



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**TİROZİN, TRİİODOTİRONİN VE TİROKSİNİN
ANTIOKSİDAN ETKİNLİĞİNİN İN VİTRO VE İN VİVO
ORTAMLARDA ARAŞTIRILMASI**

Dr. Mukaddes ÇOLAKOĞULLARI

UZMANLIK TEZİ

**Danışmanlar:
Prof. Dr. Esmâ GÜR
Yrd. Doç. Dr. Zehra SERDAR**

BURSA – 2003

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET	3, 4
İNGİLİZCE ÖZET	5, 6
GİRİŞ	7-19
GEREÇ VE YÖNTEM	20-42
BULGULAR	43-83
TARTIŞMA VE SONUÇ	84-92
KAYNAKLAR	93-98
TEŞEKKÜR	99
ÖZGEÇMİŞ	100

ÖZET

Tez projemizde tirozin amino asidinin ve tiroid hormonlarının olası antioksidan etkinliklerinin in vitro ve in vivo ortamlarda incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın birinci basamağında, in vitro ortamda, tirozinin, triiodotironin, tiroksin, östradiol ve alfa-tokoferolün serumda bakırla indüklenen lipid peroksidasyonu ve serum protein karbonillenmesi üzerine olan olası antioksidan etkileri incelendi. Bu moleküllerin bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunu sınırlamada etkinlik sırası 17β -östradiol > T_3 > α -tokoferol > T_4 > tirozin olarak saptandı. Aynı moleküllerin serumda protein karbonil oluşumu üzerine istatistiksel olarak anlamlı etkisi bulunmadı.

İkinci basamakta, in vitro ortamda antioksidan etkinlikleri gösterilen tiroid hormonlarının ve tirozin amino asidinin oksidan-antioksidan denge ile ilişkisinin araştırılması hedeflendi. Hipertiroidi tanısı alan 19 erkek hasta çalışmaya dahil edildi. Hastaların hipertiroidik ve ötiroidik durumda iken eritrosit Süperoksit dismütaz (SOD) ve Glutasyon peroksidaz (GPx) aktiviteleri, plazma non-HDL fraksiyonunun oksidasyona duyarlılığı, serum amino asit, protein karbonil (PK) ve malondialdehit (MDA) miktarlarının yanısıra kolesterol ve protein profilleri belirlendi. Tedavi takibi tamamlanan 15 hastanın tedavi öncesinde ve sonrasında elde edilen verileri eşleştirilmiş t-testi ile, verilerin grup içi istatistiksel analizi Pearson'un korelasyon analizi ile değerlendirildi. Buna göre tiroid hormonları tedavi sonrasında anlamlı olarak düşerken, TSH anlamlı olarak yükselmiştir. Protein profili üzerine hipertiroidizmin etkisi görülmezken, total kolesterol ve HDL kolesterol miktarları tedavi sonrasında artmıştır. Hem antioksidan savunma sisteminde yer alan SOD ve GPx aktivitelerinde, hem de oksidasyon göstergeleri olan MDA ve PK düzeylerinde ve non-HDL fraksiyonunun oksidasyona olan duyarlılığında hipertiroidik durumun tedavisi

sonrasında azalma saptanmıştır. Ayrıca tedavi sonrasında tirozinin yanı sıra diğer serum amino asit düzeylerinde de azalma olduğu gösterilmiştir.

In vitro ve in vivo basamaklardan oluşan bu çalışmanın sonuçlarına göre, hem tiroid hormonları hem de tirozin in vitro koşullarda konsantrasyona bağımlı olarak lipid peroksidasyonunu durdurarak lipidleri oksidasyondan koruyucu etkiye sahiptir. Diğer taraftan tiroid hormonları sahip oldukları hormonal etki ile oksijenli solunumu uyarıp, oksidasyonu indüklemektedir ve in vitro şartlarda antioksidan etkinlikleri gösterilen bu moleküller, fizyolojik koşullarda oluşan oksidasyonu engileyememektedir.

Anahtar kelimeler: tirozin, hipertiroidi, fenolik halka, oksidatif stres, protein karbonil miktarı

SUMMARY

In this project our goal was to investigate the possible antioxidant capacity of tyrosine amino acid and thyroid hormones both in *in vitro* and *in vivo* conditions. On the first step of this study, we investigated the antioxidant effect of tyrosine, triiodothyronine, thyroxine, estradiol and α -tocopherol on copper induced serum lipid peroxidation and serum protein carbonyl content, in *in vitro* conditions. The antioxidant effects of these compounds on peroxidation of serum lipids were in order of 17β -estradiol > T_3 > α -tocopherol > T_4 > tyrosine. No significant difference was found between the antioxidant capacities of these compounds on protein carbonyl formation.

On the second stage, we aimed to evaluate the effect of tyrosine amino acid and thyroid hormones on oxidant-antioxidant balance in hyperthyroidic patients. This step was carried on with 19 male hyperthyroidic patients who were diagnosed according to their T_4 , T_3 and TSH hormone levels. Erythrocyte Superoxide dismutase (SOD) and Glutathione peroxidase (GPx) activities, susceptibility of plasma non-HDL fraction to oxidation, serum amino acids, protein carbonyl (PC) and malondialdehyde (MDA) contents as well as serum lipid and protein profile were determined in these patients before and after medical treatment.

Paired t-test and Pearson's correlation test were used to evaluate inter- and intra-group differences. In hyperthyroidic status, thyroid hormones decreased, TSH increased significantly and total cholesterol and HDL cholesterol increased significantly, but no significant change was found in protein profiles compared to euthyroidic status. Indicators of oxidation, as well as SOD and GPx activities were decreased after treatment. Serum amino acids concentrations were increased in hyperthyroidic status compared to euthyroidic status.

According to the results of this project, both thyroid hormones and tyrosine amino acid have concentration dependent antioxidant effects on lipid peroxidation in *in vitro* conditions. On the other hand, thyroid hormones induce oxidative stress by activating aerobic respiration *in vivo* and the molecules which showed antioxidant effect in *in vitro* conditions can not prevent hormone-induced oxidation in physiological conditions.

Key words: tyrosine, hyperthyroidism, phenolic ring, oxidative stress, protein carbonyl content

GİRİŞ

I.1. Oksidatif Stres

Moleküler oksijen, hücrenin enerji kullanımını, büyümesini ve farklılaşmasını düzenleyen önemli bir çevresel ve gelişimsel etkidir (1). Yaşayan her canlı, prokaryotlardan, daha karmaşık yapıları ökaryotlara kadar, oksijen homeostazisini ve dengesini korumaya yönelik detaylı mekanizmalar geliştirmiştir (2).

Son yıllarda yapılan pek çok çalışma reaktif oksijen türlerinin (ROT), geniş bir alana yayılan biyolojik oluşumlarda aktif rol oynadığını göstermiştir. Bu biyolojik oluşumlar arasında normal hücre büyümesi, hücre değişiminin indüklenmesi ve korunması, programlanmış hücre ölümü ve hücre yaşlanma sayılabilir (3). Paradoksal olarak, ROT üretimi yaşam için hem gereklidir hem de yıkıcıdır. Reaktif oksijen türlerinin, lipid, protein ve DNA'yı kapsayan temel biyomoleküllere saldırdığını ve bunları hasara uğrattığını gösteren pek çok kanıt bulunmuştur (4). ROT üretimi ve oksidasyona karşı gelişmiş savunma sistemi arasındaki dengenin, ROT lehine bozulması sonucunda oksidatif stres meydana gelir (5).

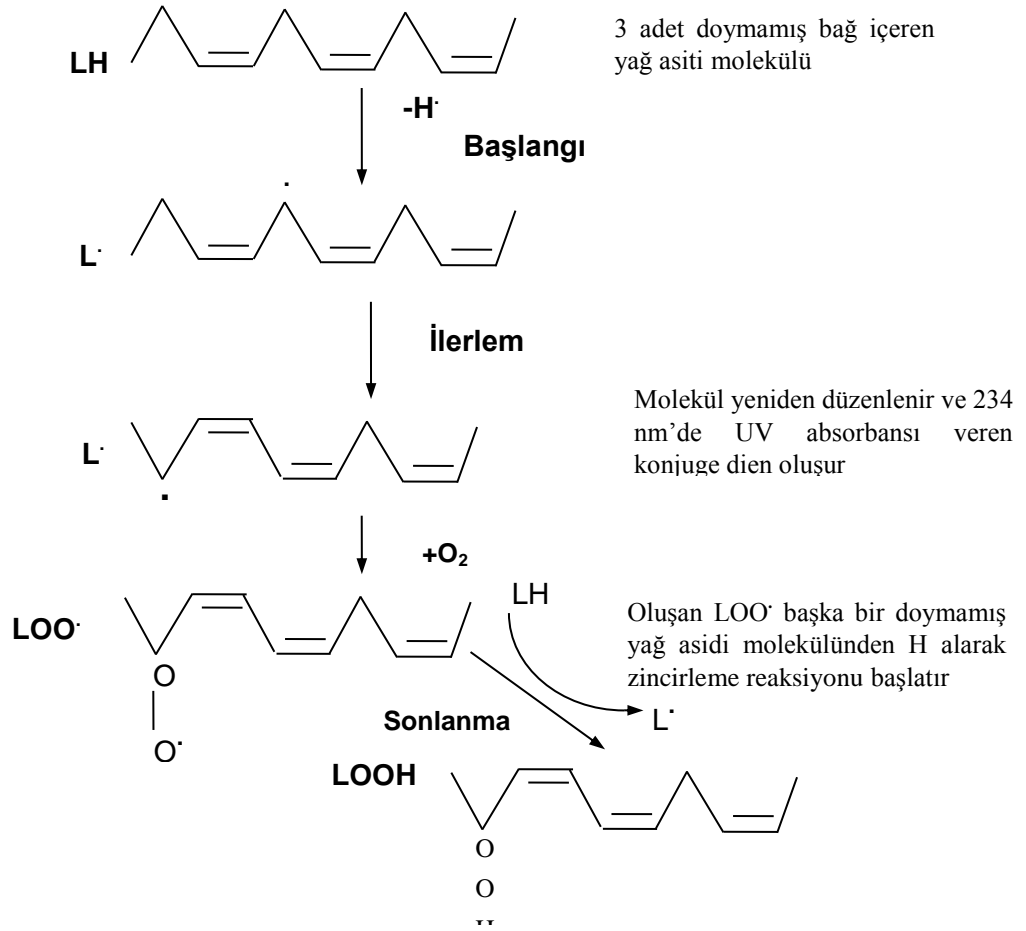
Biyolojik sistemlerde, artmış seviyedeki ROT'un kontrolünü sağlayan çeşitli antioksidan savunma sistemleri bulunmaktadır (4). Enzimatik antioksidanlar, aktif bölgesinde metal iyonları (özellikle Cu, Mn, Se ve Zn gibi eser elementler) bulunan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (Cat) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimleri içermektedir (4). Bilinen enzimatik olmayan antioksidanlar arasında ise vitamin C, vitamin E ve daha az önemde de β -karoten sayılabilir (4).

I.2. Oksidatif Stresin Değerlendirilmesi

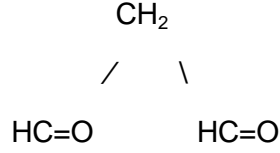
Oksidatif stresin organizmada oluşturduğu etkileri değerlendirmede, bu sũreç sırasında serbest radikallerin atağına maruz kalan lipid, protein ve DNA'da meydana gelen değişimler kullanılabilir.

Biyolojik sistemlerdeki, çoklu doymamış yağ asitlerinin (ÇDYA) serbest radikallerle oksidasyonu lipid peroksidasyonu olarak bilinir (5) ve özellikle membran lipidlerinin ÇDYA zincirleri peroksidasyona duyarlıdır. Zedelenmiş dokuların, sağlıklı olanlara göre daha hızlı lipid peroksidasyonuna gittiği gösterilmiştir (6).

Lipid peroksidasyonu da tüm zincir reaksiyonları gibi 3 ana basamaktan meydana gelir: başlangıç, ilerleme ve sonlanma (şekil-1). Zincir reaksiyonunun son ürünleri çeşitli hidroperoksitler ve siklik peroksitlerdir (5). Malondialdehit (MDA) (şekil-2), linoleik asit ve linolenik asid (n6 serisi) gibi çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan ana zincir reaksiyonlarının yan ürünüdür ve lipid peroksidasyonunu gösteren güvenilir bir gösterge olarak kullanılabilir (7).



Şekil-1: Lipid peroksidasyonunun 3 ana basamağının gösterilmesi (5)



Şekil-2: Malondialdehitin yapısı

Proteinlerin, ROT atağına maruz kalması sonucunda ortaya çıkan bileşiklerden biri de karbonil gruplarıdır. Karbonil grupları (aldehitler ve ketonlar), protein yan zincirinin oksidasyonu (özellikle proteindeki Pro, Arg, Lys ve Thr amino asitleri) sırasında üretilir (8). Protein karbonil türevleri proteinlerin hem α -amidasyon yolağında hem de glutamil yan zincirinin oksidasyonunda proteinlerin oksidatif yıkımı ile oluşabilmektedir (9).

Protein karbonil içeriği aslında genel bir göstergedir ve protein oksidasyonu belirteci olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Protein karbonillerinin birikimi, insanda çeşitli hastalıklarda (Alzheimer hastalığı, diabetes mellitus, enflamatuvar barsak hastalığı ve artrit) gösterilmiştir (10; 11).

I.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

Oksidatif hasarın oluşumunu indirekt olarak değerlendirebilen yöntemlerden biri de antioksidan savunma mekanizmasını oluşturan antioksidan enzimlerin, vitaminlerin ve diğer antioksidan maddelerin değişimleri olabilir (12). Antioksidanlar buldukları yere göre Tablo-1'de sınıflandırılmış ve özelliklerinden kısaca bahsedilmiştir.

Tablo-1:Lokalizasyonlarına göre başlıca antioksidanlar ve etki mekanizmaları (5)

	<i>ANTIOKSİDAN</i>	ETKİ MEKANİZMASI
Hücre içi	<i>SOD</i>	$O_2^{\cdot-}$ radikalini katalizleyerek uzaklaştırırlar.
	<i>CAT</i>	Ortamda yüksek düzeyde H_2O_2 varsa katalaz aktif hale geçer ve ortamdaki H_2O_2 uzaklaştırılır.
	GPx	H_2O_2 düzeyi düşük miktarda ise GPx tarafından katalizlenir. Ayrıca organik hidroperoksitleri ortamdaki H_2O_2 uzaklaştırırlar.
	Sit O	O_2 elektron taşıma zinciri içinde suya indirgenirken elektron kaçaklarını önleyerek $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$ oluşumuna engel olur.
	GSH (Glutasyon)	GPx için substrat olup tek oksijen, $\cdot OH$, H_2O_2 ve lipid peroksitlerin ortadan kaldırılmasında etkilidir. Vit E ve semidehidroaskorbat radikalini ortadan kaldırılmasında yardımcıdır.
Hücre zarı	E vitamini	Yağda çözünebilir zincir kırıcı bir antioksidandır.
	β-Karoten	Yağda çözünebilir çöpçü antioksidandır.
	Koenzim Q	Enerji metabolizmasındaki esas görevi yanında, antioksidan etkilidir.
	Membranın yapısal özelliği	Membranın yapısındaki fosfolipit ve yağ asitlerinin tipi membranın bütünlüğü açısından önemlidir.
Hücre dışı	Transferrin	Her bir molekül başına iki adet Fe^{+3} bağlar.
	Laktoferrin	Herbir molekül başına iki adet Fe^{+3} bağlar (düşük pH larda).
	<i>Haptoglobulin</i>	Hemoglobini bağlar.
	Hemopeksin	Hem molekülünü bağlar.
	Albumin	Bakır ve hem bağlar ayrıca HOCl üzerine çöpçü etkilidir.
	Serüloplazmin	Ferooksidaz etkili, ayrıca $O_2^{\cdot-}$ üzerine çöpçü etkilidir.
	Ekstrasellüler SOD	$O_2^{\cdot-}$ radikalini uzaklaştırır.
	Ekstrasellüler	H_2O_2 ve Hidroperoksit radikallerini katalizleyerek

GPx	uzaklaştırır.
<i>Bilirubin</i>	Peroksil radikalleri üzerine çöpçü etkilidir.
Mukus	'OH radikal çöpçüsüdür.
Askorbik asit	'OH radikal çöpçüsüdür.
Glikoz	'OH radikal çöpçüsüdür
Eritrositler	H ₂ O ₂ ' i diffüzyon ile O ₂ ⁻ radikalini ise anyon kanalı ile eritrosit içine alır. Bu moleküller, eritrositte bulunan SOD ve CAT enzimleri ile uzaklaştırılırlar.

I.4. Tirozin, Tiroksin ve Triiodotironinin Antioksidan Özelliği

Tirozin, yüksüz polar bir amino asittir. Yapısında fonksiyonel fenol halkası bulunmaktadır (Şekil-3). Tirozin, ayrıca tiroid hormonlarının sentezinde kullanılan ana yapıtaşıdır. Tiroid hormonları olan L-tiroksin (T_4) ve 3,5,3'-L- tri-iodotironin (T_3), 4'-hidroksi difenil eter yapısında olup, dış tarafında fenol halkası bulunmaktadır (Şekil-4) (13).

Tirozinin, T_3 'ün ve T_4 'ün antioksidan etkinliğini araştıran çeşitli araştırmalar bulunmaktadır. Çeşitli metodlarla indüklenen LDL oksidasyonunda serbest tirozinin koruyucu rolü olduğu gösterilmiştir (14, 15, 16, 17). Tirozin gibi halka yapısı içermesine rağmen –OH yerine metil grubu içeren o-metil-tirozinin LDL oksidasyonu sırasında proton vericisi olarak davranmadığı gösterilmiştir (18).

Yapılan bu araştırmalar sonucunda serbest tirozinin H^+ vericisi gibi davranarak reaktif oksijen ve/veya nitrojen radikallerin temizlenmesinde rol oynadığı sonucuna varılmaktadır. Kapiotis ve ark. tirozinin yapısındaki fenol halkasının –OH grubunu H^+ vericisi olarak kullanıldığını önermiştir (14). Tirozin ve ondan oluşan türevlerinin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada antioksidan kapasitenin sahip olunan –OH grubu sayısı ve fenolik halkadaki –OH grubunun yeriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (17).

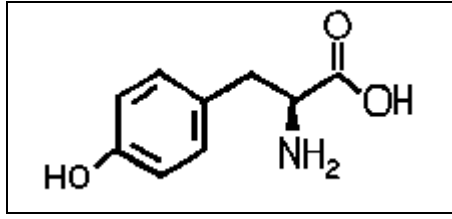
Tiroid hormonları ve onların yapısal analoglarının in vitro koşullarda Cu^{+2} ile indüklenen LDL oksidasyonunu sınırlandırdığı gösterilmiştir (19, 20). Dolaşan tiroid hormonlarının lipoproteinlere bağlanan çok az bir fraksiyonunun LDL yüzeyini radikal atağından koruyabileceği düşünülmektedir (21). Başka bir çalışmada ise serbest radikal üreticisi olarak 2,2'-azobis (2-amidinopropan) hidroklorür (AAPH)'ün kullanıldığı deney koşullarında tiroid hormonlarının serbest radikal çöpçüsü olarak davrandığı görülmüştür (22).

İn vitro koşullarda antioksidan etkinlikleri araştırılan tironinlerin, bu kapasitelerinin yapılarındaki fenolik –OH grubunun iyonizasyon düzeyinden etkilendiği gösterilmiştir (20). Antioksidan özellikleri bilinen E vitamini (α -tokoferol) ve 17β -östradiolün (Şekil-5) moleküler yapısındaki fenolik –OH grupları, tirozin, T_3 ve T_4 'ün yapısıyla benzerlik göstermektedir. Östrojenlerin fenolik A halkası, ve alfa-

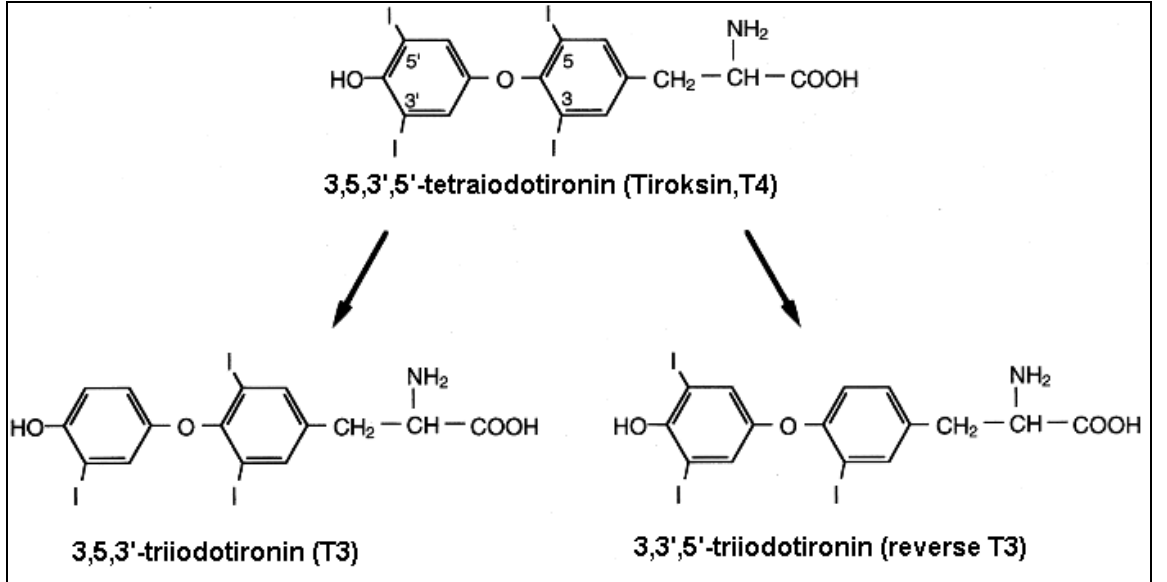
tokoferolün yapısındaki fenol halkası bu bileşiklerin antioksidan aktivitesinin önemli bir etkenidir (23, 24).

Biyokimyasal yapısında fenolik halka bulunduran maddelerin antioksidan güçlerini karşılaştıran çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Yen GC ve ark. alfa-tokoferolün antioksidan kapasitesinin tirozinden daha üstün olduğunu saptamıştır (17). Chomard ve ark. ise T₃ ve T₄'ün asetik asit derivelerinin T₃ ve T₄ ile kıyaslandığında konjuge dien oluşumunu daha çok azaltıklarını saptamışlardır (20).

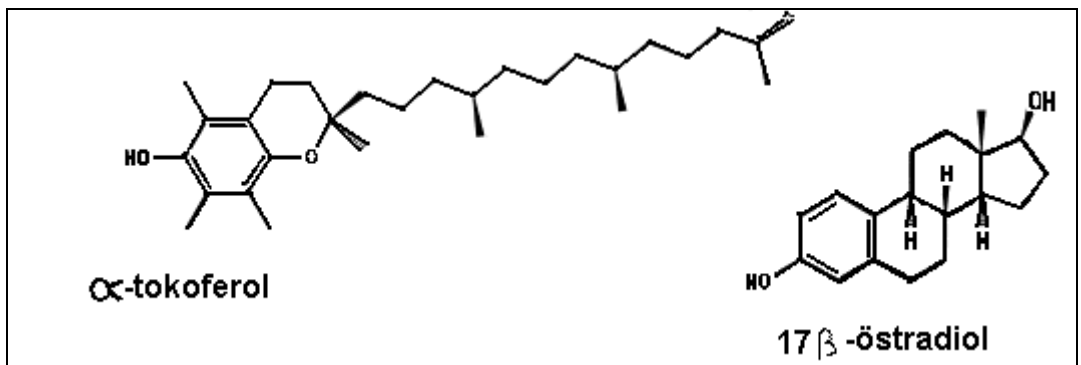
Tirozin, T₃, T₄, alfa-tokoferol ve östradiolün antioksidan kapasitelerini ayrı ayrı araştıran çalışmalar yapılmakla birlikte, bunların antioksidan güçlerini aynı çalışmada karşılaştıran çalışmaya rastlanmamıştır.



Şekil-3: Tirozin aminoasidinin yapısı



Şekil-4: Tiroid hormonlarının yapısı



Şekil-5: 17β-Östradiolün ve α-Tokoferolün yapısı

I.5. Oksidatif Strese Neden Olan Tablolardan Biri Olarak Hipertiroidi

Tiroid hormonları, tüm vertebralılarda pek çok gelişimsel ve fizyolojik olayları düzenler. T_4 ve T_3 'ün serum konsantrasyonları, hipotalamustan salgılanan tirotropin salgılatıcı hormon (TRH) ve pituiter tiroid stimule edici hormon (TSH) salgısının negatif geri besleyici döngüsü ve tiroid hormonlarını metabolize ya da aktive eden hormon bağımlı ve dokuya özgü iodo-tironin deiyodinaz enzimleri aracılığıyla düzenlenir (25).

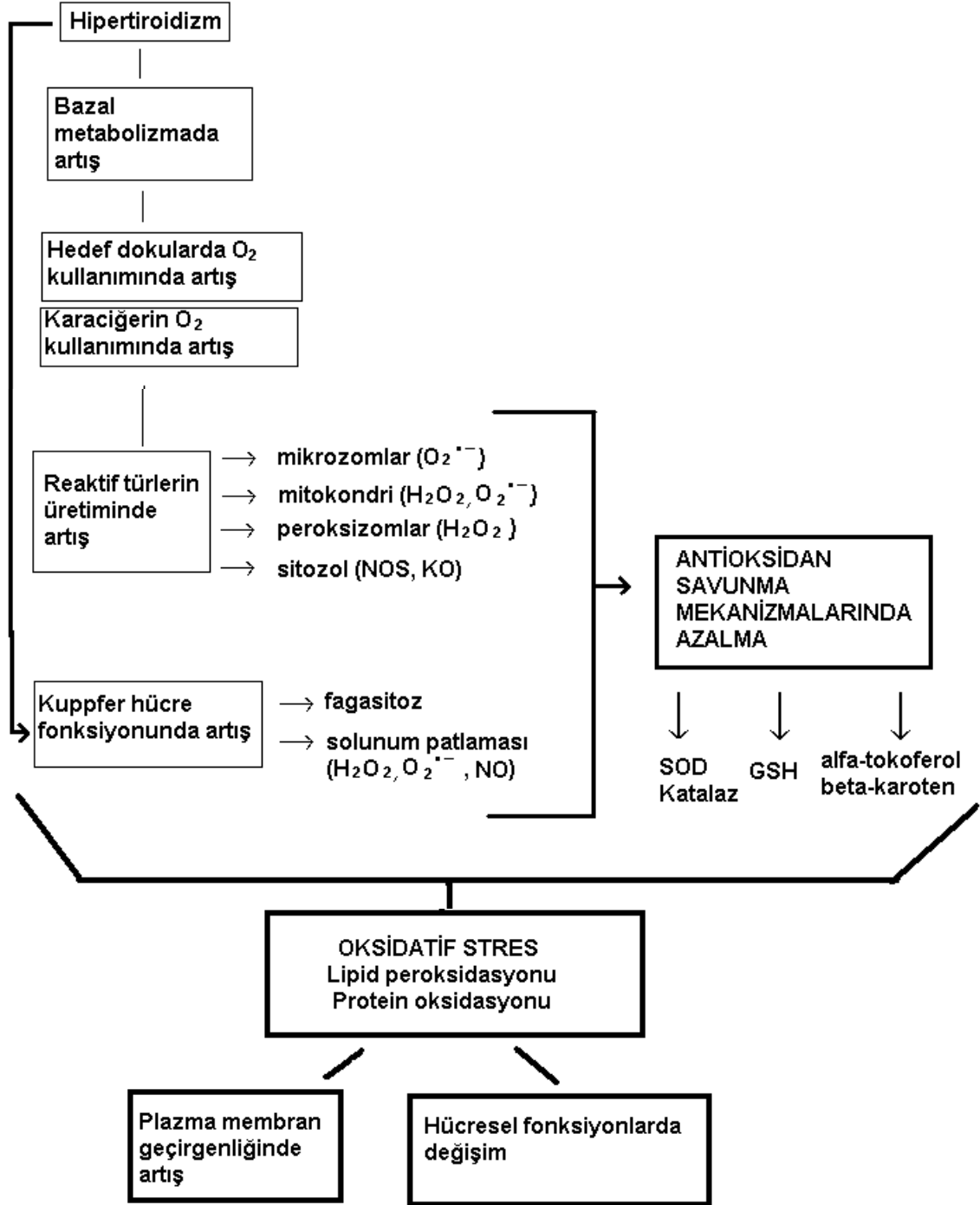
Tiroid hormonunun uzun dönem etkileri genellikle, T_3 'ün özgün çekirdek reseptör proteinlerine bağlanmasını gerektiren, gen transkripsiyonunda ve protein sentezinde artışa neden olan nükleer mekanizmalar sonucu meydana gelir (26).

Tiroid hormon seviyelerindeki değişimler, mitokondri solunumunun bilinen etkilerine bağlı olarak, in vivo ortamda hücrel oksidatif stresin ana fizyolojik düzenleyicilerinden biridir (27). Tiroid hormonlarının serumdaki seviyesinin yüksek olması, hipermetabolik klinik sendrom (tirotoksikozis) adı verilen durumun ortaya çıkmasına neden olabilir. Yaşam sürecini belirgin olarak kısaltan, hücrenin işlevlerinin bozulmasında ve hasarlanmasında ana mekanizmayı oluşturan oksidatif stres, bu durumun altında yatan nedendir. Hipertiroidideki hipermetabolik durumda bazı dokularda meydana gelen hasarın, oksidatif stresin oluşumunu sağlayan artmış ROT ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (28, 29).

Şekil 6'da gösterildiği gibi tiroid hormonuyla indüklenen oksidatif stres hedef dokularda, özellikle karaciğerde hücrel işlevlerin değişimiyle ilişkilidir (30). Hipertiroidik durumun insan ve deney hayvanlarının karaciğer işlevleri üzerine etkisini inceleyen bazı çalışmalar, hepatik plazma membranının stabilizasyonunun bozulmasının olasılıkla lipid (29) ve protein oksidasyonunun (31) kayda değer artışından kaynaklanabileceğini göstermektedir.

Tiroid hormonuyla karaciğerde indüklenen oksidatif stresin, protein oksidasyonu üzerine iki biyolojik yoldan etkili olduğu düşünülebilir. Birincisi, tiroidin kalorijenik etkisiyle artan ROT ve reaktif nitrojen türlerinin enzim aktivasyonunun azalmasına neden olarak protein fonksiyonunun kaybıdır. İkincisi, oksidatif stres sonucunda

modifikasyona uğrayan proteinlerin, proteolitik ataklara daha duyarlı hale gelerek degradasyonunda artmadır (30, 32).



Şekil-6: Hipertiroidide oksidatif stresin ortaya çıkışı ve sonuçları (30)
(NOS: Nitrik Oksid Sentaz; KO: Ksantin Oksidaz; NO: Nitrik Oksid)

Tez projemizde, yukarıda değinilen bulgular eşliğinde, tirozin amino asidinin ve tiroid hormonlarının olası antioksidan etkinliklerini in vitro ve in vivo ortamlarda incelemek amaçlanmıştır. Çalışmanın birinci basamağında, in vitro ortamda, tirozin, T₃, T₄, alfa-tokoferol ve östradiolün antioksidan kapasiteleri aynı koşullarda karşılaştırılmıştır. İkinci basamakta in vitro ortamda antioksidan etkinlikleri gösterilen tiroid hormonlarının ve tirozin amino asidinin oksidan-antioksidan denge ile ilişkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

II.1. Gereçler

II.1.1. Örnekler

II.1.1.1. İn Vitro Basamak İçin Serum Havuzu Hazırlanması:

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Biyokimya Laboratuvarı'nda tetkik için alınan hasta serumlarından havuz oluşturuldu. Serum havuzu, 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine ayrılarak, kullanılabildiği kadar $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de derin dondurucuda saklandı.

II.1.1.2. İn Vivo Basamak İçin Örnek Toplanması:

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahiliye Endokrinoloji Polikliniği'ne ve Bursa Devlet Hastanesi'ne başvuran, T_4 , T_3 , TSH hormon sonuçlarına göre hipertiroidi tanısı alan (serbest $T_4 > 1.81\text{ ng/l}$; serbest $T_3 > 4.2\text{ pg/ml}$; TSH $< 0.35\text{ }\mu\text{IU/ml}$), son 6 aydır tedavi görmeyen, beraberinde başka bir hastalığı olmayan erkek hastalar çalışmaya dahil edildi. Hastalara, çalışmanın içeriği hakkında bilgi verilerek, tez projesi dahilinde yapılan testlerin sonuçlarının, aldıkları hipertiroidi tedavisinin planını değiştirmeyeceği ve yapılan testlerin kendilerine herhangi bir maliyeti olmayacağı anlatılarak, yazılı izinleri alındı. Hipertiroidik (n=19) ve ötiroidik (n=15) durumda iken birer kez antekübital venlerinden kuru ve EDTA'lı tüplere kan alındı. SOD ve GPx tayininde kullanılmak üzere EDTA'lı tüplere alınan tam kan örnekleri buz dolabının üst rafında ($+4\text{ }^{\circ}\text{C}$) saklanıp, 1 hafta içinde çalışıldı. EDTA'lı ve kuru tüplere alınan kan 2000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek, plazma ve serum ayrıldı. Plazma, non-HDL fraksiyonunun oksidasyona duyarlılığı günlük çalışıldı. Serum amino asit içeriğinin, protein karbonil ve MDA miktarının ölçülmesi için ayrılan serum örneği $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Taze serum örneği, total kolesterol, HDL kolesterolü, VLDL kolesterolü, trigliserid, total protein, albumin ve globulin düzeyleri Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Biyokimya Laboratuvarı'nda aynı gün çalışıldı.

Hipertiroidi tanısı alıp, çalışmaya katılan hastaların tedavisinde Propiltiourasil kullanılmıştır.

II.1.2. Aletler:

- 1) Spektrofotometre, "Shimadzu U.V. 1202" (Japonya)
- 2) Su Banyosu, "Julabo UC" (Almanya)
- 3) Su Banyosu, "Nüve BM302" (Türkiye)
- 4) Santrifüj, "Sanyo Mistral 2000R" (İngiltere)
- 5) Karıştırıcı (vorteks), "Nüve110" (Türkiye)
- 6) Otomatik Pipet, (0.5-5ml'lik) "Scorex" (İsveç)
- 7) Otomatik Pipet, (25 µl'lik) "Gilson" (Fransa)
- 8) Otomatik Pipet, (10 µl'lik) "Gilson" (Fransa)
- 9) Otomatik Pipet, (200-1000 µl'lik) "Gilson" (Fransa)
- 10) Antikoagulansız Steril Vakumlu Tüp, (16×100mm) "Becton-Dickinson" (İngiltere)
- 11) Antikoagulan olarak Etilendiamin Tetraasetikasit (EDTA) içeren steril vakumlu tüp, (13×75mm) "Becton-Dickinson" (İngiltere)
- 12) Derin Dondurucu, "Arçelik" (Türkiye)
- 13) Su Isıtıcısı, "Heidolph MR3001" (Almanya)
- 14) pHmetre, "Chemtrix 600" (A.B.D)
- 15) Otoanalizör, "Aeroset-Abbott" (A.B.D)
- 16) HPLC Sistemi " HP 1100 series, Hewlett-Packard, Palo Alto" (A.B.D.)
- 17) Lityum Değişim Kolonu "seri no:5338, Hewlett-Packard, Palo Alto" (A.B.D.)
- 18) Dörtlü Pompa "kat no: G1311A, Hewlett-Packard, Palo Alto" (A.B.D.)
- 19) Fluorometrik Dedektör "kat no: G1321A, Hewlett-Packard, Palo Alto" (A.B.D.)

20) Otomatik Örnek Yükleyicisi "kat no: G1329A, Hewlett-Packard, Palo Alto"
(A.B.D.)

II.1.3. Ticari Kitler:

- 1) Süperoksid Dismutaz (Ransod) "Radox Lab." (İngiltere) Lot. No: 6667H,
Kat. No: SD125
- 2) Glutasyon Peroksidaz (Ransod) "Radox Lab." (İngiltere) Lot. No: 6667H,
Kat. No: RS505
- 3) Kolesterol (Enzymatic Endpoint Method) "Radox Lab." (İngiltere) Lot. No:
1256F, Kat. No: CH201
- 4) Aeroset Otoanalizör'de kullanılan Abbott marka kitlerin adları ve katalog
numaraları aşağıda belirtilmiştir:
Albumin (7D53-01)
Total protein (7D73-01)
Kolesterol (7D62-01)
Trigliserid (7D74-01)
HDL-kolesterol (7D67-01)

II.1.4. Kimyasal Maddeler:

- 1) Tiyobarbitürik asit (%98 <), "Merck" (Almanya) Kat. No: 1.08180.0025
- 2) 1,1,3,3 Tetraetoksipropan (%95<), "Fluka" (İsviçre) Kat. No: 86570
- 3) Triklorasetik asit "Merck" (Almanya) Kat. No: 100810
- 4) n-Bütül alkol (saf), "Merck" (Almanya) Kat. No: 100988
- 5) Etanol (derişik), "Riedel-de Haen" (Almanya) Kat. No: 32221
- 6) 2,4-Dinitrofenilhidrazin, "Merck" (Almanya) Kat. No: 103081
- 7) Guanidin hidroklorür, "Merck" (Almanya) Kat. No: 1.04220.1000
- 8) L(-)-Tirozin, "Merck" (Almanya) Kat. No: 816021
- 9) Etil asetat (saf), "Merck" (Almanya) Kat. No: 1.00864.2500
- 10) L-Tiroksin, "Sigma" (İsveç) Kat. No: T-2376
- 11) β -Östradiol, "Sigma" (Çin) Kat. No: E-8875

- 12) 3,3',5-Triiodo-L-tironine (%95-98), "Sigma" (Belçika) Kat. No: T-2877
- 13) (\pm)- α -Tokoferol, "Sigma" (Almanya) Kat. No: T-3251
- 14) Amonyum hidroksit, "Sigma" (Almanya) Kat. No: A-6899
- 15) Hidroklorik asit (%37), "Merck" (Almanya) Kat. No: 1.00317.3500
- 16) Kalliumdihidrojenfosfat, "Merck" (Almanya) Kat. No: 1.04871.1000
- 17) Bakır sülfatpentahidrat, "Merck" (Almanya) Kat. No: 102787
- 18) Etilendiamin tetraasetikasit (EDTA), "Merck" (Almanya) Kat. No: 108421
- 19) Potasyum siyanür, "Merck" (Almanya) Kat. No: 4966
- 20) Potasyum ferri siyanür, "Merck" (Almanya) Kat. No: 4971
- 21) HPLC sisteminde (HP 1100 series, Hewlett-Packard, Palo Alto) kullanılan Pickering Laboratories (A.B.D.)'den temin edilen ayıraçların adları ve katalog numaraları aşağıda belirtilmiştir:
 - Ortho-phthaldehyde (part no:O120)
 - Ortho-phthaldehyde diluent (part no:OD104)
 - Lithium regenerant (Kat. No: RG003)
 - Lithium eluent (Kat. No: LI280)
 - Lithium eluent (Kat. No: LI750)
 - Thiofluor (Kat. No: 3700-2000)
 - Seraprep (part. No: SP100)

II.2. Yöntemler

II.2.1. İn Vitro Basamakta Kullanılan Yöntemler:

II.2.1.1. Farklı Konsantrasyonlarda Antioksidanlar İçeren Serum Örneklerinde Bakırla İndüklenen Lipid Peroksidasyonun Ölçülmesi:

Prensip:

Lipid oksidasyon yan ürünlerinden biri olan MDA, serum lipidlerinin oksidasyona duyarlılıkları ölçüsünde, lipid peroksidasyonunu indükleyici bir madde olan bakırla serum örneklerinin 37 °C' de belirli zaman diliminde inkübe edilmesi sonucunda meydana gelir. Oluşan MDA, asidik ortamda yüksek ısı etkisi ile tiyobarbiturik asit (TBA) ile 532 nm'de absorbans veren pembe renkli bir kompleks oluşturur. MDA düzeyinin belirlenmesi ile serum lipidlerinin zaman içinde bakırla indüklenen oksidasyona olan duyarlılıkları anlaşılır.

Ayırıcılar:

- 1) Etilendiamin tetraasetikasit (EDTA), %1 (w/v)
- 2) CuSO₄ 2mM
- 3) TBA ayırıcı: 0.25 M HCl içinde, 26 mM tiobarbitürik asit ve 0.92 M trikloroasetik asit olacak şekilde hazırlandı.
- 4) 1,1',3,3' Tetraetoksipropan (TEP), 10 µM
- 5) Tirozin çalışma çözeltisi:
Tirozinden 461.0 mg tartılıp, 10 ml 1M HCl içinde vorteks yardımıyla çözülerek, 255 mM'lık stok çözelti elde edildi. Stok çözültiden distile su ile sulandırılarak 102 mM, 51 mM, 25.5 mM ve 12.75 mM 'lık tirozin çalışma çözülteleri hazırlandı.
- 6) Tiroksin (T₄) çalışma çözeltisi:
Oziol ve ark.'nın (22) uyguladığı gibi 8 mg T₄, 10 ml (300 µl etanol+ 300 µl NH₄OH+ 9.400 ml distile su) içinde çözülüp, 1030 µM'lık stok çözelti elde edildi. Stok çözültiden distile su ile sulandırılarak 102 µM , 51 µM, 25.5 µM ve 12.75 µM 'lık T₄ çalışma çözülteleri hazırlandı.
- 7) Triiodotironin (T₃) çalışma çözeltisi:
Oziol ve ark.'nın (22) uyguladığı gibi 8 mg T₃, 10 ml (300 µl etanol + 300 µl NH₄OH + 9.400 ml distile su) içinde çözülüp, 1228 µM'lık stok çözelti elde edildi. Stok çözültiden distile su ile sulandırılarak 102µM, 51 µM, 25.5 µM ve 12.75 µM 'lık T₃ çalışma çözülteleri hazırlandı.
- 8) 17β-östradiol (E₂) çalışma çözeltisi:
Ruiz Larrea ve ark.'nın (34) hazırladığı gibi 5.55 mg 17β-östradiol, 10 ml saf etanol içinde çözülerek, 2040 µM'lık stok çözelti elde edildi. Stok çözültiden

saf etanol ile seyreltilerek 102 μM , 51 μM , 25.5 μM ve 12.75 μM 'lık E_2 çalışma çözeltileri hazırlandı.

9) α -Tokoferol çalışma çözeltisi:

Beş gram α -tokoferol 100 ml saf etanol içinde çözülerek (110.3 mM), kahverengi şişelere konup, kullanılabildiği kadar -20 °C'de saklandı. Stok çözeltiden saf etanol ile seyreltilerek 102 μM , 51 μM , 25.5 μM ve 12.75 μM 'lık α -tokoferol çalışma çözeltileri hazırlandı. Yapılan her deney basamağı karanlık ortamda gerçekleştirildi.

Örneklerin Hazırlanması

Derin dondurucuda (-20 °C) saklanan serum havuzu örnekleri oda sıcaklığında çözülmeye bırakıldı ve 1/10 oranında distile su ile seyreltildi. 500 μl sulandırılmış serum içine 10 μl uygun antioksidan çalışma çözeltisi eklenerek son hacmi 510 μl olan örnekler elde edildi. Böylece tirozinin seyreltilmiş serum içindeki son konsantrasyonu 2, 1, 0.5 ve 0.25 mM olacak şekilde ayarlanırken T_4 , T_3 , E_2 ve α -tokoferolün son konsantrasyonları 2, 1, 0.5 ve 0.25 μM olacak şekilde ayarlandı. Antioksidan içermeyen örneklere (kontrol) ise antioksidan çalışma çözeltisi için kullanılan çözücüden 10 μl eklendi.

Deneyin Yapılışı:

Antioksidan içeren 510 μl 'lik karışımlara 2 mM'lık CuSO_4 'dan 50 μl eklenerek lipid peroksidasyonu başlatıldı. Tüpler 37 °C'de 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 dakika inkübe edildi. Her inkübasyon süresi için 4'er örnek çalışıldı. İnkübasyon süresi sonunda tüpler buzlu suya aktarılıp, üzerlerine 25 μl %1'lik EDTA pipetlenerek, oksidasyon durduruldu. Oluşan MDA miktarı Zhang ve ark.'nın (35) tarif ettiği şekilde aşağıdaki gibi belirlendi:

Her tübe 2 ml TBA ayırıcı pipetlendi. Vortekslenip, kaynayan suda 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda tüpler buzlu su içeren bir kaba aktarılıp, soğutuldu ve üzerlerine 2.5 ml n-butanol pipetlenip, vortekslenildi.

1500 g'de 10 dakika santrüfjü edildi. Üstteki pembe renkli organik fazın 532 nm'de absorpsansı 0. dakikada peroksidasyonu durdurulan deney tüpünün absorpsansına karşı okundu. Sonuçlar, ml serumda nmol MDA değışimi (Δ MDA) olarak aşığıdaki gibi hesaplandı.

MDA değışimi (nmol MDA/ml serum) =

$$\frac{\text{A numune}}{\text{A standart}} \times \text{standartın konsantrasyonu}$$

II.2.1.2. FA KONSANTRASYONLARDA ANTIÖKSİDANLAR İÇEREN SERUM

Örneklerinde Protein Karbonil Miktar Belirtimi:

Prensip:

Protein karbonilleri, 2,4 dinitrofenil hidrazinle reaksiyona girerek, 2,4 dinitrofenil hidrozonları oluşturur. Ultraviöle dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülen hidrazon miktarı, serum protein karbonil miktarıyla doğru orantılıdır.

Ayıracılar:

- 1) HCl 2.5 M
- 2) 2,4-Dinitrofenilhidrazin (DNPH), 10 mM (2.5 M HCl içinde)
- 3) Triklor asetik asit (TCA), (w/v) %20
- 4) Triklor asetik asit (TCA), (w/v) %10
- 5) Etil alkol : Etil asetat (1:1), (v/v)
- 6) Guanidin hidroklorür 6M (20 mM KH_2PO_4 içerir, derişik HCl ile pH 2.3'e ayarlandı.)
- 7) BSA standart serisi:

Sırasıyla, 0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 ve 3.00 mg BSA 1'er ml 6 M Guanidin hidroklorür içinde çözüldü ve 280 nm'de 6 M Guanidin hidroklorür 'e karşı okundu.

8) Tirozin çalışma çözeltisi:

Tirozinden 452.5 mg tartılıp, 10 ml 1M HCl içinde vorteks yardımıyla çözülerek, 250 mM'lık stok çözelti elde edildi. Stok çözeltiden distile su ile sulandırılarak 40 mM, 20 mM, 10 mM ve 5 mM 'lık tirozin çalışma çözeltileri hazırlandı.

9) Tiroksin (T₄) çalışma çözeltisi:

Oziol ve ark.'nın (22) uyguladığı gibi 3.1 mg T₄, 10 ml (300 µl etanol+ 300 µl NH₄OH+ 9.400 ml distile su) içinde çözülüp, 400 µM'lık stok çözelti elde edildi. Stok çözeltiden distile su ile sulandırılarak 40 µM, 20 µM, 10 µM ve 5 µM 'lık T₄ çalışma çözeltileri hazırlandı.

10) Triiodotironin (T₃) çalışma çözeltisi:

Oziol ve ark.'ın (22) uyguladığı gibi 5.3 mg T₃, 10 ml (300 µl etanol+ 300 µl NH₄OH+ 9.400 ml distile su) içinde çözülüp, 800 µM'lık stok çözelti elde edildi. Stok çözeltiden distile su ile sulandırılarak 40 µM, 20 µM, 10 µM ve 5 µM 'lık T₃ çalışma çözeltileri hazırlandı.

11) β-Östradiol (E₂) çalışma çözeltisi:

Ruiz Larrea ve ark.'nın (34) hazırladığı gibi 5.45 mg östradiol, 10 ml saf etanol içinde çözülerek, 2000 µM'lık stok çözelti elde edildi. Stok çözeltiden etanol ile seyreltilerek 40 µM, 20 µM, 10 µM ve 5 µM 'lık E₂ çalışma çözeltileri hazırlandı.

12) α-Tokoferol çalışma çözeltisi:

Beş gram α-tokoferol 100 ml saf etanol içinde çözülerek (110.3 mM), kahverengi şişelere konup, kullanılabildiği kadar -20 °C'de saklandı. Elde edilen 110.3 mM'lık stok çözeltiden etanol ile seyreltilerek 40 µM, 20 µM, 10 µM ve 5 µM 'lık E₂ çalışma çözeltileri hazırlandı. Yapılan her deney basamağı karanlık ortamda gerçekleştirildi.

Örneklerin Hazırlanması:

Derin dondurucuda (-20 °C) saklanan serum havuzu örnekleri oda sıcaklığında çözülmeye bırakıldı. Elli µl serum üzerine 900 µl distile su ve 50 µl uygun antioksidan çalışma çözeltisi eklenerek, 1/20 oranında sulandırılmış serum elde edildi. Böylece tirozinin seyreltilmiş serum içindeki son konsantrasyonu 2, 1, 0.5 ve 0.25 mM olacak şekilde ayarlanırken, T₄, T₃, E₂ ve α-tokoferolün son konsantrasyonu 2, 1, 0.5 ve 0.25 µM olacak şekilde ayarlandı.

Antioksidan içermeyen örnekler (kontrol) ise 50 µl serum üzerine 900 µl distile su ve 50 µl antioksidan çalışma çözeltisi için kullanılan çözücü eklenerek elde edildi. Her antioksidanın her bir konsantrasyonu için 4'er örnek çalışıldı. Serum karbonil miktarı Levine ve ark.'nın (35) tarif ettiği şekilde aşağıdaki gibi belirlendi:

Deneyin Yapılışı:

Bir ml sulandırılmış örnek üzerine 4 ml DNPH pipetlenerek, vorteks yardımıyla karıştırıldı. Her numune için ayrı kör hazırlandı. Kör tüpüne de 1 ml sulandırılmış örnek ve 4 ml HCl (DNPH' nin hazırlanmasında kullanıldı) pipetlenip, vorteks yardımıyla karıştırıldı. 1 saat oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. Bu süre içinde 15 dakikada bir deney tüpleri vortekslendi. İnkübasyon süresinin sonunda her deney tüpüne 5'şer ml %20 TCA pipetlenip, iyice karışması sağlandı. 10 dakika buz kovaşında bekletilip, 2000 rpm'de 10 dakika santrüfjü edildi. Süpernatant otomatik pipetle aspire edilip, atıldı. Geriye kalan protein peletlerinin üzerine, 4 ml %10 TCA eklenip, cam baget yardımıyla peletlerin çözülmesi sağlandı ve 2000 rpm'de 10 dakika santrüfjü edildi. Süpernatant otomatik pipetle aspire edilip, atıldı. Geriye kalan protein peletlerinin üzerine, 4 ml etil alkol:etil asetat pipetlendi. Peletler cam baget yardımıyla vortekslenerek çözüldü. Peletler bu şekilde 3 kere yıkandıktan sonra üzerlerine, 2 ml Guanidin hidroklorür pipetlenip, 10 dakika 37 °C'de inkübe edilerek,

peletlerin çözülmesi sağlandı. Örnekler 340-370 nm arasında her dalga boyunda köre karşı sıfırlanarak okunup, en yüksek absorbands saptanarak, hesaplama için kullanıldı. Protein karbonil miktarının hesaplanması aşağıdaki formüle göre yapıldı:

$$A = \epsilon \times b \times c$$

(A=absorbans; $\epsilon = 22\ 000\ M^{-1}\ cm^{-1}$; b=1 cm; c= nmol protein karbonil miktarı/ml)

$$\text{nmol protein karbonil miktarı / ml pellet çözeltisi} = \frac{\text{Absorbans}}{22000M^{-1}}$$

Kör tüplerin absorbandsları 280 nm'de okunarak, sığır serum albumininden hazırlanan standart eğri grafiğine ($y=0.52x + 0.029$) göre protein miktarları mg protein / ml pellet çözeltisi olarak hesaplandı. Serum örneğinin karbonil içeriği, mg protein başına düşen nanomol karbonil olarak ifade edildi.

II.2.2. İn Vivo Basamakta Kullanılan Yöntemler:

II.2.2.1. Plazmada Bakırla İndüklenen non-HDL Oksidasyonu:

Prensip:

Dekstran sülfat-MgCl₂ yardımıyla çöktürülerek ayrılan serum non-HDL kolesterol 37 °C'de belirli bir süre bakırla inkübe edilerek peroksidasyon indüklenir. MDA ölçümü (II.2.1.1'de tarif edildiği gibi) ile numunedeki non-HDL fraksiyonun zaman içinde oksidasyona olan duyarlılığı saptanır.

Ayırıcılar:

- 1) Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), %1 (w/v)
- 2) CuSO₄ 0.5 mM

- 3) TBA ayıracağı: 0.25 M HCl içinde, 26 mM tiobarbitürik asit ve 0.92 M trikloroasetik asit olacak şekilde hazırlandı.
- 4) 1,1,3,3-Tetra etoksi propan (TEP), 10 nmol/ml Etil alkol (v/v)
- 5) Çöktürücü ayıracağı (Dekstran sülfat/magnezyum klorür solusyonu): Dekstran sülfat 20g/l (w/v) ve MgCl₂ 190.6 g/l (w/v) hazırlandı. Kullanılmadan önce 1:1 oranında (v/v) karıştırılıp, çözeltinin pH'ı 1M HCl ile 7.0'a ayarlandı.
- 6) Fosfat tamponu (PBS) %0.9: Tampon içeriği 0.15 M NaCl ve 10 mM NaH₂PO₄ içerecek şekilde hazırlandı ve pH 7.0'a 1M NaOH ile ayarlandı.
- 7) Fosfat tamponu (PBS) %4: Tampon içeriği 0.68 M NaCl ve 10 mM NaH₂PO₄ içerecek şekilde hazırlandı ve pH 7.0'a 1M NaOH ile ayarlandı.

Deneyin Yapılışı:

Çalışmaya katılan hastalardan EDTA'lı tüplere alınan tam kan örnekleri, 1500 g'de 15 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. 1 ml plazma, 1 ml distile su ile 1:1 dilue edilip, üzerine 0.200 ml çöktürücü ayıracağı pipetlendi. 1 dakika vortekslenip, 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 1500 g'de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Non-HDL fraksiyon tüpün dibine çöktükten sonra EDTA ve HDL içeren süpernatant döküldü. Peletler 2 ml %0.9 PBS içinde süspansiyon edildi. Üzerine 0.100 ml çöktürücü ayıracağı pipetlenip, vortekslenip ve tekrar 1500 g'de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Süpernatant tekrar dökülerek, pelet %4'lük PBS ile cam baget yardımıyla non-HDL süspansiyonu elde edildi. Bu süspansiyonun kolesterol içeriği II.2.2.2.'de anlatıldığı gibi kolesterol enzimatik kiti ile belirlendi.

Her süspansiyonun kolesterol içeriği %4'lük PBS ile 200 µg/ml'ye ayarlandıktan sonra örneklerden 500'er µl 2'şer deney tüpüne pipetlenip, 50 µl 0.5 mM CuSO₄ ile oksidasyon başlatıldı. Tüplerden birincisinin oksidasyonu 0. dakikada durdurulurken, ikinci tüp 37 °C'de 180 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda tüpler buzlu suya aktarılıp, üzerlerine 25 µl %1'lik EDTA pipetlenip, oksidasyon durduruldu.

Oluşan MDA miktarı Zhang ve ark.'nın (36) tarif ettiği yöntemle II.2.1.1.'te anlatıldığı gibi belirlendi. İnkübasyonun 0. ve 180. dakikalarında oluşan MDA miktarı aşağıdaki formülle ayrı ayrı hesaplandı.

Numunenin MDA konsantrasyonu (nmol MDA / ml plazma) =

A numune
----- × TEP standardının konsantrasyonu
A standart

Sonuçlar aşağıda gösterildiği gibi mg non-HDL kolesterol başına düşen, nmol MDA eşdeğeri olarak verildi.

nmol MDA / ml plazma
----- = nmol MDA / mg non-HDL kolesterol
mg non-HDL kolesterol / ml plazma

II.2.2.2. Plazma Non-HDL Kolesterol Miktar Belirtimi :

Prensip:

Kolesterol esterlerinin enzimatik hidroliz ve oksidasyonundan açığa çıkan hidrojen peroksid, fenol ve 4-aminoantipirin ile peroksidasyona sokularak, indikatör olan “quinoneimine” oluşturulur. “Quinoneimine” nin 500 nm'deki absorbansı kolesterol konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Kolesterol esteraz

Kolesterol-ester + H₂O -----> Kolesterol + yağ asitleri

Kolesterol oksidaz

Kolesterol + O₂ -----> Kolest-3-on + H₂O₂

peroksidaz

2H₂O₂ + fenol + 4-aminoantipirin -----> quinoneimine +H₂O

Ayıracılar:

- 1) Tamponun içeriği: 4-Aminoantipirin 0.30 mM
Fenol 6mM
Peroksidaz ≥ 0.5 U/ml
Kolesterol esteraz ≥ 0.15 U/ml
Kolesterol oksidaz ≥ 0.1 U/ml
Pipes tamponu 80mM; pH 6.8
- 2) Kolesterol standardı: 5.17mM (200 mg/dl)

Deneyin Yapılışı:

Non-HDL süspansiyonu II.2.2.1.'de tarif edildiği gibi hazırlandı.

	Kör	Örnek	Standart
Non-HDL süspansiyon	-	10 μ l	-
Distile su	10 μ l	-	-
Kolesterol standardı (200 mg/dl)	-	-	10 μ l
Tampon	1 ml	1ml	1ml

Yukarıdaki deney şemasında açıklanan şekilde hazırlanan tüpler, vorteks yardımıyla karıştırıldı. +20 ile +25 °C'de 10 dakika ya da 37 °C'de 5 dakika inkübe edildi. Numunenin absorbansı köre karşı 500 nm'de okundu. Sonuçlar aşağıdaki gibi dl plazmada mg non-HDL kolesterol olarak hesaplandı.

Numunenin non-HDL kolesterol konsantrasyonu (mg / dl plazma) =

A numune

----- × kolesterol standardının konsantrasyonu

A standart

II.2.2.3. Serumda MDA Düzeyinin Ölçülmesi

Prensip:

Serum MDA düzeyi, Kamal ve ark.'nın (37) tarif ettiği tiyobarbitürik asit (TBA) ile MDA'in asidik ortamda yüksek ısının etkisi ile pembe renkli bir kompleks oluşturması ve bu rengin 535 nm dalga boyundaki şiddetinin ölçülmesi prensibine dayanır.

Ayırıcılar:

- 1) Triklor asetik asit (TCA), %20'lik (w/v)
- 2) 1,1,3,3-Tetraetoksiopropan (TEP), 10 nmol/ml Etil alkol
- 3) Tiyobarbitürik asit (TBA), %0.67'lik (w/v)
- 4) n-Bütil alkol (saf)

Deneyin Yapılışı:

	Kör	Numune	Standart
Distile su	0.250 ml	-	-
Serum	-	0.250	-
1,1',3,3' TEP	-	-	0.250
TCA	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
TBA	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

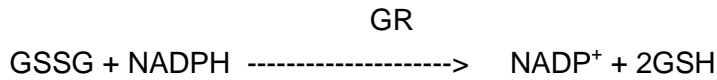
Serum örnekleri ölçüm yapılana dek $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Yukarıdaki deney şemasında açıklanan şekilde hazırlanan tüpler, vorteksle karıştırıldı ve 30 dakika kaynar su banyosunda tutuldu. Tüpler kaynar su banyosundan alınarak buzlu suda hızla soğutuldu. Daha sonra her bir tübe 4 ml n-bütanol pipetlenerek vortekslendi ve spektrofotometrede 535 nm dalga boyunda köre karşı absorban okundu. MDA konsantrasyonu aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{Serum MDA (nmol/ ml)} = \frac{A_{\text{örnek}}}{A_{\text{standart}}} \times \text{standartın konsantrasyonu (10 nmol/ml)}$$

II.2.2.4. Eritrosit Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesinin Ölçülmesi:

Prensip:

Glutasyon peroksidaz aktivesi Ransel RS 505 kiti (RANDOX, İngiltere) kullanılarak ölçüldü. GPx enzimi, glutasyonun kümenhidroperoksid tarafından oksidasyonunu katalizlemektedir. Meydana gelen okside glutasyon (GSSG), glutasyon redüktaz (GR) ve NADPH varlığında hızla redükte olurken, aynı anda NADPH okside olarak NADP^+ ' ye dönüşmektedir. Bu dönüşüm sırasında 340 nm'deki absorpsiyon değişimi (ΔA) GPx aktivitesi ile doğru orantılıdır.



Ayırıcılar:

- 1) Ransel ayıracağı: GSH (4mmol/L) GR (≥ 0.5 Ü/L) ve NADPH (0.28 mmol/L)
- 2) Ransel tamponu: pH'sı 7.2 olan ve (4.3 mmol/L) EDTA içeren 0.05 M fosfat tamponudur. 1 no'lu ayıracağı 2 no'lu tampon ile karıştırılarak çalışma çözeltisi elde edildi. Bu ayıracağı +4 °C'de saklandığında 48 saat stabilitesini korumaktadır.
- 3) Ransel kümenhidroperoksit 0.18 mmol/L
- 4) Ransel sulandırıcı ayıracağı
- 5) Drapkin ayıracağı: 50 mg potasyum siyanür ve 200 mg potasyum ferri siyanür tartılarak hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı:

GPx aktivitesi tayini için ayrılan tam kan +4°C'de saklanarak en geç 1 hafta içinde çalışıldı. GPx aktivitesinin ölçümü için, 50 µl tam kan 1ml Ransel sulandırıcı ayıracağı ile seyreltilerek hemolizat elde edildi ve 5 dakika bekletildikten

sonra 1 ml Drapkin ayırıcı karıştırıldı. Bu karışım en geç 20 dakika içinde kullanıldı. 1 ml Ransel çalışma çözeltisi üzerine yukarıdaki karışımdan 20 µl konuldu. 37 °C'de su banyosunda 5 dakika bekletildikten sonra reaksiyonu başlatmak için üzerine kümenhidroperoksit çözeltisinden 40 µl ilave edildi. Bir dakika sonra başlangıç absorbansı kaydedilerek süre başlatıldı. Birinci dakika ve 2. dakikada absorbanstaki azalma kaydedildi. Buradan dakikadaki absorbans farkı bulundu. Ölçümler spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda yapıldı.

Hemoglobin (Hb) ölçümü için Boehringer Mannheim GmbH Diagnostica Cat.No.124729'nin hemoglobin ölçüm metodu esas alındı. 20 µL tam kan, 5 mL Drapkin ayırıcıyla iyice karıştırıldı. 3 dakika sonra 546 nm'de numunenin absorbansı distile su körüne karşı okundu. Hemoglobin konsantrasyonu aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$[\text{Hb}] \text{ g/dL} = 36.77 \times \text{absorbans}_{546 \text{ nm}}$$

Enzim aktivitesinin hesaplanması kit katoloğunda tarif edildiği gibi aşağıdaki şekilde yapıldı. Sonuçlar, g hemoglobin başına Ünite olarak verildi.

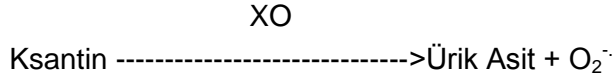
$$\begin{aligned} \text{Ü/hemolizat} &= 8412 \times (\Delta A/\text{dk numune} - \Delta A/\text{dk kör}) = a \\ 41 \times a &= \text{Ü/L tam kan} = b \\ b/(\text{g Hb/L}) &= \text{GPx Ü / g Hb} \end{aligned}$$

II.2.2.5. Eritrosit Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçülmesi:

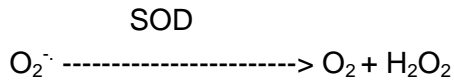
Prensip:

SOD aktivitesi Ransod SD 125 kiti (RANDOX, İngiltere) kullanılarak ölçüldü. Bu yöntemle ksantin, ksantin oksidaz (XO) enziminin katalizi ile süperoksit radikali (O_2^-) oluşturarak 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-fenoltetrozolyumklorür (İNT) ile reaksiyona girer ve pembe renkli bir bileşik oluşturur. Bilindiği gibi SOD O_2^- radikalinin dismutasyonunu gerçekleştirir. Burada SOD aktivitesinin

ölçümü, yukarıdaki reaksiyonun inhibisyon derecesinin ölçülmesine dayanmaktadır. Açığa çıkan pembe renk SOD aktivitesi ile ters orantılıdır.



Bu reaksiyon sonucu meydana gelen O_2^- radikali ya İNT ile reaksiyona girerek pembe renkli bir bileşik oluşturur veya SOD enziminin katalizlediği bir reaksiyon ile dismutasyona uğrayarak H_2O_2 ve O_2 oluşturur. SOD aktivitesi arttıkça İNT ile reaksiyona giren O_2^- miktarı azaldığı için reaksiyon inhibe olur.



Ayırıcılar:

- 1) Fosfat tamponu 0.01M: 0.68 g KH_2PO_4 ve 0.71 g Na_2HPO_4 tartılarak 9 dl distile suda çözüldü ve pH'sı kontrol edilip, 1 L'ye tamamlandı. pH 7.0' ayarlandı.
- 2) Ransod substrat (Ksantin 0.05 mmol/L; İNT 0.025 mmol/L)
- 3) Ransod tampon (CAPS 50 mmol/L; pH 10.2; EDTA 0.94 mmol/L içeren bu solusyon, Ransod substrat çözeltilisinin hazırlanmasında kullanılmıştır.)
- 4) Ransod XO (80Ü/L)
- 5) Ransod standart (5.4 Ü/ml)
- 6) Drapkin ayırıcı: 50 mg potasyum siyanür ve 200 mg potasyum ferri siyanür tartılarak hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı:

SOD aktivitesi tayini için ayrılan tam kan +4 °C'de saklanarak en geç bir hafta içinde çalışıldı. SOD aktivitesi ölçümü için 0.5 ml tam kan alındı ve 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek plazması ayrıldı. Daha sonra plazma otomatik pipet yardımıyla aspire edilerek uzaklaştırıldı. Kalan eritrositler, her yıkamada 3ml %0.9 NaCl kullanılarak 4 defa yıkandı. Yıkamış eritrositlerin hacmi, soğuk distile su ile 2 ml'ye tamamlanarak karıştırıldı ve +4 °C'de 15 dakika bekletilerek hemolizat elde edildi. Hemolizat 0.01 M fosfat tamponu (pH 7.0) ile 25 kez sulandırıldı. Böylece ilk başta alınan 0.5 ml tam kan 100 defa sulandırılmış oldu. Deney aşağıdaki şemada gösterildiği şekilde ve 37 °C'de gerçekleştirildi.

	Kör	Numune	Standart
Fosfat tamponu	50 µl	-	-
Dilue hemolizat	-	50 µl	-
Standart	-	-	50 µl
Substrat	1.7 ml	1.7 ml	1.7 ml

Karıştırıldı

XO	250 µl	250 µl	250 µl
----	--------	--------	--------

XO pipetlenerek reaksiyon başlatıldı ve 30 saniye sonra her bir tüp için spektrofotometrede 505 nm dalga boyunda absorbanı sıfırlandı ve tam 3 dakika sonra son absorbanı kaydedilerek $\Delta A/dk$ hesaplandı. SOD aktivitesi, iki seri standart eğri grafiği ($1/y=a + b / x$) üzerinden aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$Y = \% \text{ inhibisyon}; a=0.00118; b=0.00758; x = \text{SOD U/ml Hemolizat}$$

$$100 - \frac{(\Delta A_{\text{örnek}} / \text{dk} \times 100)}{(\Delta A_{\text{kör}} / \text{dk})} = y$$

$$\frac{0.00758}{(1/y) - 0.018} \times 100 = \text{SOD Ü / ml tam kan}$$

Hemoglobin (Hb) ölçümü için Boehringer Mannheim GmbH Diagnostica Cat.No.124729'nin hemoglobin ölçüm metodu esas alındı. 20 µL tam kan, 5 mL Drapkin ayıracıyla iyice karıştırıldı. 3 dakika sonra 546 nm'de numunenin absorbansı distile su körüne karşı okundu. Hemoglobin konsantrasyonu aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$[\text{Hb}] \text{ g/dL} = 36.77 \times \text{absorbans}_{546 \text{ nm}}$$

Enzim aktivitesi g hemoglobin başına Ünite olarak verildi.

$$\frac{\text{SOD Ü / ml tam kan}}{\text{g Hb / ml tam kan}} = \text{SOD Ü / g Hb}$$

II.2.2.6. Serumda Protein Karbonil Miktarı Belirtilmesi:

Eksi 20 °C'de saklanan hasta serumları oda ısısında çözüldükten sonra örnekler 1/20 oranında distile su ile sulandırılarak, deney II.2.1.2'te anlatıldığı gibi yürütüldü.

II.2.2.7. Serumda Total Protein, Albumin, Globulin Miktar Ölçümü:

Hastalardan alınan taze serum örneklerinde total protein, albumin, globulin miktarının değerlendirilmesi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Merkez Laboratuvarı'nda otoanalizör ile (Aeroset TM System-Abbott, A.B.D.) yapıldı.

II.2.2.7.1. Total Protein Miktarının Ölçümü:

Prensip:

En az iki peptid bağı içeren polipeptidler biüret ayıracıyla reaksiyona girer. Bu yöntem, proteinlerin peptid bağlarının alkali ortamda, bakır iyonlarıyla oluşturdukları mor renkli bir kompleksin renk şiddetinin 540 nm dalga boyunda ölçülmesi prensibine dayanır.

Ayıracın İçeriği:

Sodyum potasyum tartrat	23.4 mM
Sodyum hidroksit	613 mM
Potasyum iodid	6.6 mM
Bakır sülfat	13.2 mM

Serum total proteini mg/dl olarak hesaplandı.

II.2.2.7.2. Albumin Miktarının Ölçümü:

Prensip:

Bromkrezol yeşilinin insan albuminini seçici olarak bağlayıp renkli bir bileşik oluşturması prensibine dayanır. Oluşan renkli bileşiğin 628 nm'de ölçülen absorbansı numunedeki albumin konsantrasyonuyla doğru orantılıdır.

Ayıracın içeriği:

Bromkrezol Yeşili	0.27 mM
TRIS (hidroksimetilaminometan)	55 mM
Süksinik asit	100 mM
Timerosal	0.250 g/L

Albumin miktarı, mg/dl serum olarak ifade edildi.

II.2.2.7.3. Globulin Miktarının Belirtilmesi:

Serum globulin miktarı, serum total protein değerinden serum albumin miktarının çıkarılması ile elde edilmiştir.

II.2.2.8. Lipid Profilinin Değerlendirilmesi:

Hastalardan alınan taze serum örneklerinde lipid profilinin değerlendirilmesi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Merkez Laboratuvarı'nda otoanalizör ile (Aeroset TM System-Abbott, A.B.D.) yapıldı.

II.2.2.8.1. Kolesterol Miktarının Ölçümü:

Prensip:

Kolesterol esterleri, enzimatik yolla kolesterol ve serbest yağ asitlerine hidroliz olur. Serbest kolesterol, kolesterol oksidaz enzimiyle kolest-4-en-3-ona ve hidrojen peroksida okside edilir. Hidrojen peroksit, hidroksibenzoik asit (HBA) ve 4-aminoantipirin ile birleşerek 500 nm'de ölçülen "quinoneimine" adlı renkli bileşiği oluşturur.

Ayracın içeriği:

Kolesterol oksidaz (Mikrobal)	>200 U/L
Kolesterol esteraz (Mikrobal)	>500 U/L
Peroksidaz (Yabanturbu)	>300 U/L
4-Aminotipirin	0.25 mM
HBA	10 mM
Tampon	50mM

Kolesterol miktarı, mg/dl serum olarak ifade edidi.

II.2.2.8.2. Trigliserid İçeriğinin Ölçümü:

Prensip:

Trigliseridler, lipazla enzimatik olarak serbest yağ asitlerine ve gliserole hidroliz edilir. Gliserol, gliserol kinaz (GK) aracılığıyla adenzin trifosfatla (ATP) fosforillenir ve gliserol-3-fosfat ve adenzin difosfat oluşur. Gliserol-3-fosfat, dihidroksiaseton fosfata gliserol fosfat oksidaz aracılığıyla, hidrojen peroksid (H_2O_2) üreterek okside olur. Peroksidazla katalizlenen renk reaksiyonunda, H_2O_2 , 4-aminoantipirin ve 4-klorofenol ile reaksiyona girerek, kırmızı renkli bir bileşik oluşturur. Bu rengin absorbansı, numunedeki trigliserid konsantrasyonuyla doğru orantılıdır.

Ayıracın içeriği:

ATP	2.5 mM
Mg ⁺²	2.5 mM
4-Aminoantipirin	0.4 mM
4-Klorofenol	2 mM
Peroksidaz (yabanturbu)	>2000 U/L
GK (Mikrobial)	>600 U/L
GPO (Mikrobial)	>6000 U/L
Lipoprotein lipaz (mikrobial)	>3000 U/L
Tampon	55 mM

Trigliserid miktarı, mg/dl serum olarak ifade edidi.

II.2.2.8.3. HDL Kolesterolünün Ölçülmesi:

Prensip:

Ticari kitin ilk ayırıcının içindeki polianyon HDL, LDL, VLDL ve şilomikronlarla bileşik oluşturur. İkinci ayıraçtaki deterjan sadece HDL partiküllerini çözer. Salınan HDL kolesterol, kolesterol eseteraz ve kolesterol oksidaz ile reaksiyona girip, kromojenlerin varlığında renklenir. Rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülür.

Ayıraç1'in İçeriği:

Polianyon	≤0.1%
4-Aminoantipirin	≤0.1%
MES Tamponu	≤3.0%
Askorbik Asit Oksidaz	≤5000 U/L

Ayıraç 2'nin İçeriği:

Kolesterol oksidaz	≤2000 U/L
Kolesterol esteraz	≤3000 U/L
Peroksidaz	≤5000 U/L
Deterjan	≤0.1%
N,N-bis (4-sulfobutil)-m-toluidine, disodyum (DSBmT)	≤0.05%
MES Tamponu	≤3.0%

HDL kolesterol miktarı, mg/dl serum olarak ifade edildi.

II.2.2.8.4. LDL Kolesterolünün Hesaplanması:

LDL kolesterolü aşağıda belirtilen Friedewald formülüne göre hesaplandı ve mg / dl serum olarak ifade edildi (38).

$$\text{LDL-kolesterolü} = \text{total kolesterol} - (\text{HDL-kolesterol} + \text{trigliserid} / 5)$$

II.2.2.9. Serum Aminoasit Miktarının Belirlenmesi:

Serum amino asitlerinden taurin, aspartik asit, treonin, serin, glutamik asit, glutamin, glisin, alanin, sitrulin, valin, metionin, izolösin, lösin, tirozin ve fenilalaninin konsantrasyonları Yüksek Performanslı Likid Kromatografisi (HP 1100 series) ile ölçüldü. Amino asitler, lityum iyon değişim kolonundan, LI280 ve LI750 tamponları yardımıyla geçirildi. Her biri kolonda tutulma süresine göre diğer serum amino asitlerinden ayrıldı. Kolon sonrası derivatizasyon ünitesine geçen amino asitler, “o-phthaldehyde” ile reaksiyona girip, açığa çıkan son ürünün 330 nm’de eksitasyonu, 465 nm’de emisyonu ile fluorometrede saptandı. Amino asitlerin miktarı, serum örneğindeki pikin amino asit standardındaki pik yüksekliğiyle karşılaştırması sonucunda hesaplandı. Sonuçlar litre serumda μmol amino asit olarak verildi.

II.2.3. İstatistik

İstatistiksel değerlendirme, SPSS (9.0) istatistik paket programı yardımıyla yapıldı.

İn vitro basamakta elde edilen veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. Grupların varyans homojenite testi yapıldıktan sonra ortalamalar tek yönlü ANOVA ve Post Hoc testi olan LSD ile karşılaştırıldı. Gruplar arasındaki $p<0.01$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

İn vivo basamakta hipertiroidi tanısı almış hastaların tedavi öncesinde ve sonrasında elde edilen verileri arasındaki farklılık eşleştirilmiş t-testi ile saptandı. Tedavi öncesi ve tedavi sonrasında değerlendirilen değişkenlerin kendi içindeki ilişkilerini saptamak amacıyla Pearson’un bivariate korelasyonu kullanıldı. Elde edilen veriler, ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi ve karşılaştırılan gruplar arasındaki $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

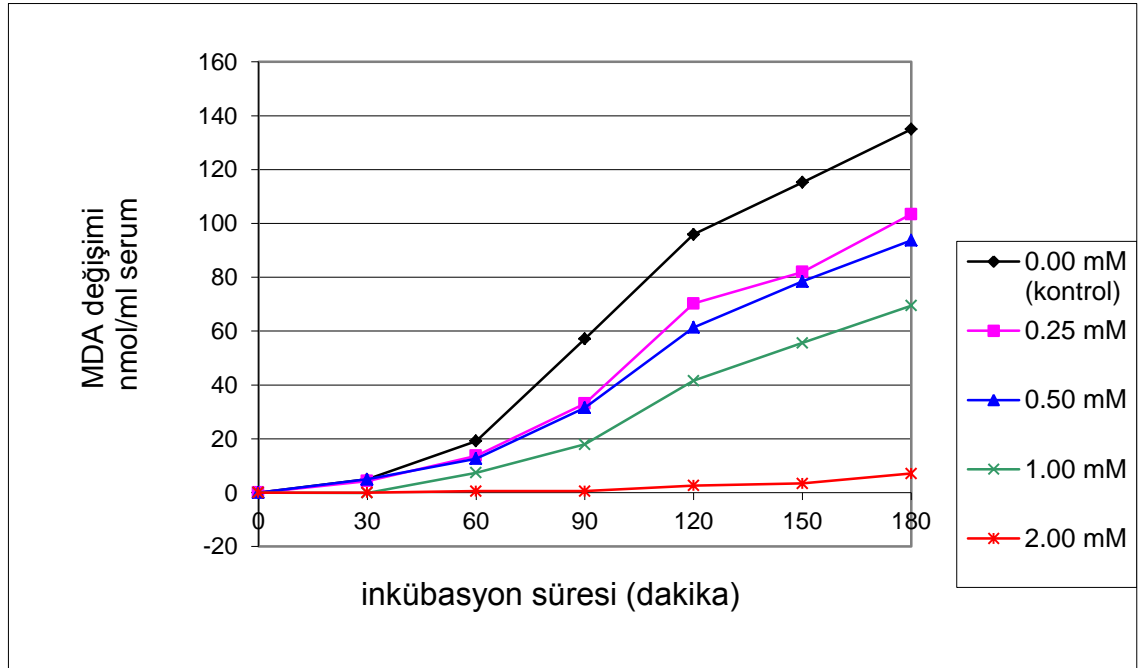
BULGULAR

III.1. İN VİTRO ORTAMDA YAPILAN TESTLER

III.1.1. Antioksidanların Bakırla İndüklenen Serum Lipid Peroksidasyonu Üzerine Olan Etkisinin İncelenmesi

III.1.1.1. Tirozinin Etkisi

III.1.1.1.1. Tirozin Konsantrasyonlarının Farklı İnkübasyon Zamanlarındaki Etkilerinin Karşılaştırılması



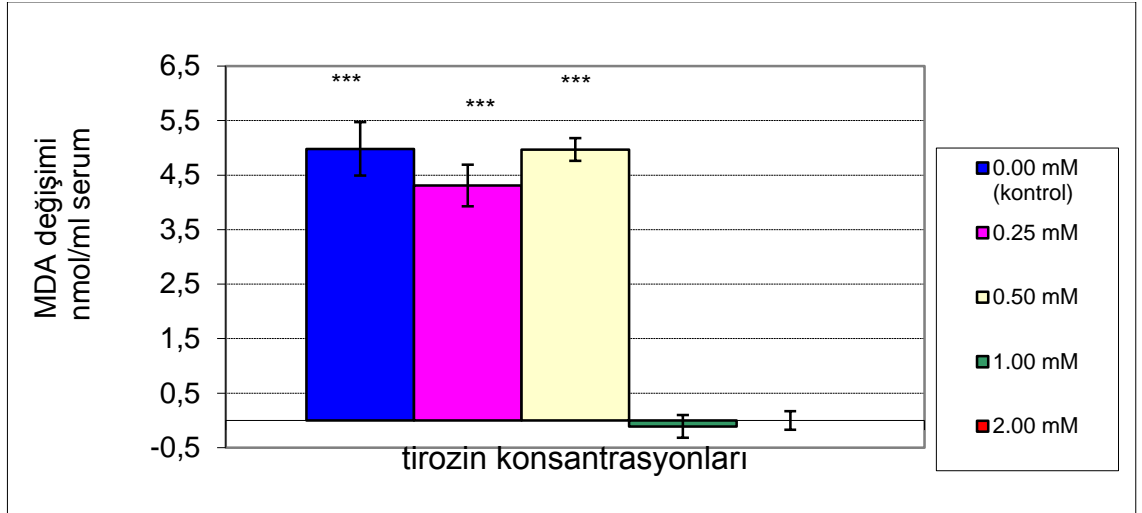
Şekil-7: Tirozinin serumda bakırla indüklenen MDA oluşumu üzerine etkisi

Şekil-7'de görüldüğü gibi tirozin eklenmeyen, 0.25 ve 0.5 mM tirozin eklenen serum örneklerinde lipid peroksidasyonu 30. dakikadan itibaren başlarken, 1 mM ve 2 mM tirozin eklenen serumlarda lipid peroksidasyonu sırasıyla 60. ve 120. dakikaya kadar gecikmiştir.

Kullanılan tirozin konsantrasyonları ve inkübasyon süreleri arasındaki istatistiksel farklılıklar aşağıda açıklanmaktadır.

III.1.1.1.2. Farklı Tirozin Konsantrasyonlarının Aynı İnkübasyon Zamanındaki Etkilerinin Karşılaştırılması

İnkübasyonun 0. dakikasında kontrolün ve farklı konsantrasyonda tirozin içeren serum örneklerinin MDA miktarları birbirinden farksız bulunmuştur.

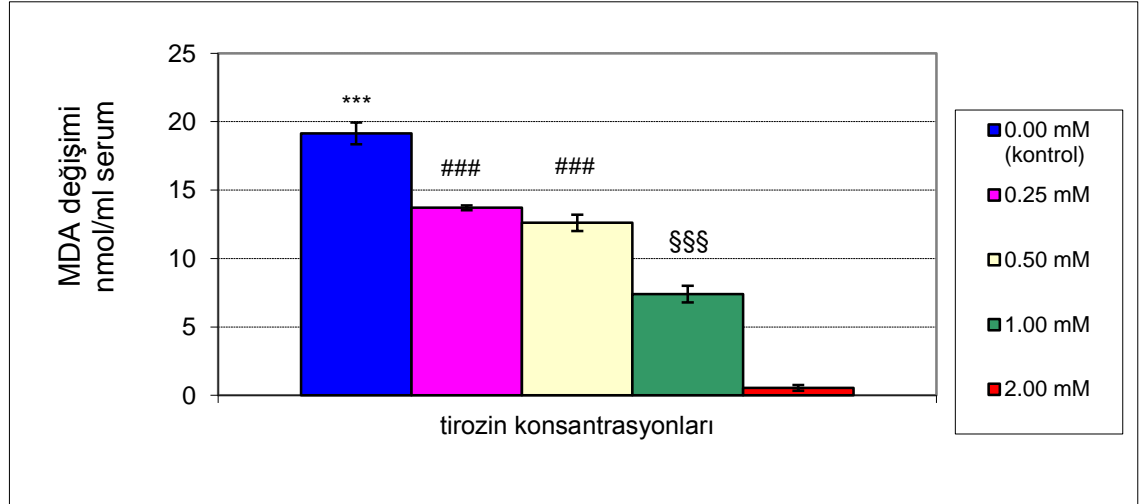


Şekil-8: Tirozinin bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 30. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama \pm SH'dir. (SH: Standart Hata)

***, 1 ve 2 mM tirozin eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

Tirozin konsantrasyonlarının inkübasyonun 30. dakikasındaki etkileri Şekil-8'de gösterilmektedir. Buna göre 0, 0.25 ve 0.5 mM tirozin eklenen serum örneklerindeki Δ MDA birbirinden farksız bulunmuştur. 1 mM tirozin eklenen serum örneklerinde ise 30 dakikalık inkübasyon sonunda MDA miktarındaki değişim bazal çizginin altına inmiştir. 2 mM tirozin eklenen serum örneklerinde 30 dakika inkübasyon ile MDA miktarı değişmemiş, Δ MDA, "0" olarak bulunmuştur. 1 ve 2 mM tirozin eklenen serum örneklerindeki Δ MDA diğer üç

serum örneğinininkinden anlamlı olarak azdır ($p<0.001$) ancak birbirleri arasındaki fark anlamlı değildir. Her iki konsantrasyon MDA değişimini kontrole göre sırasıyla % 102 ve % 100 azaltmıştır.



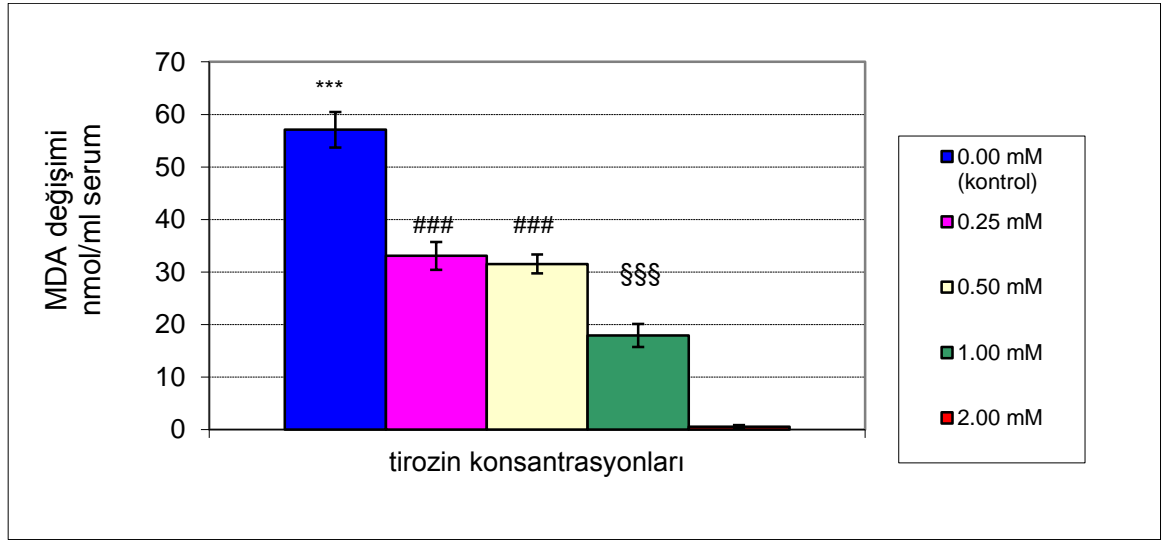
Şekil-9: Tirozinin bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 60. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama \pm SH'dir.

***, 0.25, 0.5, 1 ve 2 mM tirozin eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p<0.001$.

###, 1 ve 2 mM tirozin eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p<0.001$.

\$\$\$, 2 mM tirozin eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p<0.001$.

İnkübasyonun 60. dakikasında, tirozin eklenen tüm serum örneklerinde, Şekil-9'da görüldüğü gibi kontrole göre anlamlı olarak (küçükten büyüğe sırasıyla %28, % 34, % 61 ve % 97) daha az MDA değişimi saptanmıştır ($p<0.001$). Bu zaman diliminde 0.25 ve 0.5 mM tirozin eklenen örneklerin MDA değişimi karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. 1 mM tirozin eklenen örneklerdeki MDA değişimi 0.25 ve 0.5 mM tirozin eklenen örneklerden anlamlı olarak düşük, 2 mM tirozin eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). 2 mM tirozin eklenen örneğin Δ MDA'sı diğer bütün tüplere göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.001$).



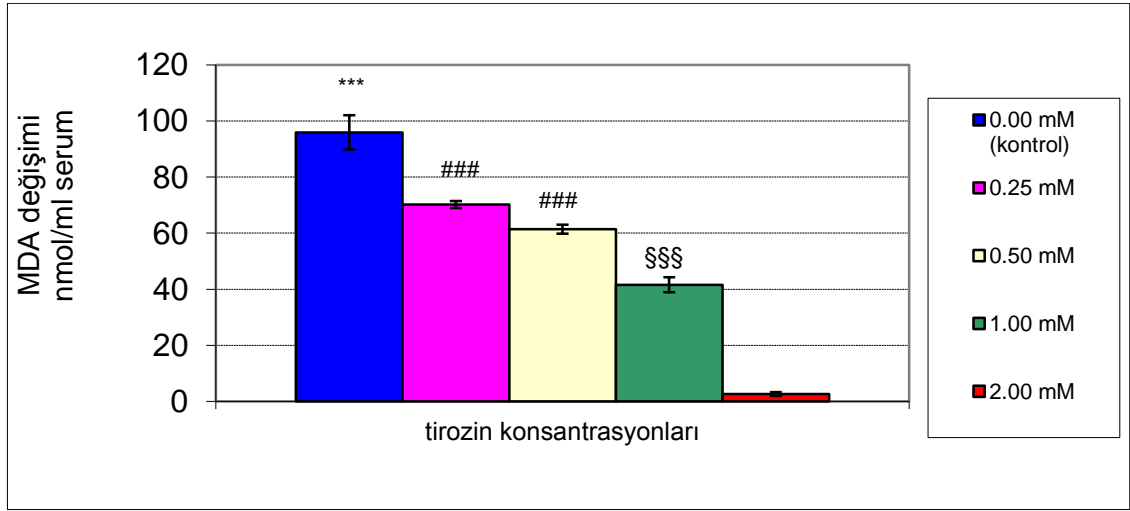
Şekil-10: Tirozinin bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 90. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama \pm SH'dir.

***, 0.25, 0.5, 1 ve 2 mM tirozin eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

###, 1 ve 2 mM tirozin eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

\$\$\$, 2 mM tirozin eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

İnkübasyonun 90. dakikasında, tirozinin tüm konsantrasyonları, Şekil-10'da görüldüğü gibi kontrole göre anlamlı olarak (küçükten büyüğe sırasıyla % 42, %46, % 70 ve % 99) daha az MDA değışimi göstermiştir ($p < 0.001$). Bu zaman diliminde 0.25 ve 0.5 mM'lık tirozin konsantrasyonlarının koruma potansiyelleri aynı bulunmuştur, ancak bu konsantrasyonlardaki MDA değışiklikleri 1 ve 2 mM tirozin eklenen örneklerden anlamlı olarak daha yüksek değerlendirilmiştir ($p < 0.001$). Ayrıca 1 ve 2 mM'lık konsantrasyonlar karşılaştırdıklarında, 2 mM tirozin eklenen örneklerde Δ MDA'nın anlamlı olarak daha düşük olduğu belirlenmiştir ($p < 0.001$).



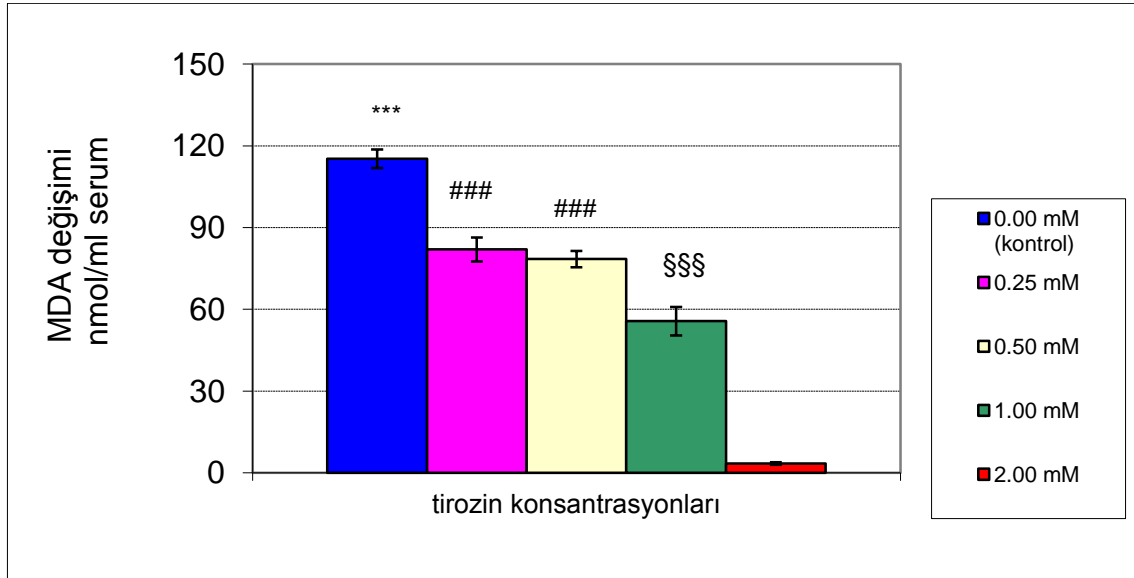
Şekil-11: Tirozinin bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 120. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama \pm SH'dir.

***, 0.25, 0.5, 1 ve 2 mM tirozin eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

###, 1 ve 2 mM tirozin eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

\$\$\$, 2 mM tirozin eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

Şekil-11'de görüldüğü gibi inkübasyonun 120. dakikasında, tirozinin tüm konsantrasyonları, kontrole göre anlamlı olarak (küçükten büyüğe sırasıyla % 26, % 36, % 56 ve % 97) daha az MDA değişimi göstermiştir ($p < 0.001$). Bu zaman diliminde 0.25 ve 0.5 mM'lık tirozin konsantrasyonlarının koruma potansiyelleri aynı bulunmuştur, ancak bu konsantrasyonlardaki MDA değişiklikleri 1 ve 2 mM tirozin eklenen örneklerden anlamlı olarak daha yüksek değerlendirilmiştir ($p < 0.001$). Ayrıca 1 ve 2 mM'lık konsantrasyonlar karşılaştırıldıklarında, 2 mM tirozin eklenen örneklerde Δ MDA'nın anlamlı olarak daha düşük olduğu belirlenmiştir ($p < 0.001$).



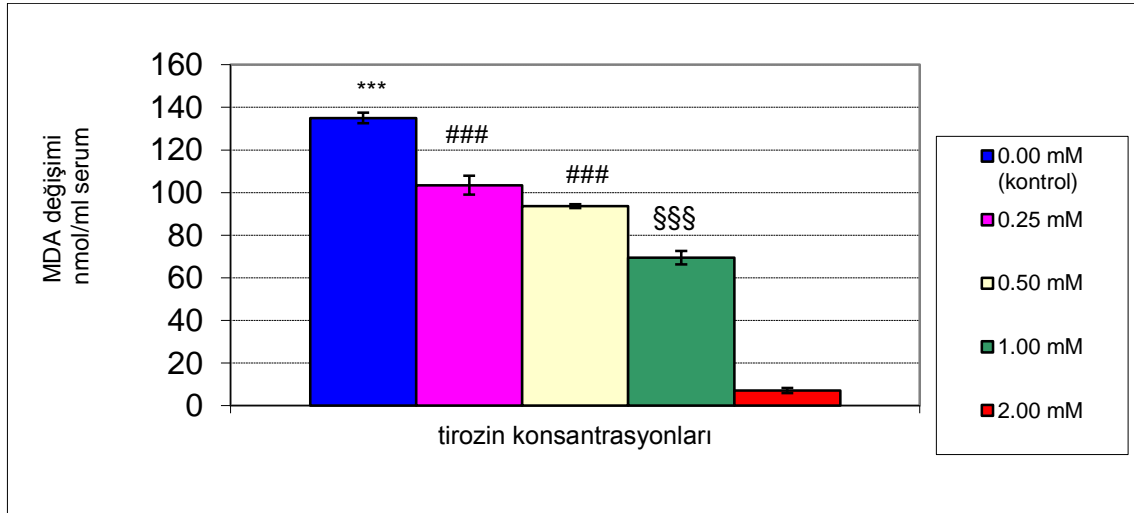
Şekil-12: Tirozinin bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 150. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama \pm SH'dir.

***, 0.25, 0.5, 1 ve 2 mM tirozin eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

###, 1 ve 2 mM tirozin eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

\$\$\$, 2 mM tirozin eklenen örnekten anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

İnübasyonun 150. dakikasında, bütün tirozin konsantrasyonları Şekil-12'de görüldüğü gibi kontrole göre anlamlı olarak (küçükten büyüğe sırasıyla % 29, % 32, % 52 ve % 97) daha az MDA değışimi göstermektedir ($p < 0.001$). 0.25 ve 0.5 mM tirozin eklenen örneklerin MDA değışimleri istatistiksel olarak aynı iken, bu konsantrasyonlardaki MDA değışiklikleri 1 ve 2 mM tirozin eklenen örneklerden anlamlı olarak daha yüksek değerlendirilmiştir ($p < 0.001$). 2 mM tirozin eklenen örnekte, 1 mM'lık örneğe göre daha az MDA değışimi saptanmıştır ($p < 0.001$).



Şekil-13: Tirozinin bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 180. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisini göstermektedir. Değerler ortalama \pm SH'dir.

***, 0.25, 0.5, 1 ve 2 mM tirozin eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

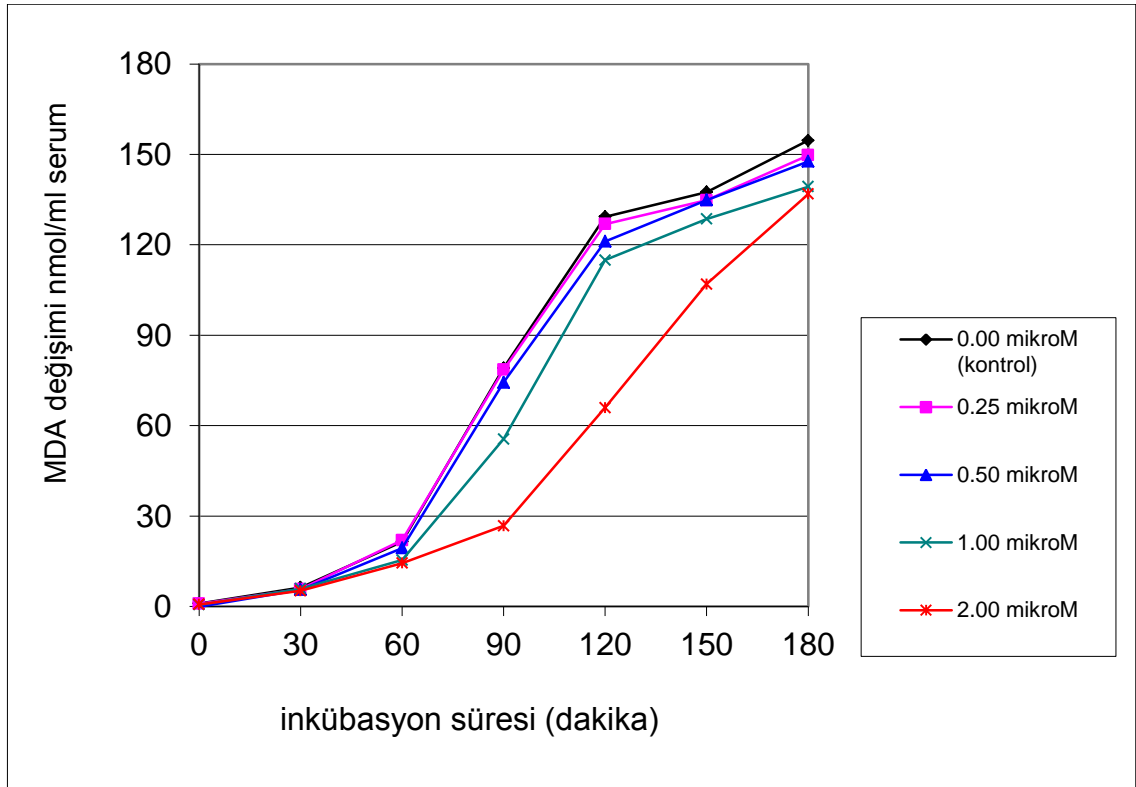
###, 1 ve 2 mM tirozin eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

\$\$\$, 2 mM tirozin eklenen örnekten anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

İnkübasyonun 180. dakikasında tüm tirozin konsantrasyonları Şekil-13'te görüldüğü gibi kontrole göre anlamlı olarak (küçükten büyüğe sırasıyla % 25, % 33, % 50 ve % 95) daha az MDA değışimine neden olmuştur ($p < 0.001$). 0.25 ve 0.5 mM tirozin eklenen örneklerin MDA değışimleri birbirinden istatistiksel olarak farksız iken, 1 ve 2 mM tirozin eklenen örneklerden istatistiksel olarak daha yüksek MDA değışimi gösterdiği bulunmuştur ($p < 0.001$). 1 mM tirozin eklenen örnek de 2 mM tirozin eklenen örnekten anlamlı olarak daha yüksek MDA değışimi sergilemiştir ($p < 0.001$).

III.1.1.2. T₃'ün Etkisinin İncelenmesi

III.1.1.2.1. T₃ Konsantrasyonlarının Farklı İnkübasyon Zamanlarındaki Etkilerinin Karşılaştırılması



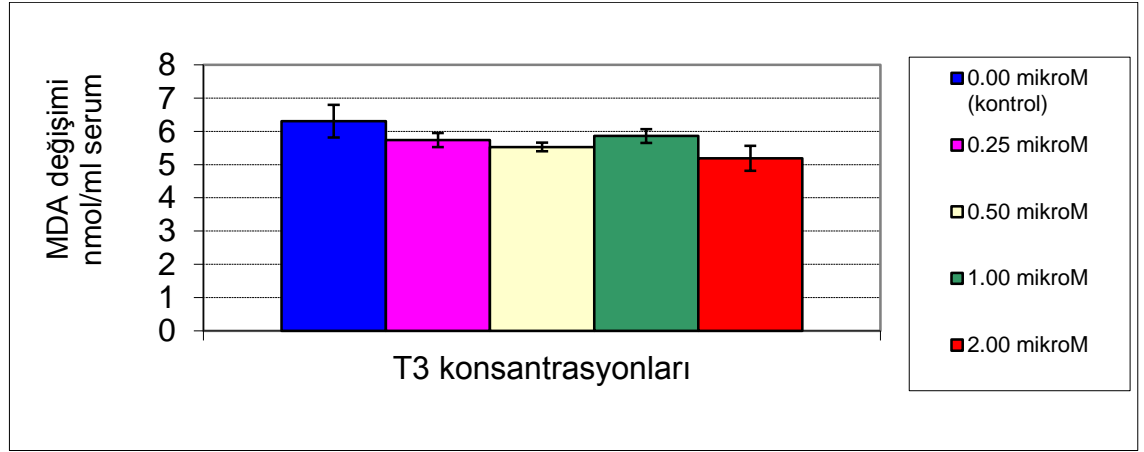
Şekil-14: T₃'ün bakırla indüklenen serum MDA oluşumu üzerine etkisi

Şekil-14'te görüldüğü gibi kontrol ve farklı konsantrasyonlarda T₃ eklenen serum örneklerinin MDA oluşumu inkübasyonun 30. dakikasından itibaren anlamlı olarak artmaya başlamıştır.

Kullanılan T₃ konsantrasyonları ve inkübasyon süreleri arasındaki istatistiksel farklılıklar aşağıda açıklanmaktadır.

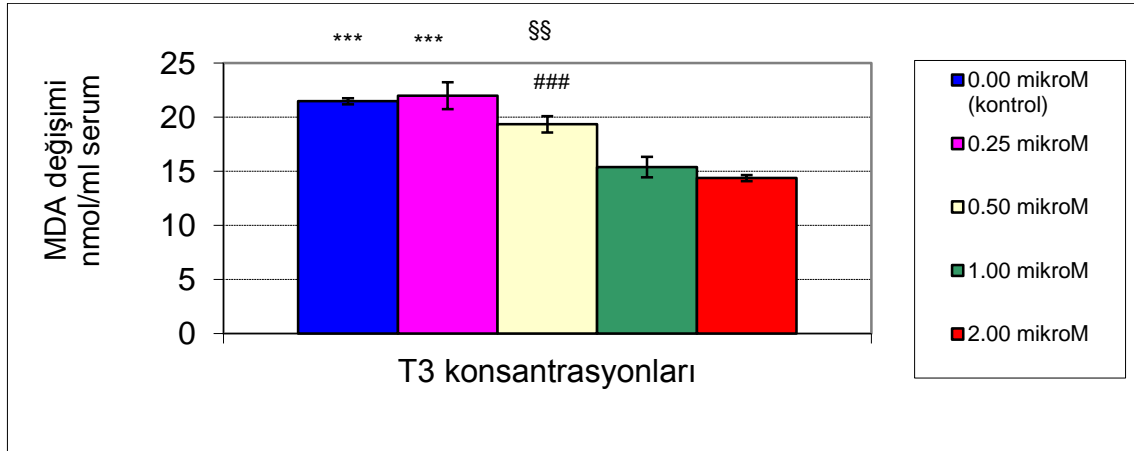
III.1.1.2.2. Farklı T₃ Konsantrasyonlarının Aynı İnkübasyon Zamanındaki Etkilerinin Karşılaştırılması

İnkübasyonun 0. dakikasında farklı konsantrasyonda T₃ eklenen her 5 serum örneğinde lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehitin oluşumu birbirinden farksız bulunmuştur.



Şekil-15: T₃'ün bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 30. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama \pm SH'dir.

T₃ konsantrasyonlarının inkübasyonun 30. dakikasındaki etkileri Şekil-15'te gösterilmektedir. Buna göre 5 farklı konsantrasyonda T₃ eklenen serum örneklerinin Δ MDA'ları birbirinden istatistiksel olarak farklı değildir.



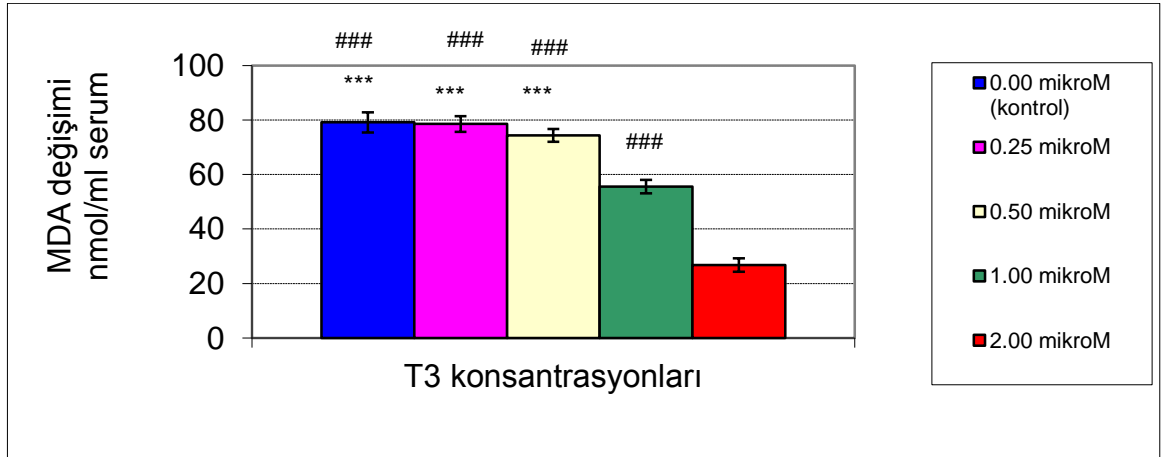
Şekil-16: T₃'ün bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 60. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama ± SH'dir.

***, 1, 2 µM T₃ eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, p<0.001.

§§, 1 µM T₃ eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, p<0.01.

###, 2 µM T₃ eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, p<0.001.

İnkübasyonun 60. dakikasında, 0 ve 0.25 µM T₃ eklenen örneklerin MDA değişimi, 1 ve 2 µM T₃ eklenen serum örneklerinden anlamlı olarak fazladır (p<0.001) ve 1 ve 2 µM T₃, MDA değişimini kontrole göre sırasıyla % 32 ve % 35 azaltmıştır (Şekil-16). Ancak 0, 0.25 ve 0.50 µM T₃ eklenen serum örneklerinin ΔMDA'ları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir. 0.50 µM T₃ eklenen serum örneklerinin MDA değişimi, 1 ve 2 µM T₃ eklenen serum örneklerinininkinden sırasıyla p=0.003 ve p<0.001 anlam düzeyinde yüksektir. 1 ve 2 µM T₃ eklenen serum örneklerinin MDA değişimleri arasındaki fark anlamlı değildir.

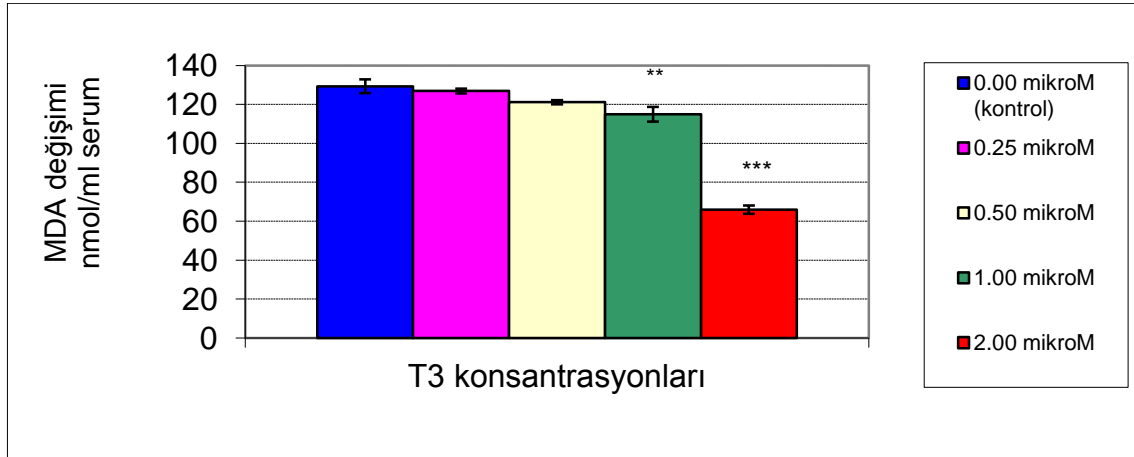


Şekil-17: T₃'ün bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 90. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama ± SH'dir.

***, 1 µM T₃ eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, p<0.001.

###, 2 µM T₃ eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, p<0.001

Şekil-17'de görüldüğü gibi inkübasyonun 90. dakikasında, 0.25 ve 0.50 µM T₃ eklenen örneklerin MDA değışimleri kontrolden farksız iken 1 ve 2 µM T₃ eklenen serum örneklerinin MDA değışimlerinin anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır (p<0.001). Bir ve 2 µM T₃, MDA değışimini kontrole göre sırasıyla % 30 ve % 66 azaltmıştır. Bir µM T₃ eklenen serum örneklerinin MDA değışimi, 2 µM T₃ eklenen serum örneklerinin MDA değışiminden anlamlı olarak fazladır (p<0.001).

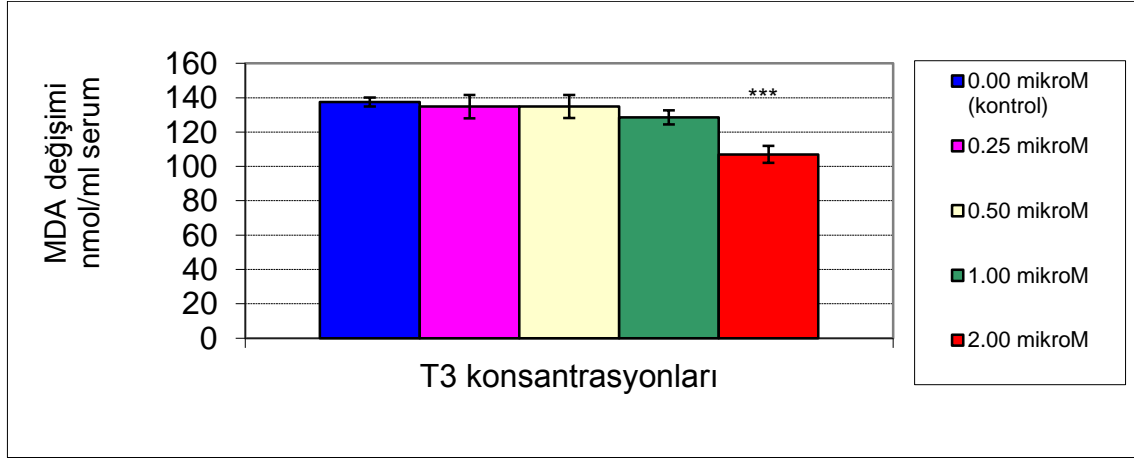


Şekil-18: T₃'ün bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 120. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama ± SH'dır.

***, Diğer T₃ eklenen örneklerden anlamlı olarak düşük, p<0.001.

** , 0 ve 0.25 µM T₃ eklenen örneklerden anlamlı olarak düşük, p<0.01.

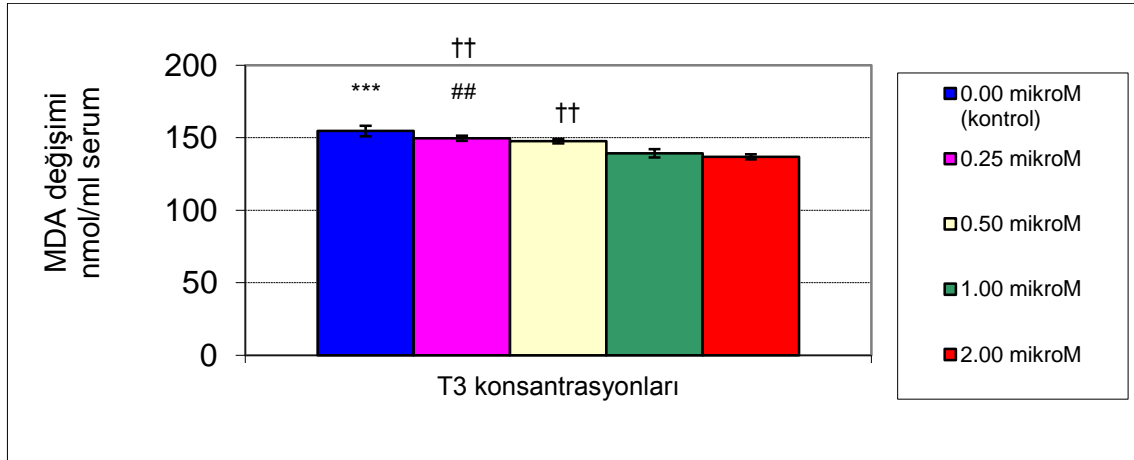
İnkübasyonun 120. dakikasında, 0, 0.25, 0.50 ve 1 µM T₃ eklenen örneklerin MDA değışimi, 2 µM T₃ eklenen serum örneklerinkinden anlamlı olarak fazladır (p<0.001) ve 2 µM T₃, MDA değışimini kontrole % 49 azaltmıştır (Şekil-18). Ancak 0, 0.25 ve 0.50 µM T₃ eklenen serum örneklerinin ΔMDA'ları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir. Kontrol ve 0.25 µM eklenen serum örneklerinin MDA değışimi, 1 µM T₃ eklenen serum örnekleriyle karşılaştırıldığında, aralarındaki farkın anlamlılık değeri sırasıyla p=0.002 ve p=0.006'dır.



Şekil-19: T₃'ün bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 150. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama \pm SH'dir.

***, Diğer T₃ eklenen örneklerden anlamlı olarak düşük, $p < 0.001$.

Şekil-19'da görüldüğü gibi inkübasyonun 150. dakikasında, 0, 0.25, 0.50 ve 1 μ M T₃ eklenen örneklerin MDA değişimi, 2 μ M T₃ eklenen serum örneklerinkinden anlamlı olarak fazladır ($p < 0.001$) ve 2 μ M T₃ konsantrasyonu MDA değişimini kontrole % 23 azalmıştır. Ancak 0, 0.25, 0.50 ve 1 μ M T₃ eklenen serum örneklerinin Δ MDA'ları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil-20: T₃'ün bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 180. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama ± SH'dir.

***, 1 ve 2 µM T₃ eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, p<0.001.

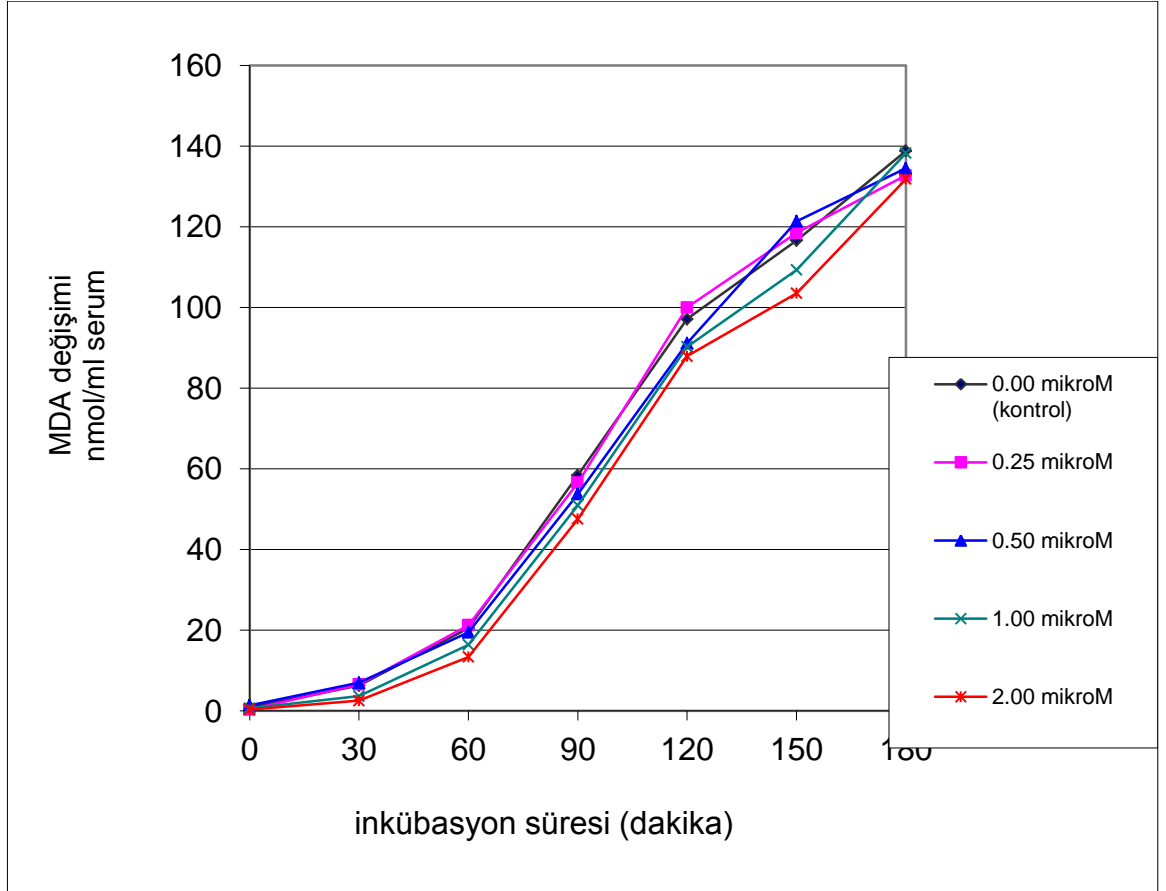
##, 1 µM T₃ eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, p<0.01.

††, 2 µM T₃ eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, p<0.01.

T₃ konsantrasyonlarının inkübasyonun 180. dakikasındaki etkileri Şekil-20'de gösterilmektedir. Buna göre kontrolün MDA değışimi, 1 ve 2 µM T₃ eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p<0.001). 0.25 ve 0.50 µM T₃ eklenen serum örneklerinin ΔMDA'ları ile 2 µM T₃ eklenen serum örneklerinin ΔMDA'ları arasındaki farkın p değeri sırasıyla 0.002 ve 0.007'dir. 0.25 µM T₃'ün eklenen örneklerin MDA değışimi, 1 µM T₃ eklenen serum örneklerinininkinden anlamlı olarak fazladır (p=0.008).

III.1.1.3. T₄'ün Etkisinin İncelenmesi

III.1.1.3.1. T₄ Konsantrasyonlarının Farklı İnkübasyon Zamanlarındaki Etkilerinin Karşılaştırılması



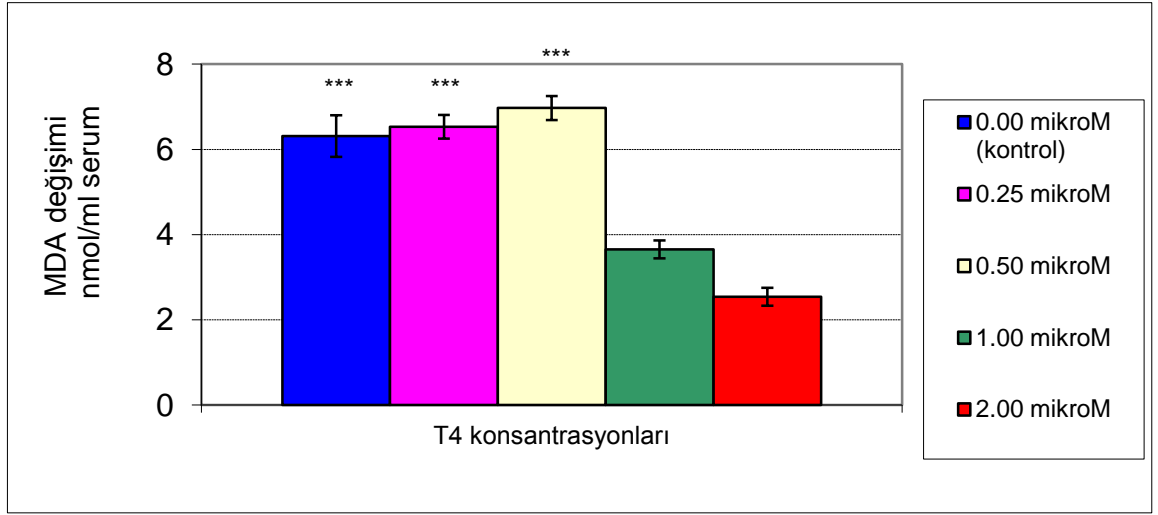
Şekil-21: T₄'ün bakırla indüklenen serum MDA oluşumu üzerine etkisi

Şekil-21'de görüldüğü gibi kontrol ve farklı konsantrasyonlarda T₄ eklenen serum örneklerinin MDA oluşumu 30. dakikadan sonra anlamlı olarak artmaya başlamıştır.

Kullanılan T₄ konsantrasyonları ve inkübasyon süreleri arasındaki istatistiksel farklılıklar aşağıda açıklanmaktadır.

III.1.1.3.2. Farklı T₄ Konsantrasyonlarının Aynı İnkübasyon Zamanındaki Etkilerinin Karşılaştırılması

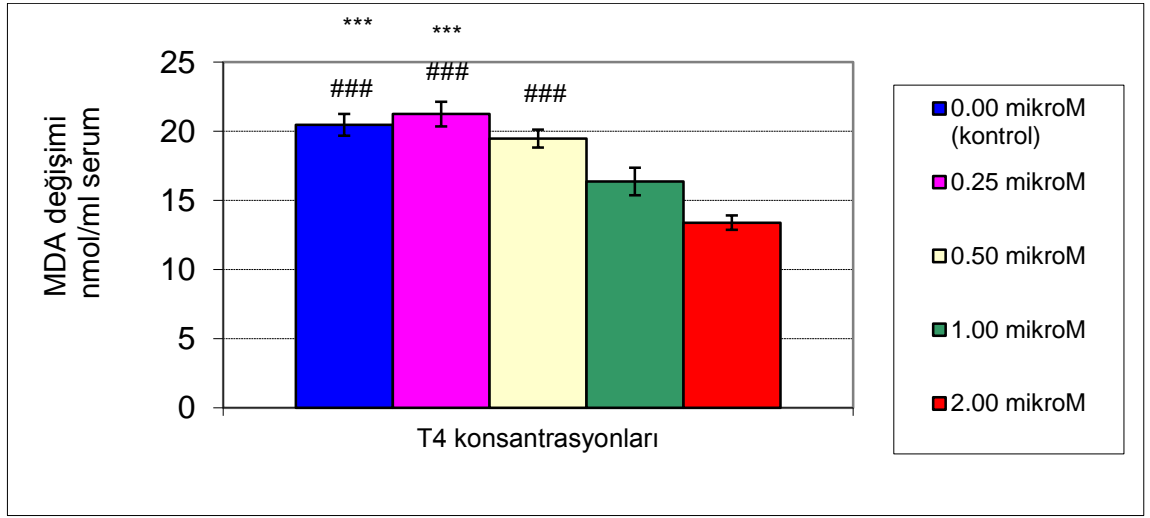
İnkübasyonun 0. dakikasında 5 farklı konsantrasyonda T₄ eklenen serum örneklerinin lipid peroksidasyon ürünü olan MDA içeriği birbirinden farksız bulunmuştur.



Şekil-22: T₄'ün bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 30. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama \pm SH'dir.

***, 1, 2 μ M T₄ eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

İnkübasyonun 30. dakikasında kontrol ve 0.25 ile 0.50 μ M T₄ eklenen örneklerin MDA değışımi, 1 ve 2 μ M T₄ eklenen serum örneklerinkinden anlamlı olarak fazladır ($p < 0.001$) ve 1 ve 2 μ M T₄ konsantrasyonları MDA değışımini kontrole göre sırasıyla % 39 ve % 68 azaltmışlardır (Şekil-22). Ancak 0, 0.25, 0.50 μ M eklenen T₄ serum örneklerinin Δ MDA'ları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir. 1 ve 2 μ M T₄ eklenen serum örneklerinin MDA değışımleri arasındaki fark anlamlı değildir.

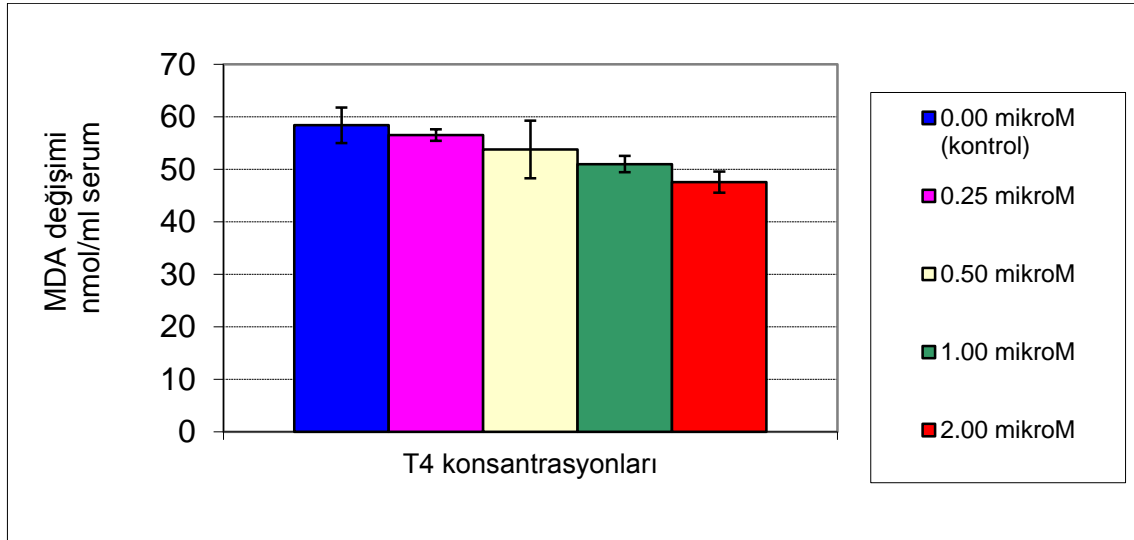


Şekil-23: T₄'ün bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 60. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama ± SH'dir.

***, 1 µM T₄ eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, p<0.001.

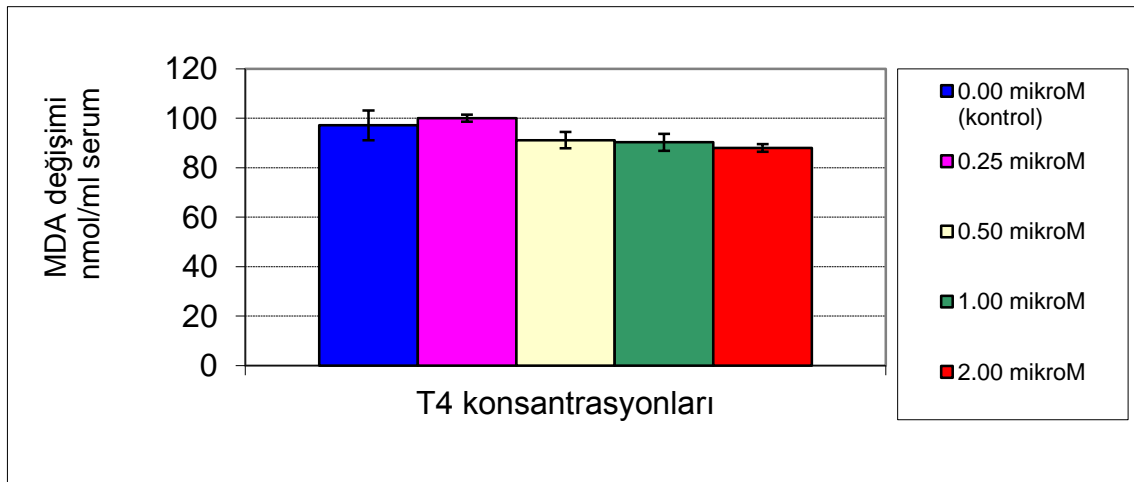
###, 2 µM T₄ eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, p<0.001.

Şekil-23'te görüldüğü gibi inkübasyonun 60. dakikasında, kontrolün ve 0.25 µM T₄ eklenen örneğin MDA değışimi, 1 ve 2 µM T₄ eklenen serum örneklerinden anlamlı olarak fazladır (p<0.001). Bir ve 2 µM T₄ konsantrasyonları MDA değışimini kontrole göre sırasıyla % 22 ve % 37 azaltmışlardır. Ancak kontrol ve 0.25, 0.50 µM T₄ eklenen serum örneklerinin ΔMDA'sı arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir. 0.50 µM T₄ eklenen serum örneklerinin ΔMDA'sı ile 2 µM T₄ eklenen serum örneklerinin karşılaştırıldığında aralarındaki fark anlamlıdır (p<0.001). 1 ve 2 µM T₄ eklenen serum örneklerinin MDA değışimleri arasındaki fark anlamlı değildir.



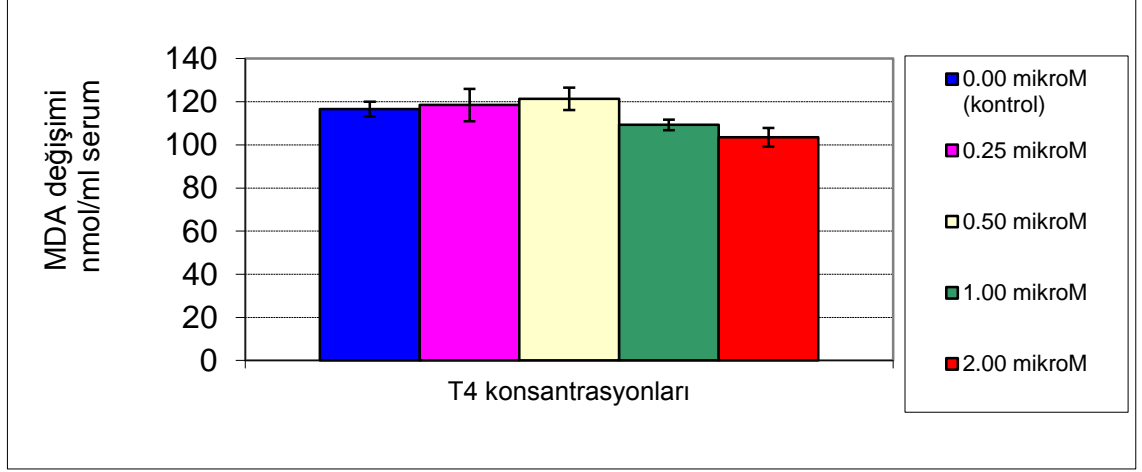
Şekil-24: T₄'ün bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 90. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama ± SH'dir.

Şekil-24'te görüldüğü gibi inkübasyonun 90. dakikasında 0, 0.25, 0.50, 1 ve 2 µM T₄ eklenen örneklerin MDA değışimleri arasındaki fark anlamlı değildir.



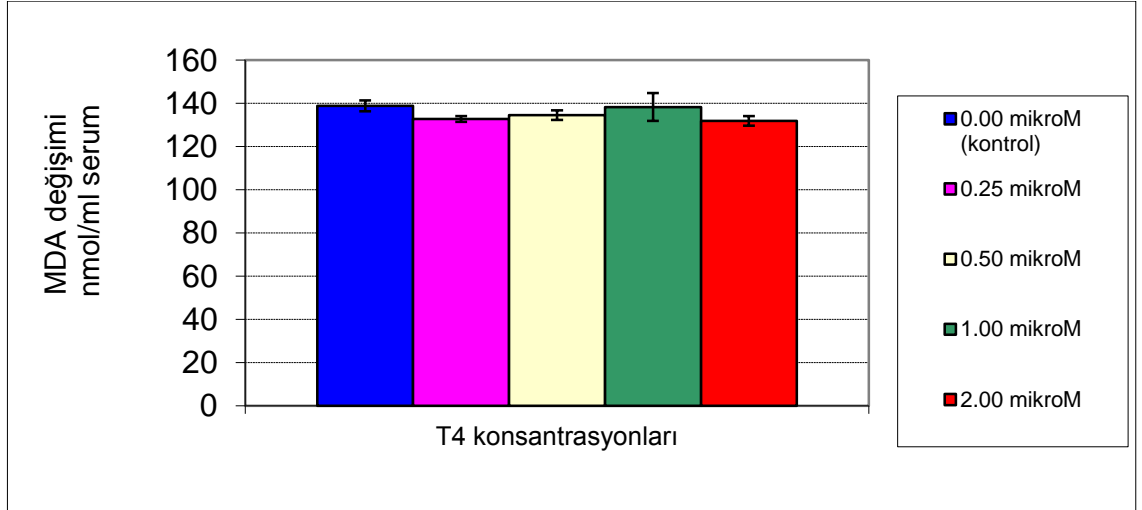
Şekil-25: T₄'ün bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 120. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama ± SH'dir.

Şekil-25'te görüldüğü gibi inkübasyonun 120. dakikasında 0, 0.25, 0.50, 1 ve 2 µM T₄ eklenen örneklerin MDA değışimleri arasındaki fark anlamlı değildir.



Şekil-26: T₄'ün bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 150. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama ± SH'dir.

İnkübasyonun 150. dakikasında, 0, 0.25, 0.50, 1 ve 2 µM T₄ eklenen örneklerin MDA değışımleri arasındaki fark anlamlı değildir (Şekil-26).



Şekil-27: T₄'ün bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 180. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama ± SH'dir.

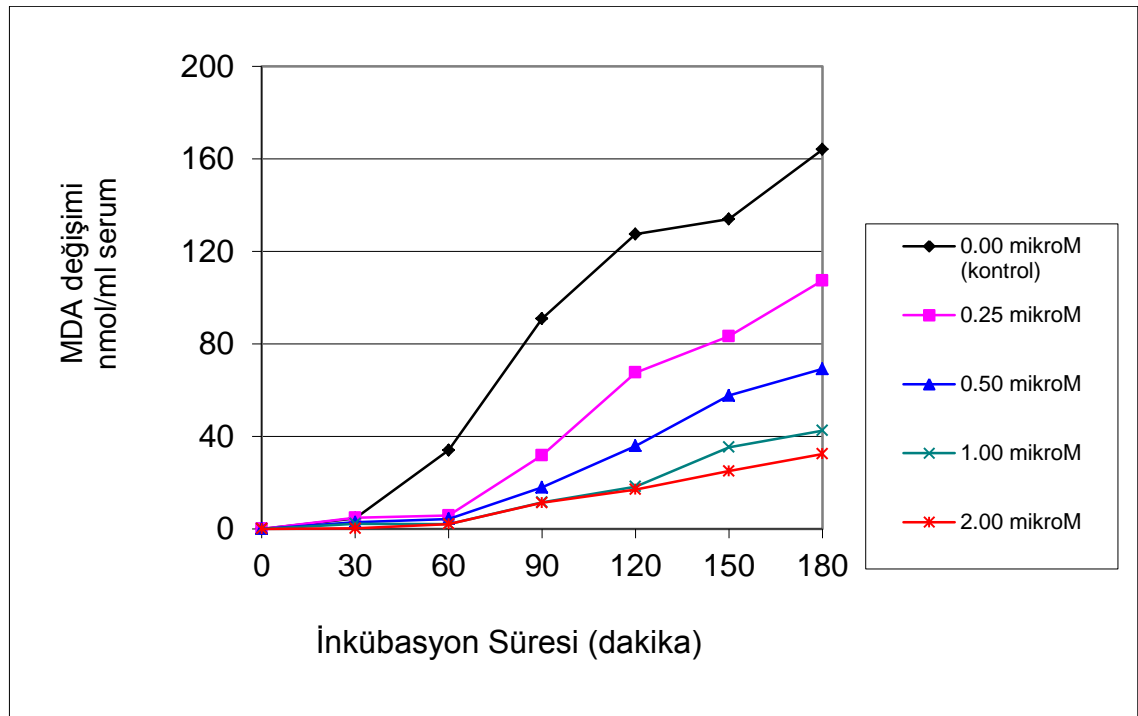
İnkübasyonun 180. dakikasında, 0, 0.25, 0.50, 1 ve 2 µM T₄ eklenen örneklerin MDA değışımleri arasındaki fark anlamlı değildir (Şekil-27).

III.1.1.4. 17 β -Östradiolün Etkisinin İncelenmesi

III.1.1.4.1. 17 β -Östradiol Konsantrasyonlarının Farklı İnkübasyon Zamanlarındaki Etkilerinin Karşılaştırılması

Kontrol serum örneklerinde lipid peroksidasyonu 30. dakikadan sonra başlarken, 0.25, 0.5, 1 ve 2 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerinde lipid peroksidasyonu 60. dakikaya kadar gecikmiştir (Şekil-28).

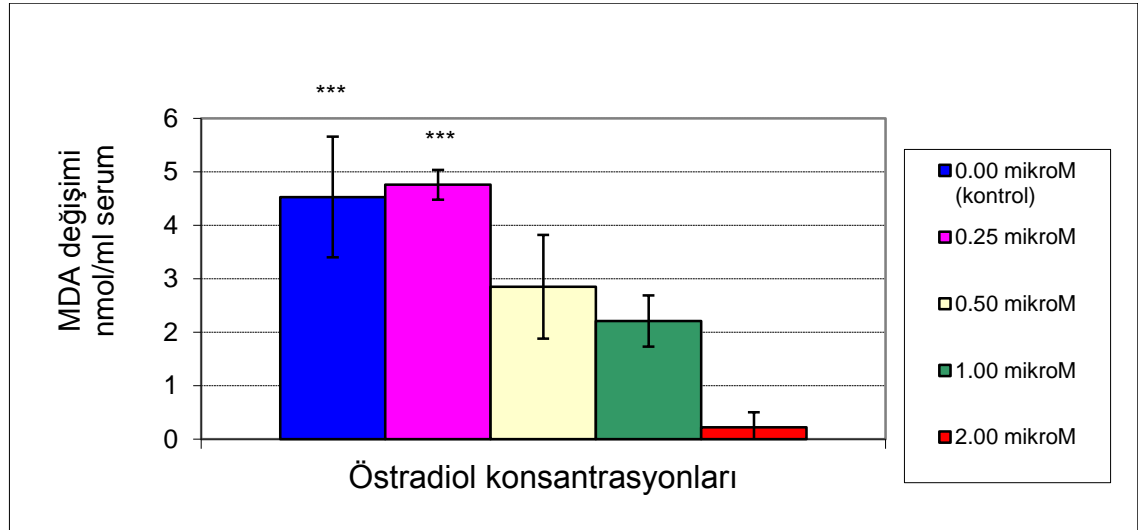
Kullanılan 17 β -östradiol konsantrasyonları ve inkübasyon süreleri arasındaki istatistiksel farklılıklar aşağıda açıklanmaktadır.



Şekil-28: 17 β -östradiolün serumda bakırla indüklenen MDA oluşumu üzerine etkisi

III.1.1.4.2. Farklı 17 β -östradiol Konsantrasyonlarının Aynı İnkübasyon Zamanındaki Etkilerinin Karşılaştırılması

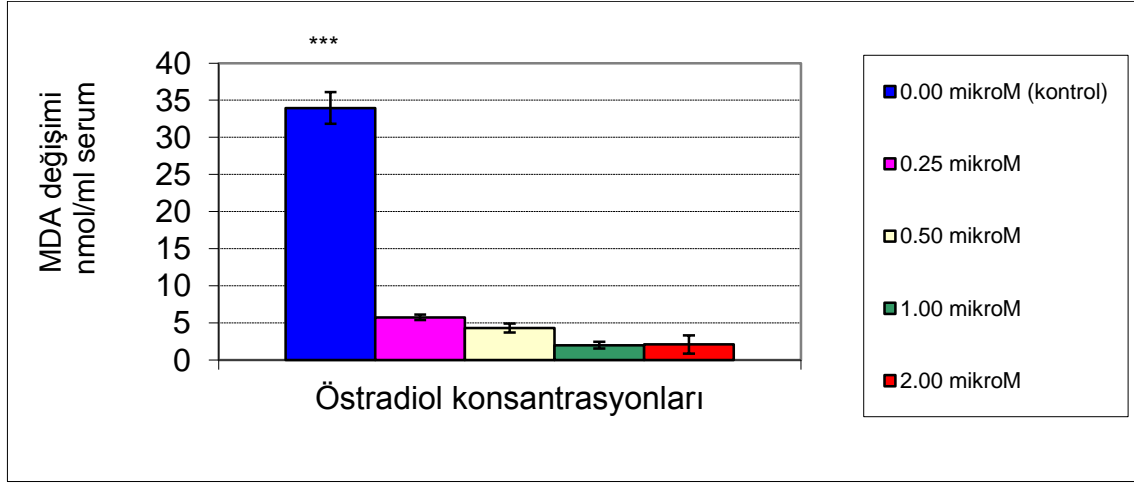
İnkübasyonun 0. dakikasında farklı konsantrasyonda 17 β -östradiol eklenen her 4 serum örneğinin serum lipid peroksidasyon ürünü olan MDA miktarı birbirinden ve kontrolden istatistiksel olarak farksız bulunmuştur.



Şekil-29: 17 β -östradiolün bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 30. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama \pm SH'dir.

***, 2 μ M 17-östradiol eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

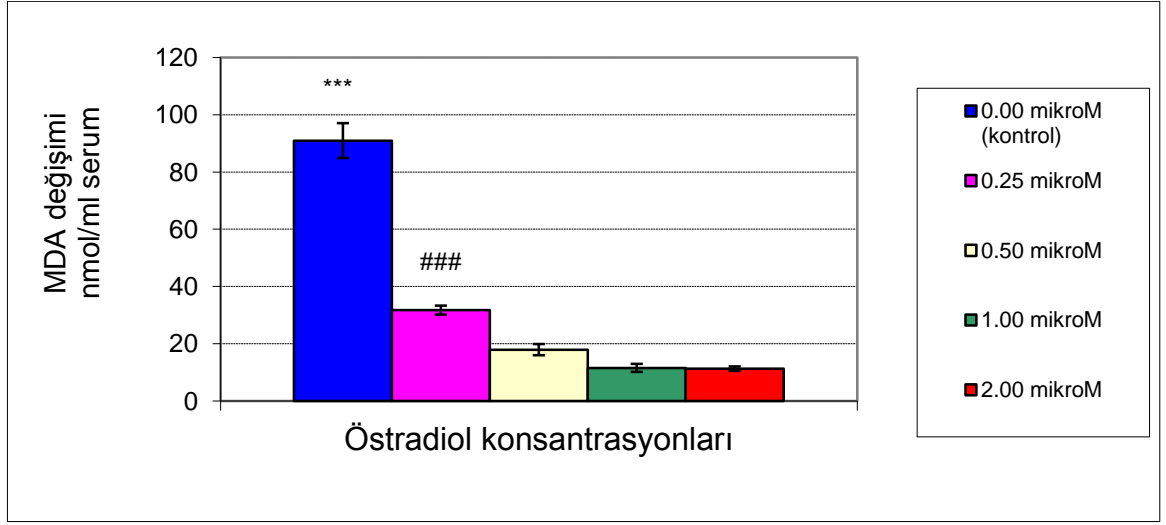
17 β -östradiol konsantrasyonlarının inkübasyonun 30. dakikasındaki etkileri Şekil-29'ta gösterilmektedir. 17 β -östradiol 0.25, 0.5 ve 1 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerindeki Δ MDA kontrolden ve birbirinden farksız bulunmuştur. İki μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerindeki MDA değişimi, kontrol ve 0.25 μ M östrodiol eklenen serum örneklerinkinden anlamlı olarak azdır ($p < 0.001$). Ayrıca 0.5, 1 ve 2 μ M 17 β -östradiolün serum MDA oluşumu üzerine etkileri birbirinden istatistiksel olarak farksızdır.



Şekil-30: 17 β -östradiolün bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 60. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama \pm SH'dır.

*** 0.25, 0.5, 1, 2 μ M 17 β -östradiol eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

Şekil-30'da görüldüğü gibi inkübasyonun 60. dakikasında kontrol serum örneklerinin MDA değişimi, 0.25, 0.5, 1 ve 2 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerinkinden anlamlı olarak yüksek bulunmuş ($p < 0.001$) ve 17 β -östradiol konsantrasyonları MDA değişimini kontrole göre sırasıyla %83, %87, %94 ve %94 azaltmışlardır. 0.25, 0.5, 1 ve 2 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerinin MDA oluşumu karşılaştırıldığında, aralarındaki fark anlamlı değildir.

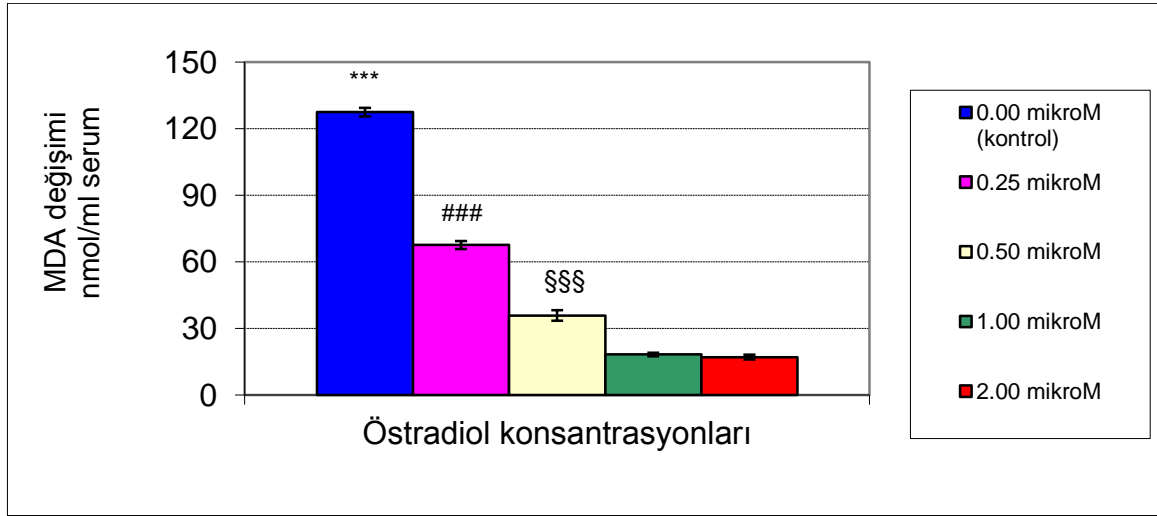


Şekil-31: 17 β -östradiolün bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 90. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama \pm SH'dır.

***, 0.25, 0.5, 1, 2 μ M 17 β -östradiol eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

###, 1 ve 2 μ M 17 β -östradiol eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

17 β -östradiol konsantrasyonlarının inkübasyonun 90. dakikasındaki etkileri Şekil-31'de gösterilmektedir. Buna göre kontrol serum örneklerindeki MDA değışimi, 0.25, 0.5, 1 ve 2 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerinkinden anlamlı olarak yüksek bulunmuş ($p < 0.001$) ve 17 β -östradiol konsantrasyonları MDA değışimini kontrole göre sırasıyla % 65, %81, % 87 ve % 88 azaltmıştır. 0.25 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerinin MDA değışimi, 1 ve 2 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerinden anlamlı olarak fazla ($p < 0.001$) iken, 0.5 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerinin MDA değışiminden istatistiksel olarak farksızdır. 0.5, 1 ve 2 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerinin Δ MDA'ları arasındaki fark anlamlı değildir.



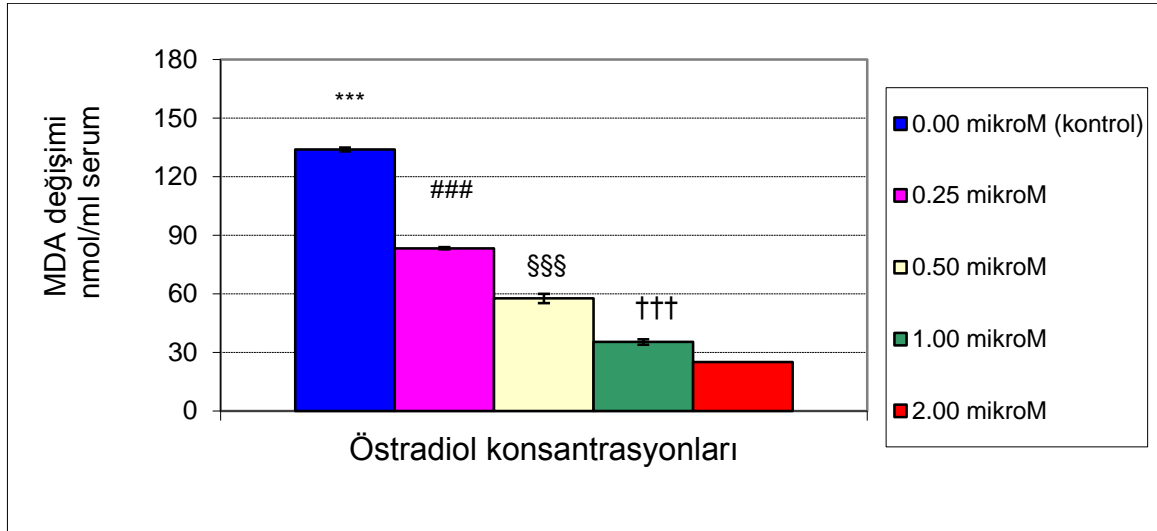
Şekil-32: 17 β -östradiolün bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 120. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama \pm SH'dır.

***, 0.25, 0.5, 1, 2 μ M 17 β -östradiol eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

###, 0.5, 1 ve 2 μ M 17 β -östradiol eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

\$\$\$, 1 ve 2 μ M 17 β -östradiol eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

İnkübasyonun 120. dakikasında kontrol serum örneklerindeki MDA değişimi Şekil-32'de gösterilmektedir. Buna göre kontroldeki MDA değişimi 0.25, 0.5, 1 ve 2 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerindeki anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$) ve 17 β -östradiol konsantrasyonları MDA değişimini kontrole göre sırasıyla %46, %72, %86 ve %87 azaltmıştır. 0.25 μ M 17 β -östradiol eklenen örneğin MDA değişimi, 0.5, 1 ve 2 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerinden anlamlı olarak fazladır. 0.5 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerinin MDA değişimi, 1 ve 2 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerinininkiyle karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha fazla MDA oluşumu saptanmıştır ($p < 0.001$). Bir ve 2 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerinin Δ MDA'ları arasındaki istatistiksel fark yoktur.



Şekil-33: 17 β -östradiolün bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 150. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama \pm SH'dir.

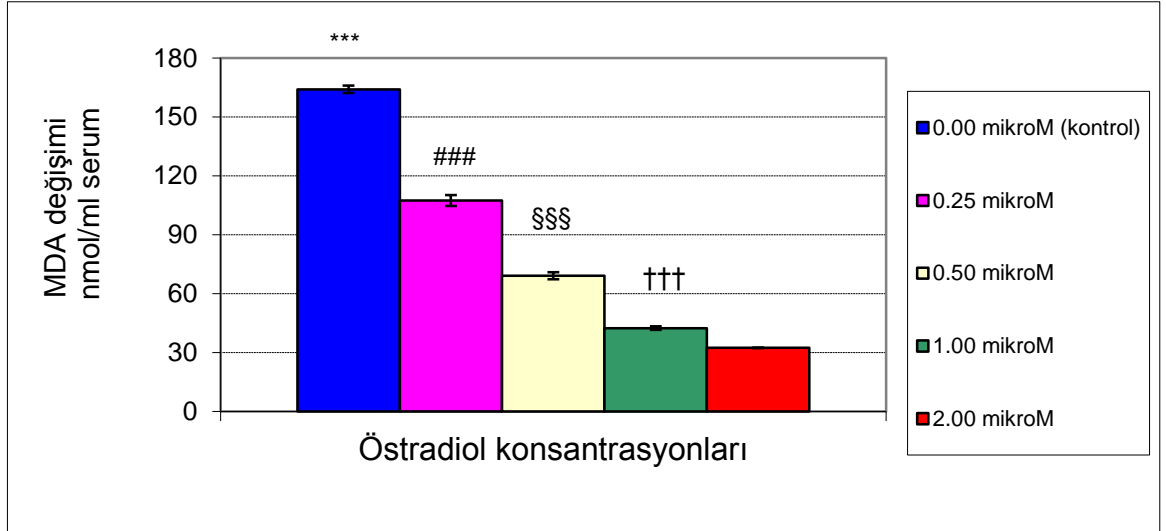
***, 0.25, 0.5, 1, 2 μ M 17 β -östradiol eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

###, 0.5, 1 ve 2 μ M 17 β -östradiol eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

\$\$\$, 1 ve 2 μ M 17 β -östradiol eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

†††, 2 μ M 17 β -östradiol eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

Bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 150. inkübasyon dakikasında her 5 konsantrasyonda 17 β -östradiol eklenen serum örneklerinin MDA oluşumları birbirlerinden anlamlı olarak farklıdır (Şekil-33). Kontrol serum örneklerindeki MDA değışimi, 0.25, 0.5, 1 ve 2 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerindeki anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$) ve 17 β -östradiol konsantrasyonları MDA değışimini kontrole göre sırasıyla %38, %57, %74 ve %81 azaltmıştır. 0.25 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerinin MDA değışimi, 0.5, 1 ve 2 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerinden anlamlı olarak fazladır ($p < 0.001$). 0.5 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerinin Δ MDA 'sının, 1 ve 2 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerinininkiyile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha fazla olduğu saptanmıştır ($p < 0.001$). 1 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerinin Δ MDA'sı, 2 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerinin Δ MDA'sından anlamlı olarak fazladır ($p < 0.001$).



Şekil-34: 17 β -östradiolün bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 180. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama \pm SH'dir.

***, 0.25, 0.5, 1, 2 μ M 17 β -östradiol eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

###, 0.5, 1 ve 2 μ M 17 β -östradiol eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

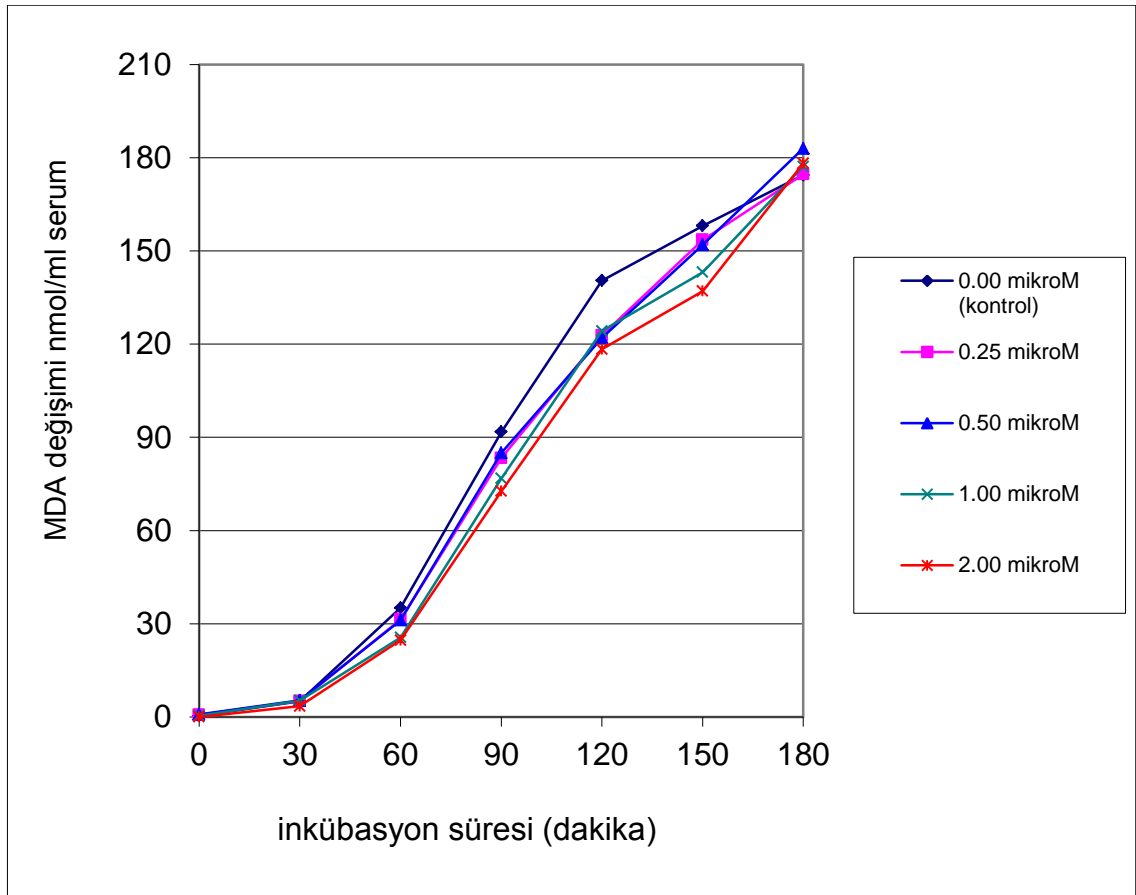
\$\$\$, 1 ve 2 μ M 17 β -östradiol eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

†††, 2 μ M 17 β -östradiol eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

İnkübasyonun 180. dakikasında da aynen 150. dakikada olduğu gibi 5 farklı konsantrasyonda 17 β -östradiol eklenen serum örneklerinin MDA oluşumları birbirlerinden anlamlı olarak farklıdır (Şekil-34). Kontrol serum örneklerindeki MDA değişimi, 0.25, 0.5, 1 ve 2 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerindeki anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$) ve 17 β -östradiol konsantrasyonları MDA değişiminini kontrole göre sırasıyla % 35, % 58, % 74 ve % 80 azaltmıştır. 0.25 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerinin MDA değişimi, 0.5, 1 ve 2 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerinden anlamlı olarak fazladır ($p < 0.001$). 0.5 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerinin MDA değişimi, 1 ve 2 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerinininkile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha fazla MDA oluşumu saptanmıştır ($p < 0.001$). 1 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerinin Δ MDA'sı, 2 μ M 17 β -östradiol eklenen serum örneklerinin Δ MDA'sından anlamlı olarak fazladır ($p < 0.001$).

III.1.1.5. α -Tokoferolün Etkisinin İncelenmesi

III.1.1.5.1. α -Tokoferol Konsantrasyonlarının Farklı İnkübasyon Zamanlarındaki Etkilerinin Karşılaştırılması



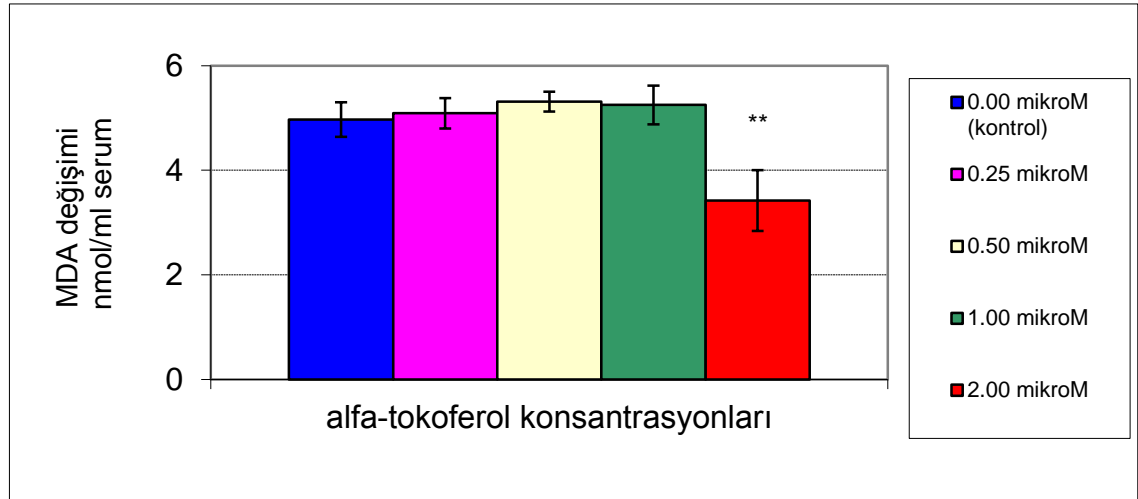
Şekil-35: Alfa-tokoferolün bakırla indüklenen serum MDA oluşumu üzerine etkisi

Şekil-35'te görüldüğü gibi kontrol ve farklı konsantrasyonlarda α -tokoferol eklenen serum örneklerinin MDA oluşumu 30. dakikadan sonra anlamlı olarak artmaya başlamıştır.

Kullanılan α -tokoferol konsantrasyonları ve inkübasyon süreleri arasındaki istatistiksel farklılıklar aşağıda açıklanmaktadır.

III.1.1.3.2. Farklı α -Tokoferol Konsantrasyonlarının Aynı İnkübasyon Zamanındaki Etkilerinin Karşılaştırılması

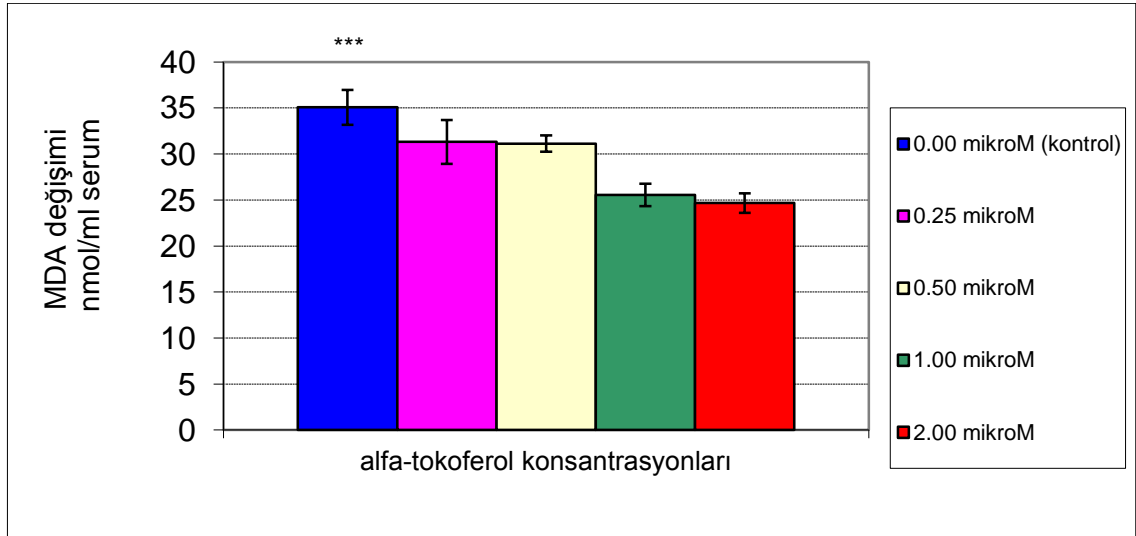
İnkübasyonun 0. dakikasında farklı konsantrasyonlarda α -tokoferol eklenen serum örneklerinin MDA oluşumu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.



Şekil-36: α -Tokoferol bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 30. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama \pm SH'dir.

** , Diğer α -tokoferol eklenen örneklerden anlamlı olarak düşük, $p < 0.01$.

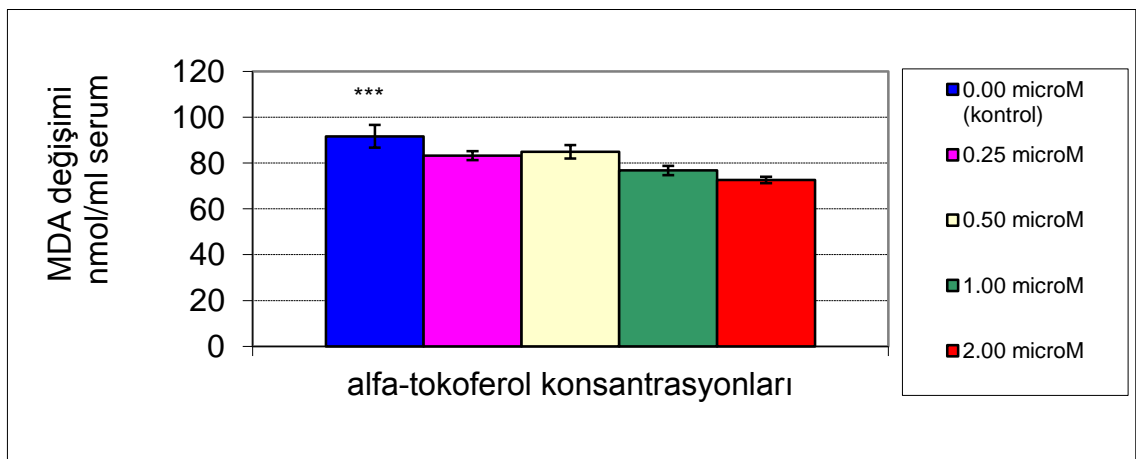
Şekil-36'da görüldüğü gibi inkübasyonun 30. dakikasında kontrol ve 0.25, 0.50, 1 μ M eklenen örneklerin MDA değişimi, 2 μ M α -tokoferol eklenen serum örneklerinden anlamlı olarak fazladır ($p < 0.01$). Ancak 0, 0.25, 0.50 ve 1 μ M α -tokoferol eklenen serum örneklerinin Δ MDA'sı arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir. İki μ M α -tokoferol MDA değişimini kontrole göre %34 azaltmıştır.



Şekil-37: α -Tokoferolün bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 60. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama \pm SH'dir.

***, 1 ve 2 μ M α -tokoferol eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

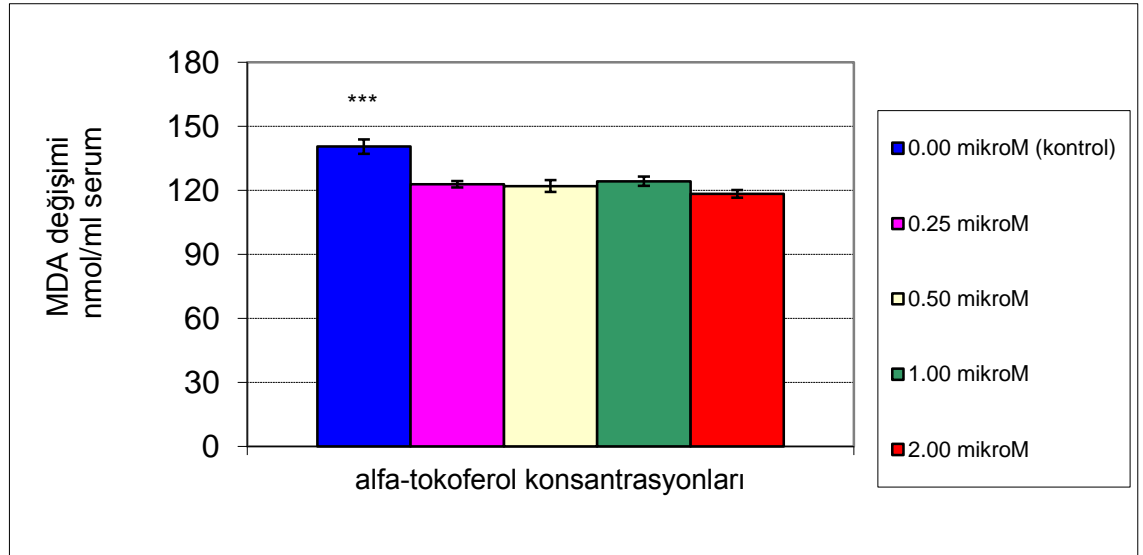
Şekil-37'de görüldüğü gibi inkübasyonun 60. dakikasında, kontrolün MDA değışimi, 1 ve 2 μ M α -tokoferol eklenen serum örneklerinden anlamlı olarak fazladır ($p < 0.001$). Ancak 0.25, 0.50, 1 ve 2 μ M α -tokoferol eklenen serum örneklerinin Δ MDA'ları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bir ve 2 μ M α -tokoferol MDA değışimini kontrole göre sırasıyla % 26 ve % 29 azaltmıştır.



Şekil-38: α -Tokoferolün bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 90. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama \pm SH'dir.

***, 2 μ M α -tokoferol eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

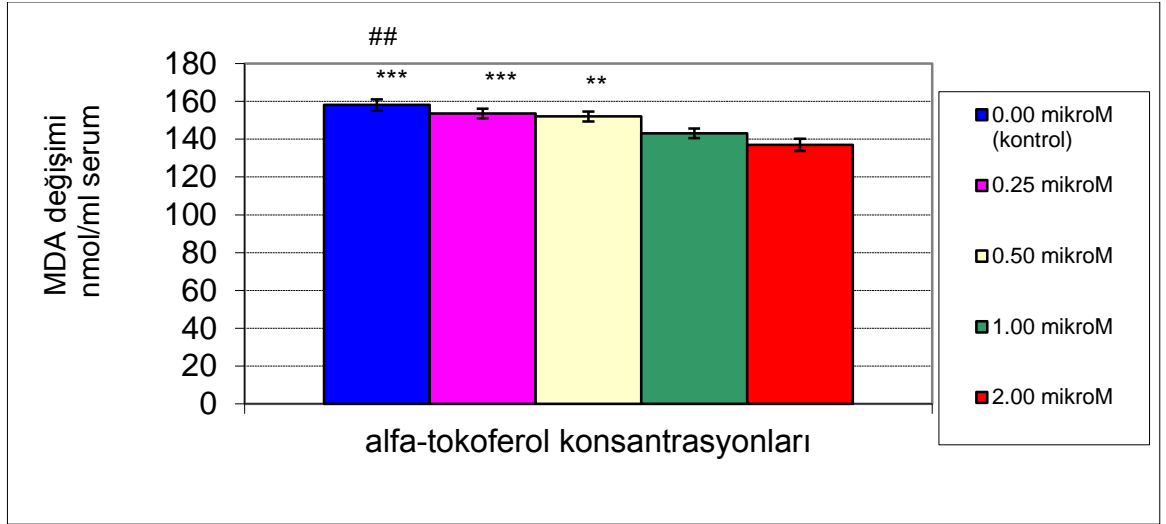
Şekil-38'de görüldüğü gibi inkübasyonun 90. dakikasında, kontrollerin MDA değişimi, 2 µM α-tokoferol eklenen serum örneklerinden anlamlı olarak fazladır (p<0.001). Ancak 0.25, 0.50, 1 ve 2 µM α-tokoferol eklenen serum örneklerinin ΔMDA'ları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir. İki µM α-tokoferol MDA değişimini kontrole göre % 20 azaltmıştır.



Şekil-39: α-Tokoferol bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 120. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama ± SH'dir.

***, 0.25, 0.50, 1 ve 2 µM α-tokoferol eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, p<0.001.

Şekil-39'da görüldüğü gibi inkübasyonun 120. dakikasında, kontrollerdeki MDA değişimi, 0.25, 0.50, 1 ve 2 µM α-tokoferol eklenen serum örneklerindeki anlamlı olarak fazladır (p<0.001). Ancak 0.25, 0.50, 1 ve 2 µM α-tokoferol eklenen serum örneklerinin ΔMDA'ları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir. İki µM α-tokoferol MDA değişimini kontrole göre % 16 azaltmıştır.



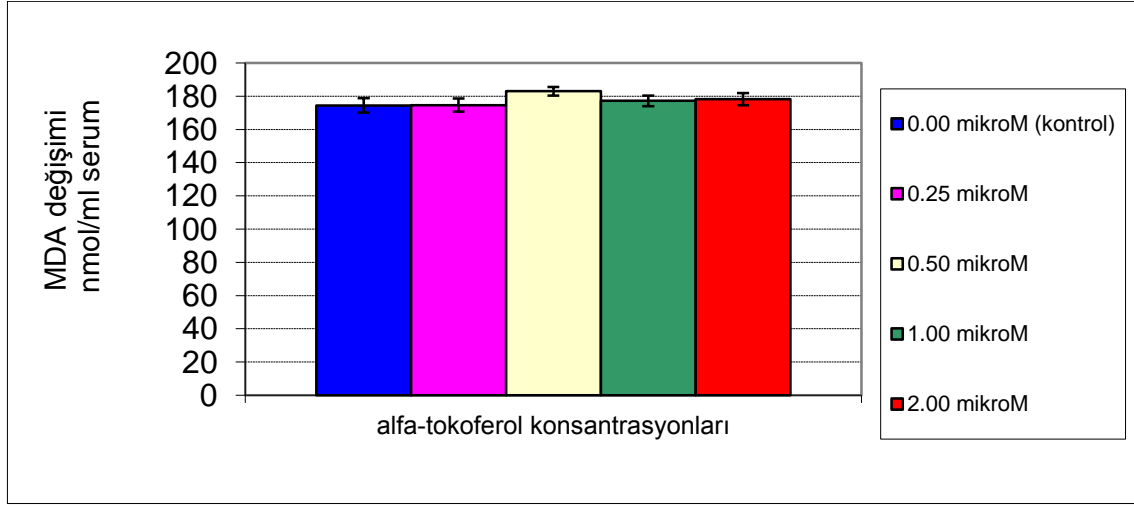
Şekil-40: α -Tokoferol bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 150. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama \pm SH'dir.

***, 2 μ M α -tokoferol eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.001$.

** , 2 μ M α -tokoferol eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.01$.

##, 1 μ M α -tokoferol eklenen örneklerden anlamlı olarak yüksek, $p < 0.01$.

Şekil-40'ta görüldüğü gibi inkübasyonun 150. dakikasında, kontrol ve 0.25 μ M α -tokoferol eklenen örneklerin MDA değişimi, 2 μ M α -tokoferol eklenen serum örneklerinininkinden anlamlı olarak fazladır ($p < 0.001$). Kontrolün MDA değişimi, 1 μ M α -tokoferol eklenen örnekten $p = 0.002$ anlam derecesinde fazladır. 0.5 μ M α -tokoferol eklenen serum örneklerinin Δ MDA'larının, 2 μ M α -tokoferol eklenen serum örneklerinin Δ MDA'sından $p = 0.002$ anlam derecesinde fazladır. 1 ve 2 μ M α -tokoferol eklenen serum örneklerinin Δ MDA'ları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir. İki μ M α -tokoferol MDA değişimini kontrole göre % 13 azaltmıştır.

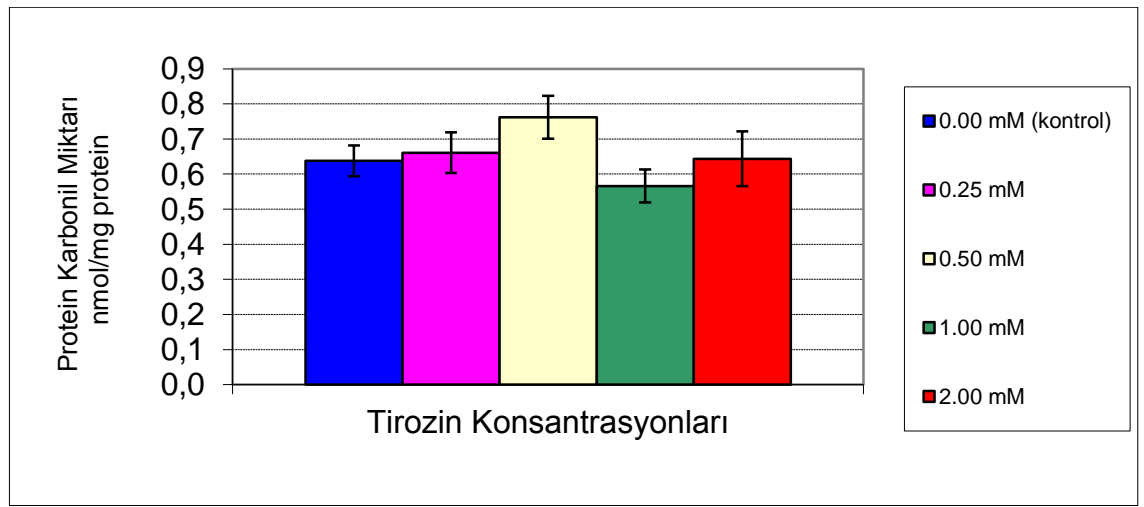


Şekil-41: α -Tokoferolün bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunun 180. dakikasındaki MDA oluşumuna etkisi. Değerler ortalama \pm SH'dir.

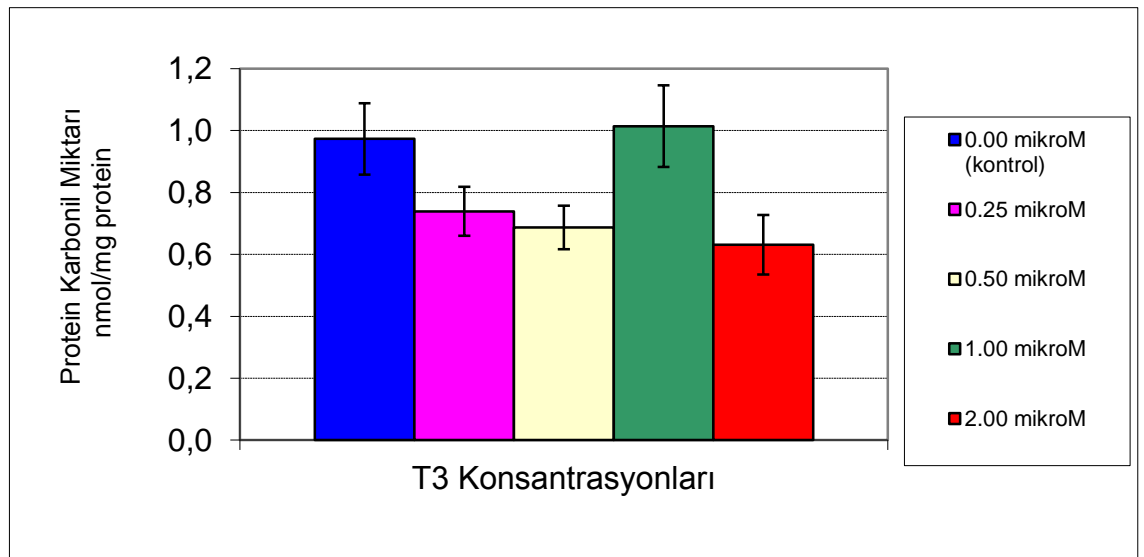
Şekil-41'de görüldüğü gibi inkübasyonun 180. dakikasında kontrol ile 0.25, 0.50, 1 ve 2 μ M α -tokoferol eklenen örneklerin MDA değışimi arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir.

III.1.2. Antioksidanların Protein Karbonil Oluşumu Üzerine Olan Etkilerinin İncelenmesi

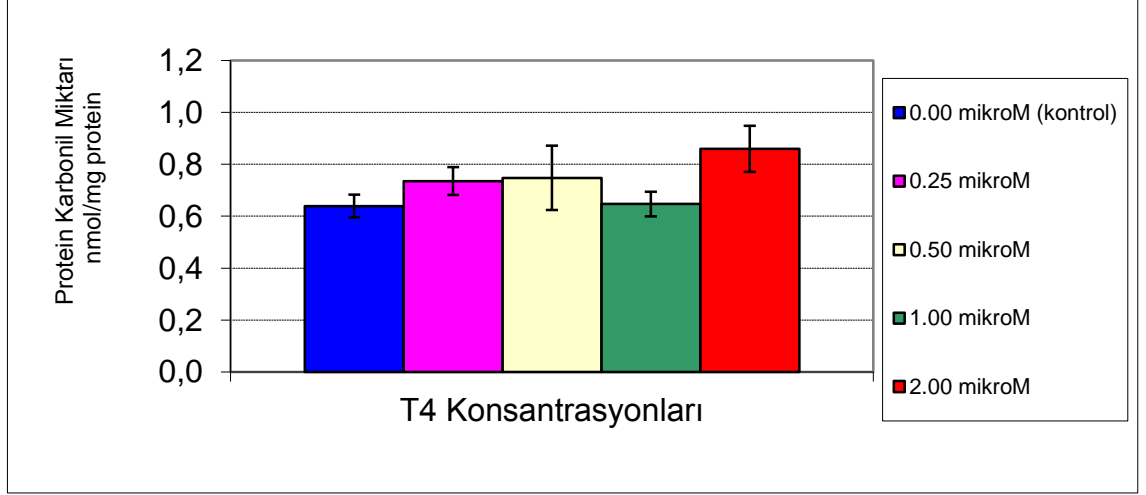
Tirozin, T₃, T₄, 17β-östradiol ve α-tokoferolün 5 farklı konsantrasyonunun eklendiği serum örneklerinde protein karbonil oluşumu istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir (Şekil-42, 43, 44, 45, 46).



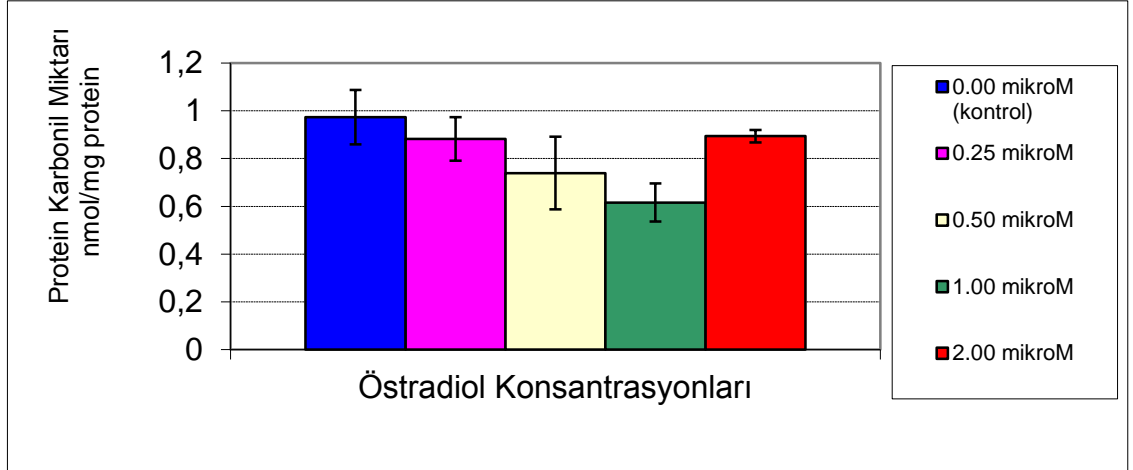
Şekil-42: Tirozinin protein karbonil oluşumu üzerine etkisi. Değerler ortalama ± SH'dir.



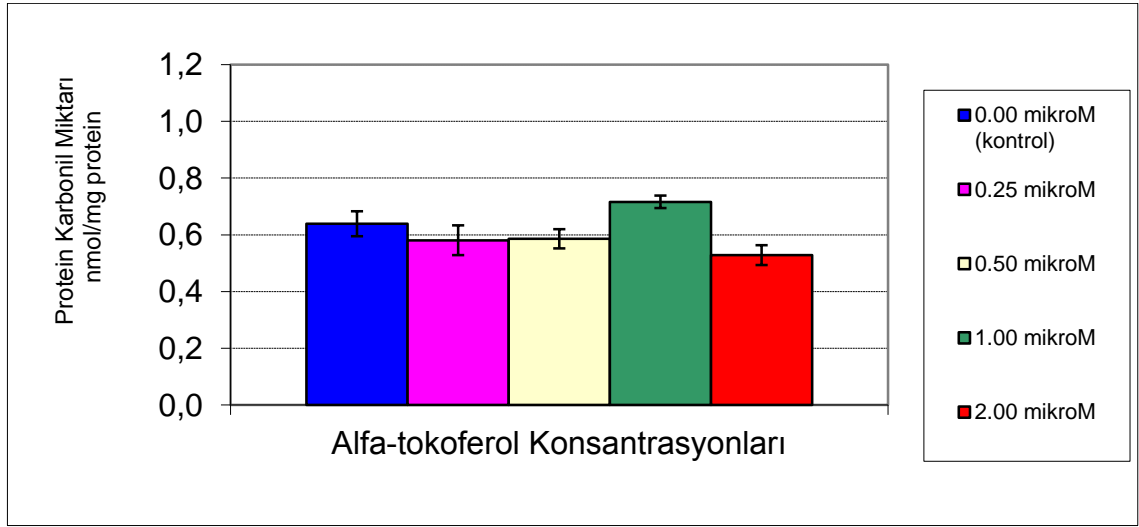
Şekil-43: T₃'ün protein karbonil oluşumu üzerine etkisi. Değerler ortalama ± SH'dir.



Şekil-44: T₄'ün protein karbonil oluşumu üzerine etkisi. Değerler ortalama ± SH'dir.



Şekil-45: 17β-östradiolün protein karbonil oluşumu üzerine etkisi. Değerler ortalama ± SH'dir.



Şekil-46: α -Tokoferolün protein karbonil oluşumu üzerine etkisi. Değerler ortalama \pm SH'dir.

III.2. Hipertiroidi Tanısı Almış Hastalarda Tedavi Öncesi ve Sonrasında Elde Edilen Verilerin Karşılaştırılması

Çalışmaya hipertiroidi tanısı konmuş yaş ortalaması 53 ± 12 olan 19 erkek hasta gönüllü olarak katılmıştır. Tedavi sonrasında takip edilen bu hastalardan 2'si ile daha sonra bağlantı kurulamamış, 1 vaka ötiroidik duruma geldikten sonra çalışmaya katılmak istememiş, 1 vaka ise tedaviye henüz tiroid hormonlarının normale dönüşü ile cevap vermediği için ötiroidik gruba alınmamıştır. Tedavi sonrası grupta 15 kişi bulunmaktadır. Hastalar tedavi başlangıcından sonra ortalama 5 ay takip edilmişlerdir.

Hipertiroidi tanısı almış hastaların tedavi öncesi ve sonrasında elde edilen verilerin eşleştirilmiş t-testi ile karşılaştırılması Tablo-2, 3, 4 ve 7'de görülmektedir. Buna göre Tablo-2'de görüldüğü gibi tedavi sonrasında serbest T_3 , total T_3 , serbest T_4 , total T_4 değerleri tedavi öncesine göre anlamlı olarak azalırken, TSH değerleri ise yine anlamlı olarak yükselmiştir (sırasıyla $p=0.001$, $p=0.003$, $p=0.008$, $p<0.001$, $p=0.039$).

Tablo-2: Hipertiroidik hastaların tedavi öncesi ve sonrasında serbest T_3 , total T_3 , serbest T_4 , total T_4 , TSH (ortalama \pm SS)

Parametreler	Tedavi öncesi (n=15)	Tedavi sonrası (n=15)	P*
Serbest T_3 (pg/ml)	6.42 \pm 2.44	3.41 \pm 0.62	0.001
Total T_3 (ng/ml)	2.73 \pm 1.46	1.39 \pm 0.52	0.003
Serbest T_4 (ng/dl)	3.49 \pm 1.83	1.21 \pm 0.57	0.008
Total T_4 (μ g/dl)	12.52 \pm 2.30	8.58 \pm 3.86	<0.001
TSH (μ IU/ml)	0.01 \pm 0.008	2.39 \pm 4.05	0.039

*p, eşleştirilmiş t-testi anlamlılık derecesi

Tablo-3: Hipertiroidik hastaların tedavi öncesi ve sonrasında serum MDA ve protein karbonil miktarı, plazma non-HDL oksidasyonu ve eritrosit SOD ve GPx aktiviteleri (ortalama±SS)

Parametreler	Tedavi öncesi (n=15)	Tedavi sonrası (n=15)	P*
MDA (nmol/ml)	9.88±2.25	8.88±2.02	0.007
Protein karbonil miktarı (nmol/mg protein)	1.017±0.530	0.656±0.116	0.018
Non-HDL oksidasyonu (nmol MDA / mg kolesterol)	70.06±11.22	67.39±12.41	0.045
SOD (Ü/g Hb)	1206.3±201.4	866.9±156.0	<0.001
GPx (Ü/g Hb)	51.49±6.40	46.68±5.49	0.031

*p, eşleştirilmiş t-testi anlamlılık derecesi

Tablo-3'te görüldüğü gibi serum MDA, protein karbonil miktarı ve plazma non-HDL fraksiyonun oksidasyona olan duyarlılığı tedavi sonrasında tedavi öncesine göre anlamlı olarak azalmıştır (sırasıyla p=0.007, p=0.018, p=0.045). Benzer şekilde SOD ve GPx enzimlerinin aktiviteleri de tedavi sonrasında öncesine göre anlamlı olarak azalmıştır (sırasıyla p<0.001 ve p=0.031).

Tablo-4: Hipertiroidik hastaların tedavi öncesi ve sonrasında total protein, albumin, globulin, total kolesterol, HDL kolesterol, LDL kolesterol, VLDL kolesterol ve trigliserid miktarları (ortalama±SS)

Parametre	Tedavi öncesi (n=15)	Tedavi sonrası (n=15)	P*
Total protein (g/dl)	7.05±0.57	7.23±0.36	A.D.**
Albumin (g/dl)	4.43±0.24	4.55±0.28	A.D.
Globulin (g/dl)	2.76±0.38	2.66±0.37	A.D.
Total kolesterol (mg/dl)	175±41	205±47	0.015
HDL kolesterol (mg/dl)	41.5±8.7	51±9	0.002
LDL kolesterol (mg/dl)	105±27	122±51	A.D.
VLDL kolesterol (mg/dl)	29.2±13.8	31.1±17.1	A.D.
Trigliserid (mg/dl)	135±71	155±85	A.D.

* p, eşleştirilmiş t-testi anlamlılık derecesi

**A.D., İstatistiksel olarak anlam farkı yok

Tablo-4'te gösterildiği gibi çalışmaya katılan gönüllülerin protein profillerinde tedavi sonrasında bir değişiklik izlenmezken, lipid profillerinde ise sadece kolesterol ve HDL kolesterol düzeyleri anlamlı olarak artmıştır (sırasıyla p=0.015, p=0.002).

Tablo-5: Hipertiroidili hastaların tedavi öncesi elde edilen bazı parametreleri arasındaki korelasyon bağıntıları (n=19)

Parametreler	r	p
Tirozin-Total T ₄	0.787	<0.01
Tirozin-Serbest T ₃	0.560	<0.05
Tirozin-SerbestT ₄	0.543	<0.05
MDA-Total T ₃	0.774	<0.01
Total kolesterol-Total T ₄	-0.563	<0.05
HDL kolesterol-Total T ₄	-0.639	<0.05

r: Pearson'un korelasyon analizi ile saptanan korelasyon katsayısı

p: istatistiksel anlamlılık

Hipertiroidili hastalarda tedavi öncesinde çeşitli parametrelerin ilişkilerinin incelenmesi amacıyla Pearson'un korelasyon analizi yapıldı ve elde edilen sonuçlar Tablo-5'te verildi. Hipertiroidili hastaların serum tirozin miktarlarıyla tiroid hormonları arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyonlar olduğu saptandı. Yine aynı hasta grubunda total T₃ ile MDA düzeyi arasında (r=0.774, p<0.01) pozitif korelasyon olduğu gösterildi.

Tablo-6: Hipertiroidi tanısı alan hastaların tedavi sonrası bazı parametreleri arasındaki korelasyon bağıntıları (n=15)

Parametreler	r	p
TSH-Total T ₃	-0.688	<0.01
TSH-Serbest T ₃	-0.639	<0.05
TSH-Total T ₄	-0.883	<0.01
TSH-Serbest T ₄	-0.543	<0.01
Total kolesterol-Total T ₄	-0.563	<0.05

r: Pearson'un korelasyon analizi ile saptanan korelasyon katsayısı

p: istatistiksel anlamlılık

Tablo-6'da görüldüğü gibi tedavi sonrasında TSH düzeyi, total T₃, serbest T₃, total T₄ ve serbest T₄ düzeyi ile negatif korelasyon göstermektedir (sırasıyla r = -0.688 p<0.01, r = -0.639 p<0.05, r = -0.883 p<0.01, r = -0.543 p<0.01).

Tablo-7: Hipertiroidi tanısı almış hastaların tedavi öncesi ve sonrasında amino asit miktarları (ortalama±SS)

Amino asit (µM)	Tedavi öncesi (n=15)	Tedavi sonrası (n=15)	P*
Taurin	97±45	57±20	0.014
Aspartik asit	30±13	16±8	0.003
Treonin	99±26	67±17	0.003
Serin	137±49	84±23	0.004
Glutamik asit	86±69	35±29	0.015
Glutamin	388±140	321±74	A.D. **
Glisin	198±70	135±39	0.012
Alanin	270±99	190±47	0.022
Sitrulin	26±14	21±8	A.D.
Valin	180±39	119±22	<0.001
Metionin	23±7	15±3	0.004
İzolösin	65±21	41±9	0.001
Lösin	169±61	104±21	0.002
Tirozin	71±14	43±13	<0.001
Fenilalanin	87±25	49±15	<0.001

* p, eşleştirilmiş t-testi anlamlılık derecesi

**A.D., İstatistiksel olarak anlam farkı yok

Tablo-7'de görüldüğü gibi glutamik asit, glutamin ve sitrulin haricinde ölçülen serum amino asit düzeyleri tedavi sonrasında öncesine göre anlamlı olarak azalmıştır.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde bir çok hastalığın fizyopatolojisinde, oksidatif hasar ve antioksidan savunma sistemlerinin rolü üzerinde durulmaktadır. Hemen hemen bütün tıp dergilerinde bu konuyla ilgili yayınlara rastlanmaktadır.

Alfa-tokoferol ve 17- β -östradiolün antioksidan etkinlikleri hem in vivo hem de in vitro ortamlarda gerçekleştirilen çalışmalarla desteklenmektedir (39-41). Her iki molekülün de yapısında bulunan fonksiyonel fenolik hidroksil grubunun radikal toplayıcısı olarak davrandığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (17, 22, 39-41). Tirozin, T₃ ve T₄'ün antioksidan etkinliği de in vitro ortamda ve in vivo ortamı taklit eden koşullarda çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir (14-23, 42, 43). Ancak α -tokoferol, 17- β -östradiol, tirozin, T₃ ve T₄'ün antioksidan kapasitelerini aynı çalışmada inceleyen bir makaleye rastlanmamaktadır.

Biz bu çalışmada α -tokoferol ve 17- β -östradiol gibi yapısında fenol halkası içeren tirozin ve onu yapı taşı olarak kullanarak sentezlenen tiroid hormonlarının (T₃ ve T₄) antioksidan etkinliklerini in vitro koşullarda araştırmayı ve karşılaştırmayı hedefledik. Bu konuda yaptığımız ön çalışmalar değerlendirildiğinde, tirozinin 0-2 mM aralığındaki konsantrasyonlarının, T₃, T₄, α -tokoferol ve 17- β -östradiolün ise tirozinden 1000 kat daha düşük konsantrasyon aralığı olan 0-2 μ M konsantrasyonlarının antioksidan etkinliğinin incelenmesinin uygun olduğu sonucuna vardık. Bu konuda yapılmış bazı çalışmalar da benzer konsantrasyon aralıklarını kullanmışlardır (17, 19, 20, 22).

Lipid peroksidasyonunun metallerle (bakır ve demir) indüklenmesi, in vitro ortamda antioksidanların lipidler üzerine olan etkisini incelemek için en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Biz de çalışmamızda lipid peroksidasyonunun bakırla indüklendiği bir modeli uyguladık ve indüksiyon öncesinde ortama etkinliğini incelemek istediğimiz antioksidan maddeleri ekledik. İnkübasyonun başlangıcında serum örneklerinin MDA içeriklerinin birbirinden farksız olması,

farklı konsantrasyonlarda eklenen bu antioksidanların, serum lipid peroksidasyonunun başlangıcına etki etmediğini göstermektedir.

Bakırla indüklediğimiz serum lipid peroksidasyonu üzerine tirozinin etkisi Şekil-7'de görülmektedir. Tirozinin 0.25 ve 0.50 mM konsantrasyonlarının, serum lipidlerini peroksidasyondan koruma etkinlikleri birbirine yakın iken daha yüksek konsantrasyonları (1 ve 2 mM) serum lipidlerini korumada daha güçlüdür. Tirozinin 2 mM konsantrasyonunun en güçlü etkinlik göstermesi, tirozinin artan konsantrasyonlarının serum lipidlerini bakırla indüklenen peroksidasyondan korumada daha güçlü olduğunu göstermektedir.

Tirozinin LDL oksidasyonu üzerine etkisini inceleyen Exner ve ark. LDL'yi HOCl ile indüklemeyen önce ortama son konsantrasyonu 0.25, 0.50, 0,75 ve 1 mM olan tirozin çözeltisi eklemişler, sonuçta 0.25 mM tirozinin lipid hidroperoksitlerin meydana gelişini durduramadığını sadece sınırladığını, ancak daha yüksek tirozin konsantrasyonlarının ise lipid hidroperoksit oluşumunu tamamen durdurduğunu göstermişlerdir (16). Bizim çalışmamız da tirozinin 1 mM ve üstündeki konsantrasyonlarının bakırla indüklenen lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA oluşumunu belirli bir süre tamamen durdurduğunu ancak 0.5 mM ve altındaki tirozin konsantrasyonlarının MDA oluşumunu ancak azaltabildiğini göstermekte ve Exner ve ark. nın bulgularını desteklemektedir. Van Overveld ve ark. nın (42) seminal plazmaya eklenen 1 mM tirozinin test edilen total antioksidan kapasite üzerinde oldukça güçlü bir antioksidan etkisi olduğunu göstermeleri de bizim çalışmamızın bulgularıyla paraleldir.

Kaplotis ve ark. nın (14) $O_2^{\cdot-}$ / NO^{\cdot} aracılığıyla indükledikleri LDL oksidasyonunda ortama önceden 2 mM tirozin eklenmesinin, TBARS oluşumunu durdurulabildiğini göstermeleri de bizim çalışmamızda 1 ve 2 mM tirozinin serum lipidlerinin peroksidasyonunu belirli süre durdurmasıyla uyumludur.

4'-hidroksi difenil eter yapısındaki T_3 ve T_4 yapısal olarak birbirlerine benzemekle birlikte, T_3 'ün dıştaki fenol halkasında 5'-C'da iyod yerine hidrojen atomu bulunmaktadır (Şekil-4).

T_3 'ün serum lipid peroksidasyonunu konsantrasyona bağımlı olarak sınırladığı Şekil-14'te görülmektedir. Oziol ve ark. 2 μ M T_3 'ün AAPH ile indüklenen LDL oksidasyonunun gecikme zamanını (lag time) %50 geciktirdiğini saptamışlardır (22).

Biz de yaptığımız deneylerde aynı konsantrasyonda T_3 'ün serum lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA oluşumunu farklı inkübasyon sürelerinde %80 ile %10 arasında azalttığını gösterdik. Chomard ve ark. 0.25-3 μM aralığındaki T_3 konsantrasyonlarının bakırla indüklenen LDL peroksidasyonu üzerine etkisini konjuge dien oluşumunu takip ederek incelemişler ve 1 μM T_3 'ün konjuge dien oluşumunu %50 azalttığını göstermişlerdir (20). Hanna ve ark. 1.33 μM T_3 'ün bakır aracılığıyla indükledikleri LDL oksidasyon ürünü olan TBARS miktarını, 24 saatlik inkübasyon sonrasında %50 azalttığını saptamışlardır (19). Bizim de deney koşullarımızda 1 μM T_3 'ün MDA oluşumunu farklı inkübasyon dilimlerinde % 32'den % 9'a kadar azaltarak sınırlayabildiğini göstermemiz, Chomard ve Hanna'nın bulgularıyla desteklenmektedir.

Bizim çalışmamızda T_3 'ün düşük (0.25 ve 0.50 μM) konsantrasyonları hiçbir inkübasyon aralığında lipid peroksidasyonunu sınırlandıramayarak, kontrole ve birbirlerine karşı antioksidan etkinlikte üstünlük sağlayamamışlardır. Bir ve 2 μM konsantrasyonlar ise lipid peroksidasyonunu durduramamakla birlikte sınırlayıcı etki göstermişlerdir. Bizim çalışmamızın bulgularıyla paralel sonuçlar elde eden hem Oziol hem de Chomard, tiroid hormonlarının bakırla indüklenen LDL oksidasyonunu durduramadıkları ama konsantrasyona bağımlı olarak sınırlayabildiği sonucuna varmışlardır (20, 22).

Tirolksinin antioksidan özelliği olduğunu ilk olarak Suwa ve ark. önermiştir (43). Bizim çalışmamızda T_4 'ün 0.25-2 μM konsantrasyon aralığında bakırla indüklenen lipid peroksidasyonuna olan etkisi Şekil-21'de görülmektedir. Sonuçlarımıza göre 0.25 ve 0.50 μM T_4 konsantrasyonlarının serum lipid peroksidasyonunu sınırlandıramazken, Hanna ve ark. 0.243 μM T_4 'ün hava ile indükledikleri LDL oksidasyonunda TBARS oluşumunu %50 azalttığını göstermişlerdir (19). Hanna ve arkadaşlarına göre T_4 fizyolojik konsantrasyon aralığında, hava ile 6 saat indüklenen LDL oksidasyonunun %50'sini durdurarak, aterogenez gibi bir oluşumda antioksidan olarak rol oynayabilmektedir. Bizim çalışmamız ile Hanna ve ark. nın çalışmasının sonuçlarındaki farklılık, örneklerdeki lipid içeriğinin ve peroksidasyonu indükleme yönteminin farklılığından kaynaklanıyor olabilir.

Diğer taraftan, Hanna ve ark. 1.10 μM T_4 'ün, bakır aracılığıyla indüklenen LDL oksidasyon ürünü olan TBARS miktarını, 24 saatlik inkübasyon sonrasında, kontrole göre % 50 azalttığını göstermişlerdir (19). Biz de çalışmamızda, T_4 'ün 1 ve 2 μM konsantrasyonlarının, kontrole göre, inkübasyonun 30. ve 60. dakikalarında MDA oluşumunu anlamlı olarak azaltarak, serum lipidlerini bakırın okside edici etkisinden koruduğunu gösterdik. Bunların ışığında, T_4 'ün de T_3 gibi konsantrasyona bağlı olarak lipid peroksidasyonu üzerine koruyucu etkinlik gösterdiği söylenebilir.

T_3 ve T_4 'ün antioksidan etkinlikleri karşılaştırıldığında, hem bakırla (20) hem de AAPH (22) ile indüklenen LDL oksidasyonunda T_3 'ün aynı konsantrasyondaki T_4 'e göre daha uzun süre lipid peroksidasyonu ürünlerinin oluşumunu sınırladığı gösterilmiştir. Bizim bulgularımız da bu araştırmacıların bulgularıyla paraleldir: Bizim çalışmamızda, T_4 'ün 1 μM konsantrasyonu lipid peroksidasyonunun ürünü olan TBARS oluşumunu 60. dakikaya kadar sınırlarken, T_3 'ün aynı konsantrasyonunun koruyucu etkisi 90. dakikaya kadar sürmüştür. Yine aynı şekilde T_4 'ün 2 μM konsantrasyonu TBARS oluşumunu 60. dakikaya kadar sınırlarken, T_3 'ün aynı konsantrasyonu daha uzun süre, 180. dakikaya kadar lipid peroksidasyonunu sınırlayıcı etkisini korumayı başarmıştır. Bu da aynı konsantrasyonda T_3 'ün T_4 'e göre daha güçlü bir radikal toplayıcısı olarak davrandığını göstermektedir. Bu etkinlik farkının nedeni, T_3 'ün fenol halkasının 5'-C'unda bulunan H^+ 'i vererek, radikal toplayıcısı olarak, aynı C'da iyot taşıyan T_4 'e göre daha etkin davranması olabilir.

Kadın seks hormonları olan östrojenlerin, özellikle 17β -östradiolün antioksidan etkinliği hem in vitro hem de in vivo ortamlarda birçok araştırmacı tarafından incelenmiş ve bu molekülün antioksidan etkinliğinin varlığı birbirinden farklı konsantrasyon aralıklarında ve koşullarda gösterilmiştir (44-48). Bizim sonuçlarımızda, 17β -östradiolün antioksidan etkinliğinin konsantrasyona bağlı olduğunu göstermektedir (Şekil-28).

Çalışmamızda 17β-östradiolün test edilen 0.25, 0.50, 1 ve 2 µM konsantrasyonları MDA oluşumunu kontrole göre 90. dakikada sırasıyla % 65, %81, % 87 ve % 88 azaltırken, 1.5 saat sonra (180. dakikada) ise sırasıyla % 35, % 58, % 74 ve % 80 azaltıldığını saptadık. Bu bulgu bize, inkübasyon süresi uzadıkça 17β-östradiolün kullanılarak başlangıçtaki antioksidan etkinliğini yitirdiğini göstermektedir. LDL oksidasyonunu 2.5 µM bakırla indükleyen Subbiah ve ark. nın (46) 5 µM 17β-östradiolün TBARS oluşumunu 4 saatlik inkübasyon sonunda %50 azaltıldığını göstermeleri bizim vardığımız sonuçlarla uyumludur.

Tüm bu çalışmaların aksine Zuckerman ve ark., 5 µM bakırla indüklenen LDL oksidasyonu üzerine 5 µM 17β-östradiolün 5 saatlik inkübasyon süresi sonunda antioksidan etkisinin olmadığını göstermişlerdir (48). Bu çalışmada 17β-östradiol bizim çalışmamızda olduğu gibi başlangıçta etkin iken 5 saatin sonunda bu özelliğini kaybetmiş olabilir. Ayrıca kullanılan bakır konsantrasyonunun bizim çalışmamızdakinden daha yüksek olması, lipid peroksidasyonunun daha kısa sürede hızlanmasına neden olarak, 17β-östradiolün antioksidan etkinliğinin hızla tükenmesiyle sonuçlanmış olabilir.

Bizim çalışmamızda 17β-östradiolün 250 nM konsantrasyonu 2 µM bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunu sınırlandırmıştır. Mooradian ve ark. nın 200 nM 17β-östradiolün, AAPH ile indüklenen floresans kaybını, kontrole göre anlamlı olarak azaltıldığını göstermeleri ise bizim çalışmamızın sonucuyla uyumludur (49).

Alfa-tokoferol (vitamin E) tek bir fenol halkası içeren lipofilik bir bileşiktir ve direkt antioksidan olarak davranır. Biyokimyasal olarak, vitamin E molekülü, diğer fenoller gibi, eşleşmemiş elektronu olan molekülleri (reaktif hidroksil radikali gibi) stabilize etmek ve zararsız hale getirmek için proton verebilir. Denenen olası antioksidan moleküllerin radikal toplayıcısı olarak davranabilme kapasiteleri, antioksidan etkinliği pek çok çalışmada gösterilen E vitaminiyle kıyaslanmaktadır. Biz de bu çalışmada, bakırla indüklenen lipid peroksidasyonu üzerine etkilerini ayrı ayrı incelediğimiz tirozin, T₃, T₄ ve 17β-östradiolün etki

gücünü birbirleriyle ve E vitaminiyle karşılaştırdık. Olası antioksidan güçlerini değerlendirdiğimiz moleküllerin bakırla indüklediğimiz serum lipid peroksidasyonunu sınırlamada etkinlik sırasını 17β -östradiol > T_3 > α -tokoferol > T_4 > tirozin olarak saptadık.

Membran fosfolipid peroksidasyonuna antioksidanların etkinliğini inceleyen Sugioka ve ark. 1-4 μ M α -tokoferolün aynı konsantrasyonda 17β -östradiole göre 4 kat daha fazla koruma sağladığını göstermişlerdir (50). Bizim çalışmamızda ise 17β -östradiol, bakırla indüklenen serum lipid peroksidasyonunu sınırlandırmada α -tokoferole göre daha etkin davranmıştır. Anabilim dalımız laboratuvarlarında yapılan bir çalışmada da bizim sonuçlarımızı destekleyecek şekilde egzersize bağlı oksidan hasarda östradiolün non-HDL kolesterolü oksidasyondan α -tokoferole göre daha iyi koruma sağladığı gösterilmiştir (51). Yen ve ark. nın linoleik asit peroksidasyonunu durdurmada 0.25 mM α -tokoferolün aynı konsantrasyondaki tirozinden daha etkin olduğunu göstermiş olmaları da bizim bulgularımızı desteklemektedir (17).

Deney koşullarımızda tirozin, T_4 , T_3 , 17β -östradiol ve α -tokoferolün serum protein karbonillenmesi üzerine etkisi olduğunu gösteremedik ancak çeşitli moleküllerin serum protein karbonillenmesi üzerine olan etkisini in vitro koşullarda inceleyen bir literatüre de rastamadığımız için diğer çalışmacıların bulgularıyla kıyaslayamamaktayız. Bu moleküllerin protein oksidasyonu üzerine olan etkileri daha farklı koşullarda incelenebilir.

Tiroid hormonları biyokimyasal yapıları nedeniyle antioksidan olarak davranırken, in vivo ortamda organizmanın oksijenli solunumunun mitokondride artmasına neden olarak, serbest oksijen radikalleri oluşumunu indirekt olarak tetiklemektedir (52).

İn vitro deney koşullarında radikal toplayıcısı olarak davrandığını gösterdiğimiz tirozin, T_3 ve T_4 'ün in vivo koşullardaki davranışını hipertiroidi tanısı almış hastalarda incelerken, antioksidan olduğu gösterilmiş östrojenin konsantrasyonlarındaki fizyolojik değişkenliğin, incelediğimiz parametreler

üzerine olabilecek olası etkisini dışlamak amacıyla projenin in vivo basamağını erkek hastalar dahil edildi.

Tirotoksikozis tedavisinde, tiroid hormonlarının (serbest T₃, total T₃, serbest T₄, total T₄) yükselen seviyeleri, sentez aşamasını engelleyen propiltiourasil ve metimazol gibi ilaçlar kullanılarak normale döndürülebilir. Biz de çalışmamıza katılan hipertiroidik hastaların tiroid hormonu seviyelerinin propiltiourasil tedavisi sonrasında öncesine göre anlamlı olarak azalarak, normale döndüğünü gösterdik (Tablo-2). Hipertiroidik durumda TSH seviyeleri neredeyse ölçülme limitinin altındayken, tedavi sonrasında beklendiği gibi anlamlı olarak yükselerek normal seviyesine ulaşmıştır (p=0.039). Ayrıca tedavi sonrasında tiroid hormonlarıyla TSH seviyelerinin arasında negatif korelasyon olduğunun saptanması, bu hormonların arasındaki dengeli ilişkiyi göstermektedir (Tablo-6).

Tiroid hormonları lipid metabolizmasını düzenler. Hipertiroidide kolesterol atılımının ve LDL'nin "turn over"ının artışı, total ve LDL kolesterolünün azalmasıyla sonuçlanır. HDL kolesterolü ise azalır ya da etkilenmez (53). Biz de çalışmamızda hipertiroidi tanısı almış hastalarda total kolesterolün ve HDL kolesterolünün tiroid hormonu olan total T₄'ün artışına bağlı olarak azaldığını gösterdik (sırasıyla r= -0.663, p<0.05 ve r=-0.639, p<0.05) (Tablo-5).

Tiroid hormonlarının, hedef dokularda belirli mitokondrial enzimleri indükleyerek ve mitokondrial solunumu artırarak bazal metabolik oranı, özellikle oksidatif metabolizmayı hızlandırdığı bilinmektedir (52, 54). Hipertiroidide meydana gelen doku hasarında reaktif oksijen türlerinin rol oynadığı varsayılmaktadır. Tirotoksikozisle indüklenen metabolizma hızındaki artış, serbest radikal aracılığıyla meydana gelen doku hasarını alevlendirmektedir (55, 56). Aerobik hücrelerde superoksid ve hidrojen peroksid gibi reaktif oksijen türleri mitokondrideki oksidatif metabolizmanın ürünü olarak üretilir (5). Bu radikaller organizmada lipidlere, proteinlere ve DNA'ya saldırarak, dokuların hasara uğramasına neden olurlar. Organizmanın uğradığı hasarın göstergeleri olarak çeşitli parametreler kullanılmaktadır. Lipid peroksidasyonu göstergesi olarak MDA ve plazma non-HDL fraksiyonunun oksidasyona olan duyarlılığı,

proteinlerin uğradıkları oksidasyonun göstergesi olarak protein karbonil miktarı değerlendirilebilir. Yapılan çeşitli çalışmalarda bu göstergelerin oksidatif stresin arttığı durumlarda yükseldiği gösterilmiştir (57-62). Biz de çalışmamızda hipertiroidi tanısı almış hastalarda tedavi öncesindeki MDA düzeyinin, non-HDL fraksiyonunun oksidasyona olan duyarlılığının ve protein karbonil miktarının tedavi sonrasına göre daha yüksek olduğunu gösterdik. Magsino ve ark. ötiroidik kişilere kısa süre (7 gün) T₃ vererek oluşturdukları hipertiroidik durumda plazma MDA ve serum protein karbonil miktarında anlamlı bir değişiklik saptamamışlardır (63). Biz ise daha uzun süre tiroid hormonlarının etkisinde kalan erkek hastalarda serum MDA miktarıyla total T₃ seviyesi arasında (r=0.774, p<0.01) pozitif korelasyon saptadık.

Tapia ve ark.nın sıçanlara T₃ hormonu enjeksiyonuyla oluşturdukları deneysel hipertiroidide, karaciğer dokusunda tedavinin 2. gününde TBARS oluşumunun 3 katına çıktığını ancak aynı dokuda protein karbonil miktarının daha sonra, 3. gün maksimum %88 artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Lipidler ve proteinlerde oksidasyonun oluşum mekanizmasının farklı yollardan gerçekleşiyor olabileceği bildirilmiştir (64). Bizim çalışmamızda da serum MDA düzeyi, total T₃ ile daha iyi derecede korelasyon göstermiştir (Tablo-5).

Vücütte, serbet radikalleri ortamdan uzaklaştıran çeşitli savunma sistemleri arasında bulunan SOD ve GPx enzimleri önemli rol oynamaktadır (5). Tirotoksikoziste de oksidatif stresin arttığı sigara kullanımında ve ağır egzersizde olduğu gibi organizmayı savunmak için bu enzimlerin aktivitelerinin arttığını gösteren çalışmalar vardır (65-69). Bizim çalışmamızda hipertiroidik durumda iken SOD ve GPx aktivitelerindeki artış (Tablo-3), bu durumda artan ROT miktarına karşı gelişen bir adaptasyon sonucu olabilir.

Diarra ve ark. bebeklik döneminde beyin gelişiminde önemli rol oynayan tiroid hormonlarının değişimi ile plazma tirozin seviyesi arasındaki ilişkiyi 14 günlük sıçanlarda deneysel olarak hipertiroidi ve hipotiroidi oluşturarak incelemişlerdir. Hipertiroidi oluşturulan sıçanların plazma tirozin seviyesinin kontrole göre anlamlı olarak düşük olduğunu göstermişlerdir. Bunu, hipertiroidide

tiroid hormonlarının anabolik etkisinin, tirozinin hücreye girişini ve kullanımını arttırarak, plazma tirozin seviyesinde düşmeye neden olduğu şeklinde yorumlamışlardır (70). Biz ise çalışmamızda hipertiroidik olgularda serum tirozin miktarının, ötiroidik durumdakine kıyasla anlamlı olarak arttığını ve total T₄, serbest T₄, serbest T₃ seviyeleriyle pozitif korelasyon gösterdiğini saptadık (Tablo-5, 7). Diarra ve ark'nın 14 günlük bebek sıçanlarda, bizim ise erişkin hastalarda çalışmamız bu iki çalışmanın sonuçlarındaki farklılığın nedeni olarak gösterilebilir.

Tiroid hormonları hem doku oksidatif stresinin hem de protein degradasyonunun fizyolojik düzenleyicisidir (71). Bazı araştırmacılar, deneysel yolla sıçanlarda oluşturdukları hipertiroidi tablosunda kas ve karaciğerde protein degradesyonu olduğunu göstermişlerdir (72-75). Tawa ve ark. tiroid hormonlarının proteozom-bağımlı proteolitik yolu aktive ettiğini göstermişlerdir (76). Bizim çalışmamızda da hipertiroidik durumda tirozin artışının yanısıra diğer serum amino asit konsantrasyonlarında görülen anlamlı yükseklik artan protein yıkımına işaret etmektedir (Tablo-7).

In vitro ve in vivo basamaklardan oluşan bu çalışmanın sonuçlarına göre, hem tiroid hormonları hem de tirozin in vitro koşullarda konsantrasyona bağımlı olarak lipid peroksidasyonunu durdurarak lipidleri oksidasyondan koruyucu etkiye sahiptir. T₃'ün antioksidan etkinliği α -tokoferolden güçlü, ancak 17 β -östradiolden zayıf iken, T₄'ün ve tirozinin etkileri hem 17 β -östradiolden hem de α -tokoferolden daha zayıftır. Diğer taraftan tiroid hormonları sahip oldukları hormonal etki ile oksijenli solunumu uyarıp, oksidasyonu indüklemektedir ve in vitro şartlarda antioksidan etkinlikleri gösterilen bu moleküller fizyolojik koşullarda bu oksidasyonu engelleyememektedir.

KAYNAKLAR

1. Haddad JJ: Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cellular Signalling*. 14(11):879-897, 2002.
2. Haddad JJ: Oxygen-sensing mechanisms and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology. *Respir Res*. 3 (1): 26, 2002.
3. Finkel T: Oxidant signals and oxidative stress. *Current Opinion in Cell Biology*. 15:247-254, 2003.
4. Peng J, Jones GL, Watson K: Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. *Free Radic Biol Med*. 28(11): 1598-1606, 2000.
5. Gutteridge JM: Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*. 41(12 Pt 2):1819-1828, 1995.
6. Halliwell B, Gutteridge JM: Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. *Lancet* 2(8411):1095, 1984.
7. Fiorillo C, Oliviero C, Rizzuti G, Nediani C, Pacini A, Nassi P: Oxidative stress and antioxidant defences in renal patients receiving regular haemodialysis. *Clin Chem Lab Med*. 36:149–153, 1998.
8. Amici A, Levine RL, Tsai L, Stadtman ER: Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed oxidation reactions. *J Biol Chem*. 264(6):3341-3346, 1989.
9. Uchida K, Kato Y, Kawakishi S: A novel mechanism for oxidative cleavage of prolyl peptides induced by the hydroxyl radical. *Biochem Biophys Res Commun*. 169(1):265-271, 1990.
10. Chevion M, Berenshtein E, Stadtman ER: Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res*. 33 Suppl:S99-108, 2000.
11. Beal MF: Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med*. 32(9):797-803, 2002.
12. Ji LL: Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Radic Biol Med*. 18(6):1079-1086, 1995.
13. Burtis CA, Ashwood ER: *Tietz Text Book of Clinical Chemistry* ed:3, pp:446 ve 1497, Saunders, 1999.
14. Kapiotis S, Hermann M, Held I, Muhl A, Gmeiner B: Tyrosine: an inhibitor of LDL oxidation and endothelial cell cytotoxicity initiated by superoxide/nitric oxide radicals. *FEBS Lett*. 409(2):223-226, 1997.
15. Santanam N, Parthasarathy S: Paradoxical actions of antioxidants in the oxidation of low density lipoprotein by peroxidases. *J Clin Invest*. 95(6):2594-2600, 1995.

16. Exner M, Alt E, Hermann M, Hofbauer R, Kapiotis S, Quehenberger P, Speiser W, Minar E, Gmeiner B: p-Hydroxyphenylacetaldehyde, the major product of tyrosine oxidation by the activated myeloperoxidase system can act as an antioxidant in LDL. *FEBS Lett.* 490(1-2):28-31, 2001.
17. Yen GC, Hsieh CL: Antioxidant effects of dopamine and related compounds. *Biosci Biotechnol Biochem.* 61(10): 1646-1649, 1997.
18. Savenkova ML, Mueller DM, Heinecke JW: Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase is a physiological catalyst for the initiation of lipid peroxidation in low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 269(32):20394-20400, 1994.
19. Hanna AN, Feller DR, Witiak DT, Newman HA: Inhibition of low density lipoprotein oxidation by thyronines and probucol. *Biochem Pharmacol.* 45(3): 753-762, 1993.
20. Chomard P, Seguin C, Loireau A, Autissier N, Artur Y: Effects of iodotyrosines, thyronines, iodothyroacetic acids and thyromimetic analogues on in vitro copper-induced oxidation of low-density : *Biochem Pharmacol.* 55(10):1591-1601, 1998.
21. Benvenga S, Cahnmann HJ, Rader D, Kindt M, Facchiano A, Robbins J: Thyroid hormone binding to isolated human apolipoproteins A-II, C-I, C-II, and C-III: homology in thyroxine binding sites. *Thyroid.* 4(3):261-267, 1994.
22. Oziol L, Faure P, Vergely C, Rochette L, Artur Y, Chomard P, Chomard P: In vitro free radical scavenging capacity of thyroid hormones and structural analogues. *J Endocrinol.* 170(1):197-206, 2001.
23. Mooradian AD: Antioxidant properties of steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 45(6):509-511, 1993.
24. Behl C, Moosmann B: Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radic Biol Med.* 33(2):182-191, 2002.
25. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR: Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev.* 23(1):38-89, 2002.
26. Oppenheimer JH: Evolving concepts of thyroid hormone action. *Biochimie.* 81(5):539-543, 1999.
27. Guerrero A, Pamplona R, Portero-Otin M, Barja G, Lopez-Torres M: Effect of thyroid status on lipid composition and peroxidation in the mouse liver. *Free Radic Biol Med.* 26(1-2):73-80, 1999.
28. Asayama K, Dobashi K, Hayashibe H, Megata Y, Kato K: Lipid peroxidation and free radical scavengers in thyroid dysfunction in the rat: a possible mechanism of injury to heart and skeletal muscle in hyperthyroidism. *Endocrinology* 121(6): 2112-2118, 1987.

29. Venditti P, Balestrieri M, Di Meo S, De Leo T: Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues. *J Endocrinol.* 155(1):151-157, 1997.
30. Videla LA: Energy metabolism, thyroid calorogenesis, and oxidative stress: functional and cytotoxic consequences. *Redox Rep.* 5(5):265-275, 2000.
31. Tapia G, Cornejo P, Fernandez V, Videla LA: Protein oxidation in thyroid hormone-induced liver oxidative stress: relation to lipid peroxidation. *Toxicol Lett.* 106(2-3):209-214, 1999.
32. Stadtman ER: Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med.* 9(4):315-325, 1990.
33. Magsino CH Jr, Hamouda W, Ghanim H, Browne R, Aljada A, Dandona P: Effect of triiodothyronine on reactive oxygen species generation by leukocytes, indices of oxidative damage, and antioxidant reserve. *Metabolism* 49(6):799-803, 2000.
34. Ruiz-Larrea MB, Martin C, Martinez R, Navarro R, Lacort M, Miller NJ: Antioxidant activities of estrogens against aqueous and lipophilic radicals; differences between phenol and catechol estrogens. *Chem Phys Lipids* 105(2):179-188, 2000.
35. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E: Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 233:346-357, 1994.
36. Zhang A, Vertommen J, Van Gaal L, De Leeuw I: A rapid and simple method for measuring the susceptibility of low-density-lipoprotein and very-low-density-lipoprotein to copper-catalyzed oxidation. *Clin Chim Acta* 227(1-2):159-173, 1994.
37. Kamal AAM, Gomera A, Khafif M, Hamuad A: Plasma lipid peroxides among workers exposed to silica or asbestos dusts. *Environmental Research* 49:173-180, 1989.
38. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS: Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18(6):499-502, 1972.
39. Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post A, Widmann M, Newton CJ, Holsboer F: Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol* 51(4):535-541, 1997.
40. Seeger H, Mueck AO, Lippert TH: The inhibitory effect of endogenous estrogen metabolites on copper-mediated in vitro oxidation of LDL. *Int J Clin Pharmacol Ther* 36(7):383-385, 1998.
41. Venkatesan P, Rao MN: Structure-activity relationships for the inhibition of lipid peroxidation and the scavenging of free radicals by synthetic symmetrical curcumin analogues. *J Pharm Pharmacol* 52(9): 1123-1128, 2000.

42. van Overveld FW, Haenen GR, Rhemrev J, Vermeiden JP, Bast A: Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. *Chem Biol Interact* 127(2):151-161, 2000.
43. Suwa K, Nakano M: Thyroxine deiodination associated with NADPH-dependent lipid peroxidation in a submicrosomal system. *Proc Soc Exp Biol Med* 150(2):401-406, 1975.
44. Ayres S, Tang M, Subbiah MT: Estradiol-17beta as an antioxidant: some distinct features when compared with common fat-soluble antioxidants. *J Lab Clin Med* 128(4):367-375, 1996.
45. Maziere C, Auclair M, Ronveaux MF, Salmon S, Santus R, Maziere JC: Estrogens inhibit copper and cell-mediated modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 89(2-3):175-182, 1991.
46. Subbiah MT, Kessel B, Agrawal M, Rajan R, Abplanalp W, Rymaszewski Z: Antioxidant potential of specific estrogens on lipid peroxidation. *J Clin Endocrinol Metab* 77(4):1095-1097, 1993.
47. Ruiz-Larrea MB, Martin C, Martinez R, Navarro R, Lacort M, Miller NJ: Antioxidant activities of estrogens against aqueous and lipophilic radicals; differences between phenol and catechol estrogens. *Chem Phys Lipids* 105(2):179-188, 2000.
48. Zuckerman SH, Bryan N: Inhibition of LDL oxidation and myeloperoxidase dependent tyrosyl radical formation by the selective estrogen receptor modulator raloxifene (LY139481 HCL). *Atherosclerosis* 126(1):65-75, 1996.
49. Mooradian AD: Antioxidant properties of steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 45(6):509-511, 1993.
50. Sugioka K, Shimosegawa Y, Nakano M: Estrogens as natural antioxidants of membrane phospholipid peroxidation. *FEBS Lett* 1;210(1):37-39, 1987.
51. Akova B, Surmen-Gur E, Gur H, Dirican M, Sarandol E, Kucukoglu S: Exercise-induced oxidative stress and muscle performance in healthy women: role of vitamin E supplementation and endogenous oestradiol. *Eur J Appl Physiol* 84(1-2):141-147, 2001.
52. Venditti P, Daniele MC, Masullo P, Di Meo S: Antioxidant-sensitive triiodothyronine effects on characteristics of rat liver mitochondrial population. *Cell Physiol Biochem* 9(1):38-52, 1999.
53. Duntas LH: Thyroid disease and lipids. *Thyroid* 12(4):287-293, 2002.
54. Johnson MA, Turnbull DM: Mitochondrial oxidative enzyme activity in individual fibre types in hypo- and hyperthyroid rat skeletal muscles. *Q J Exp Physiol* 69(2):257-270, 1984.
55. Wilson R, Chopra M, Bradley H, McKillop JH, Smith WE, Thomson JA: Free radicals and Graves' disease: the effects of therapy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 30(4):429-33, 1989.

56. Sundaram V, Hanna AN, Koneru L, Newman HA, Falko JM: Both hypothyroidism and hyperthyroidism enhance low density lipoprotein oxidation. *J Clin Endocrinol Metab* 82(10):3421-3424, 1997.
57. Siems W, Quast S, Carluccio F, Wiswedel I, Hirsch D, Augustin W, Hampi H, Riehle M, Sommerburg O: Oxidative stress in chronic renal failure as a cardiovascular risk factor. *Clin Nephrol* 58 Suppl 1:S12-9, 2002.
58. Inagi R, Miyata T: Oxidative protein damage with carbohydrates and lipids in uremia: 'Carbonyl stress'. *Blood Purif* 17(2-3):95-98, 1999.
59. Requena JR, Fu MX, Ahmed MU, Jenkins AJ, Lyons TJ, Thorpe SR: Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. *Nephrol Dial Transplant* 11 Suppl 5:48-53, 1996.
60. Guerra LN, Moiguer S, Karner M, de Molina MC, Sreider CM, Burdman JA: Antioxidants in the treatment of Graves disease. *IUBMB Life* 51(2):105-109, 2001.
61. Adali M, Inal-Erden M, Akalin A, Efe B: Effects of propylthiouracil, propranolol, and vitamin E on lipid peroxidation and antioxidant status in hyperthyroid patients. *Clin Biochem* 32(5):363-367, 1999.
62. Dirican M, Tas S: Effects of vitamin E and vitamin C supplementation on plasma lipid peroxidation and on oxidation of apolipoprotein B-containing lipoproteins in experimental hyperthyroidism. *J Med Invest* 46(1-2):29-33, 1999.
63. Magsino CH Jr, Hamouda W, Ghanim H, Browne R, Aljada A, Dandona P: Effect of triiodothyronine on reactive oxygen species generation by leukocytes, indices of oxidative damage, and antioxidant reserve. *Metabolism* 49(6):799-803, 2000.
64. Tapia G, Cornejo P, Fernandez V, Videla LA: Protein oxidation in thyroid hormone-induced liver oxidative stress: relation to lipid peroxidation. *Toxicol Lett* 1;106(2-3):209-214, 1999.
65. Ji LL: Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med* 222(3):283-292, 1999.
66. Ozbay B, Dulger H: Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in Turkish population: relation to age, gender, exercise, and smoking. *Tohoku J Exp Med* 197(2):119-124, 2002.
67. Komosinska-Vassev K, Olczyk K, Kucharz EJ, Marcisz C, Winsz-Szczotka K, Kotulska A: Free radical activity and antioxidant defense mechanisms in patients with hyperthyroidism due to Graves' disease during therapy. *Clin Chim Acta* 300(1-2):107-117, 2000.
68. Adali M, Inal-Erden M, Akalin A, Efe B: Effects of propylthiouracil, propranolol, and vitamin E on lipid peroxidation and antioxidant status in hyperthyroid patients. *Clin Biochem* 32(5):363-367, 1999.
69. Aliciguzel Y, Ozdem SN, Ozdem SS, Karayalcin U, Siedlak SL, Perry G, Smith MA: Erythrocyte, plasma, and serum antioxidant activities in

- untreated toxic multinodular goiter patients. *Free Radic Biol Med* 30(6):665-670, 2001.
70. Diarra A, Lefauconnier JM, Valens M, Georges P, Gripois D: Tyrosine content, influx and accumulation rate, and catecholamine biosynthesis measured in vivo, in the central nervous system and in peripheral organs of the young rat. Influence of neonatal hypo- and hyperthyroidism. *Arch Int Physiol Biochim* 97(5):317-332, 1989.
 71. Pamplona R, Portero-Otin M, Ruiz C, Bellmunt MJ, Requena JR, Thorpe SR, Baynes JW, Romero M, Lopez-Torres M, Barja G: Thyroid status modulates glycoxidative and lipoxidative modification of tissue proteins. *Free Radic Biol Med* 27(7-8):901-910, 1999.
 72. Millward DJ, Bates PC, Brown JG, Rosochacki SR, Rennie MJ: Protein degradation and the regulation of protein balance in muscle. *Ciba Found Symp* (75):307-329, 1979.
 73. Brown JG, Bates PC, Holliday MA, Millward DJ: Thyroid hormones and muscle protein turnover. The effect of thyroid-hormone deficiency and replacement in thyroidectomized and hypophysectomized rats. *Biochem J* 194(3):771-782, 1981.
 74. Brown JG, Millward DJ: Dose response of protein turnover in rat skeletal muscle to triiodothyronine treatment. *Biochim Biophys Acta* 757(2):182-190, 1983.
 75. DeMartino GN, Goldberg AL: A possible explanation of myxedema and hypercholesterolemia in hypothyroidism: control of lysosomal hyaluronidase and cholesterol esterase by thyroid hormones. *Enzyme* 26(1):1-7, 1981.
 76. Tawa NE Jr, Odessey R, Goldberg AL: Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. *J Clin Invest* 100(1):197-203, 1997.

TEŞEKKÜR

Bu tez alıőması, Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiőtir (proje no.2001/14).

Çalıőmalarım sırasında yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen uzmanlık tezi danıőmanlarım Prof. Dr. Esmâ GÜR'e ve Yrd. Doç. Dr. Zehra SERDAR'a öncelikle teşekkür etmeyi zevkli bir borç bilirim. Uzmanlık eğitimim boyunca bana her zaman yol gosteren Biyokimya Anabilim Dalı Baőkanımız Prof. Dr. Asuman TOKULLUGİL'e ve bana zaman ve enerji harcayan kürsümüzün tüm öğretim üyelerine gönülden Őükranlarımı sunarım. Birlikte çalıőmaktan her zaman mutlu olduğum çalışma arkadaşlarıma destekleri için çok teşekkür ederim.

Tezime olan katkılarından dolayı Uludağ Üniversitesi Tıp Fakóltesi Dahiliye Ana Bilim Dalı ve Endokrinoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Erdinç Ertürk'e, laboratuvar olanaklarını sağlayan Uludağ Üniversitesi Tıbbi Tahliller, Eđitim ve Araştırma Merkez Laboratuvarı Baőkanı Prof. Dr. İ. Hakkı ULUS'a ve Devlet Hastanesi'nde çalışma olanağı sağlayan baőhekim Dr. Mete Ekőiođlu'a ve tüm çalıőanlarına ayrıca teşekkür ederim.

Őimdiye kadar her zaman yanımda olup, benden desteklerini esirgemeyen aileme Őükranlarımı sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

1973 Karşıyaka, İzmir doğumluyum. İlk öğrenimimi Talat Paşa İlkokulu'nda, orta öğrenimimi ise Bornova Anadolu Lisesi'nde 1992 yılında tamamladım. Aynı yıl Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde tıp eğitimime başlayarak, 1998 yılında tıp doktoru olarak mezun oldum. 1999 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilimdalı'nda ihtisas yapmak üzere Araştırma Görevlisi Doktor olarak göreve başladım. Halen bu göreve devam etmekteyim.