12): 540-545

55. Hussain AL. Organophosphate Insecticide Chlorfenvinphos Affects Superoxide Dismutase, Catalase and Malondialdehyde in Rat Liver. Polish Journal of Environmental Studies 2001; 10: 4: 279-282

56. Davies KJA. Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems. IUBMB Life 2000; 50: 279–289

57. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. J Clin Pathol 2001; 54: 176–186

58. Terblanche SE. The effects of exhaustive exercise on the activity levels of catalase in various tissues of male and female rats. Cell Biology International 1999; 23: 11: 749–753

59. Sureda A, Tauler P, Aguılo A ‘’et all’’. Relation between oxidative stress markers and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise. Free Radical Research 2005; 39(12): 1317–1324

60. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. The FASEB Journal 1995; 526-533

61. Mazepa RC, Cuevas MJ, Collado PS ‘’et all’’. Melatonin increases muscle and liver glycogen content in nonexercised and exercised rats. Life Sci. 2000; 66: 153-60.

62. Pahkla R, Zilmer M, Kullisaar T ‘’et all’’. Comparison of the antioxidant activity of melatonin and inoline in vitro. J Pineal Res. 1998; 24: 96-101.

63. Mero AA, Vahalummukka M, Hulmi JJ ‘’et all’’. Effects of resistance exercise session after oral ingestion of melatonin on physiological and performance responses of adult men. Eur J Appl Physiol. 2006; 96(6): 729-39.

64. Kotler M, Rodriguez C, Sainz RM ‘’et all’’. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. J Pineal Res. 1998; 24: 83-9.

65. Kozirog M, Poliwczak AR, Duchnowicz P ‘’et all’’ Melatonin treatment improves blood pressure, lipid profile, and parameters of oxidative stress in patients with metabolic syndrome. J of Pineal Res. 2011; 50(3):261-66.

66. Veneroso C, Tunon MJ, Gonzalez-Gallego J ‘’et all’’ Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise. J Pineal Res. 2009; 47(2):184-91.

67. Pinho RA, Andrades ME, Oliveira MR ‘’et all’’ Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. Cell Biology International 2006; 30: 848-53.

68. Vollaard N.B.J, Shearman J.P, Cooper C.E. Exercise-Induced Oxidative Stress Myths, Realities and Physiological Relevance. Sports Med 2005; 35 (12): 1045-62.

69. Jı LL, Gomez- Cabrera, Steinhafel N. ‘’et all’’ Acute exercise activates nuclear factor (NF)-kB signaling pathway in rat skeletal muscle. FASEB Journal 2004; 18: 1499-1506.

70. Öztaşan N, Taysi S, Gümüştekin K ‘’et all’’ Endurance training attenuates exercise-induced oxidative stress in erythrocytes in rat. Eur J Appl Physiol 2004; 91: 622–27.

71. Aguilo A, Tauler P, Fuentespina E. ‘’et all’’ Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. Physiology & Behavior 2005; 84: 1–7.

72. Bloomer RJ, Goldfarb AH, Wideman L. ‘’et all’’ Effects of Acute Aerobic and Anaerobic Exercise on Blood Markers of Oxidative Stress. J of Strength and Conditioning Res.2005; 19(2): 276-285.

73. Deaton CM, Marlin DJ. Exercise-associated oxidative stress. Clin Tech Equine Prac. 2003; 2(3): 278-91.

74. Shi M, Wang X, Yamanaka T. ‘’et all’’ Effects of Anaerobic Exercise and Aerobic Exercise on Biomarkers of Oxidative Stress. Env. Health and Pre. Med. 2007;12: 202-208.

75. Cooper CE, Vollaard NBJ, Choueiri T. ‘’et all’’ Exercise, free radicals and oxidative stress. Bio. Soc. Transactions 2002; 30: 280-85.

76. Liu J, Yeo HC, Overvik-Douki E, Hagen T, Doniger SJ, Chyu DW, Brooks GA, Ames BN. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. J Appl Physiol 2000; 89(1): 21-8.

77. Aslan R, Şekeroğlu MR, Tarakçıoğlu M. ‘’et all’’ Effect of acute and regular exercise on antioxidative enzymes, tissue damage markers and membran lipid

peroxidation of erythrocytes in sedentary students. Tr. J. of Medical Sciences 1996; 28: 411-14.

78. Groussard C, Rannou-Bekono F, Machefer G. ‘’et al’’. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. Eur J Appl Physiol 2003;89(1):14-20

79. Sureda A, Tauler P, Agulio A. ‘’et all’’. Relation between oxidative stress markers and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise. Free Radic Res 2005; 39(12):1317-24

80. Akıl M, Gürbüz U, Biçer M. ‘’et all’’ Effect of selenium supplementation on lipid peroxidation, antioxidant enzymes, and lactate levels in rats immediately after acute swimming exercise. Biol Trace Elem Res 2011; 142(3): 651-9.

81. Somani SM, Frank, Rybak LP. Responses of antioxidant system to acute and trained exercise in rat heart subcellular fractions. Pharmacol Biochem Behav.1995; 51(4):627-34.

82. Gomez-Cabrera, M. C, Domenech E, Vina J. Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training. Free Rad. Biol. & Med. 2008; 44: 126-31.

83. Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative stress and antioxidant in exercise. Curr Med Chem. 2001; 8(7): 829-38.

84. Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J. Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. Ann N Y Acad Sci. 2006; 1067: 425-35.

85. Baltacı A, Özyürek K, Moğulkoç R. ‘’et all’’. Akut yüzme egzersizi yaptırılan ratlarda çinko eksikliği ve uygulamasının bazı hematolojik parametrelere etkisi. 12(1) 15-19. (2002)

86. Çimen B, Türközkan N, Ünlü A, ‘’et all’’. Effects of Melatonin on 3-Nitrotyrosine Formation and Energy Charge in Rat Kidney in LPS-Induced Stress. Cell Biochem Function; 23(4):273-277 (2004)

87. Sewerynek E, Reiter R.T, Melchiorri, D, ‘’et all’’: Oxidative Damage in The Liver Induced by Ischemia-Reperfusion: Protection by Melatonin, Hepato-Gastroenterol. 43, 898-905 (1996)

88. Giusti P, Lipartiti M, Franceschini D, ‘’et all’’: Neuroprotection by Melatonin from Kainate-Induced Excitotoxicity in Rats, Faseb J., 10, 891-6 (1996)

89. Yı-Sun, Oberley LW, Lı Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase, Clin. Chem. 1988; 34 (3): 497-500.

90. Yasmineh WG, Kaur TP, Blazar BR, Theologides A. Serum catalase as marker of graft-vs-host disease in allogeneic bone marrow transplant recipients: pilot study. Clin. Chem. 1995; 41(11): 1574-1580

91. Paglia DE, Valentina WN, Studies on quantitative and qualitative characterization of erytrocte glutathione peroxidase, J. Lab. Clin. Med., 70:158-169, 1967

92. Yoshoiko T., Kawada K., Shimada T. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against actived-oxygen toxicity in the blood. Am. J. Obset. Gynecol. 1979; 135: 372-376

93. Rhodes PM, Leone AM, Francis PL, Struthers AD and Moncada S. The L-arginine: nitric oxide pathway is the major source of plasma nitrite in fasted humans. Biochem Biophys Res Commun 1995; 209: 590-6

94. Smarason AK, Alman KG, Young D, Redman CW. Elevated levels of serum nitrate, a stable end product of nitric oxide, in women with pre-eclampsi, Br J Obstet Gynaecol 1997;104(5):538-43

95. Evans P, Lyras L, Halliwell B. ‘’et all’’. Measurement Of Potein Carbonyls in Human Brain Tissue. Metods Enzymol 1999; 300 145-156.

96. Levine BL, Garland D, Oliver CN. ‘’et all’’. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods in Enzimology 1990, 186: 464-78

97. Abraham Z, Reznik, Packer L. ‘’et all’’. Oxidative Damage to proteins: spestrophotometric metod for carbonyl assay Metod in Enzymology 1994; 233

98. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analtiycal Biochemstry 1976; 72: 248-54.

99. Biçer M. Streptozotosin ile Diyabet Olusturulmus Akut Yüzme Egzersizi Yaptırılan Ratlarda Çinko Uygulamasının Lipid Peroksidasyonu ve Laktat Düzeylerine Etkisi, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Saglık Bilimleri Enstitüsü, Beden Egitimi ve Spor Anabilim Dalı. Ankara: 1365; 24-25 (2008)

100. Bachur J.A. Garcia S.B. Vannucchi H ''et all''. Anti-oxidative systems in rat skeletal muscle after acute physical exercise Appl. Physiol. Nutr. Metab 2007; 32: 190–196

101. Bejma J, JI L.L. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle J Appl Physiol 1999; 87: 465-470

102. Berzosa C, Gomez-Trullen EM, Piedrafita E. ''et all'' Erythrocyte membrane fluidity and indices of plasmatic oxidative damage after acute physical exercise in humans Eur J Appl Physiol 2011;111(6): 1127-33

103. Xiao DS, Qian ZM. Plasma nitric oxide and iron concentrations in exercised rats are negatively correlated. Mol Cell Biochem. 2000; 208: 163-6.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ DENEY HAYVANLARI
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
KAYSERİ-TÜRKİYE

ETİK KURULUN ADI : Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı
ETİK KURULUN ADRESİ : Erciyes Üniversitesi

Tarih: 11/08/2010 **Toplantı Sayısı:** 7 **Karar No:** 10/63

Etik kurul toplantısı 11/08/2010 tarihinde Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı'nda **Prof.Dr:Zübeyde GÜNDÜZ** başkanlığında gerçekleştirilmiştir.

Üye Adı/Soyadı	Akademik Ünvanı	Fakültesi	
Zübeyde Gündüz	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Harun Ülger	Prof. Dr	Tıp Fakültesi	
Özlem Canöz	Doç.Dr.	Tıp Fakültesi	
Hatice Özbilge	Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Servet Kesim	Yrd. Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Davut Bayram	Öğrt.Gör.Dr.	Veteriner Fakültesi	
Coşkun Tez	Doç. Dr.	Fen Edebiyat Fakültesi	
M. Betül Aycan	Yrd. Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi(Farmakoloji)	
Ahmet Öztürk	Öğrt.Gör.Dr		
Serap Altuntaş Eroğlu	Avukat		
Halil Tekiner	Eczacı		

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Yrd.Doç:Behzat Çimen'in "Akut Egzersizde Oksidan ve Antioksidan Paremetrelerin Araştırılması ve Melatolinin Uygulanmasının Etkileri "adlı araştırması incelenerek çalışmasının yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına oy birliğiyle karar verildi.

ASLININ AYNIDIR
Dekan Sekreteri
Birgül Kocaman

Tarih : 11/08/2010

Etik Kurul Başkanı İmzası

Etik Kurul Başkanı : Prof.Dr:Zübeyde GÜNDÜZ

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Mustafa ERGÜL

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 07.12.1984, Kayseri

Medeni Durumu: Evli

email: ergul.m@hotmail.com

Yazışma Adresi: Mimarsinan Mah. Tarsus Sok. Köprülü Cad. 44/8 Kocasinan/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	EÜ Sağlık Bilimler Enstitüsü	2012
Lisans	Gazi Üni. E.F. Kimya	2009
Lise	Melikgazi Lisesi, Kayseri	2002

MESLEKİ DENEYİM

Cumhuriyet Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Araştırma Görevlisi (2012-)

YABANCI DİL

İngilizce