T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KAFEİK ASİT FENETİL ESTERİN SIÇANLARDA KRONİK YÜZME EGZERSİZİYLE OLUŞAN OKSİDATİF STRES VE ANTİOKSİDAN SAVUNMA ÜZERİNE ETKİLERİ

Mehmet Atilla ZEYREK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışmanlar
Prof. Dr. H. Serdar GERGERLİOĞLU
Prof. Dr. Hakkı GÖKBEL

KONYA - 2014

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KAFEİK ASİT FENETİL ESTERİN SIÇANLARDA KRONİK YÜZME EGZERSİZİYLE OLUŞAN OKSİDATİF STRES VE ANTİOKSİDAN SAVUNMA ÜZERİNE ETKİLERİ

Mehmet Atilla ZEYREK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışmanlar
Prof. Dr. H. Serdar GERGERLİOĞLU
Prof. Dr. Hakkı GÖKBEL

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 10202047 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA - 2014

i. ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimime desteklerinden dolayı Fizyoloji A.D'deki tüm hocalarıma ve diğer öğretim elemanlarına ve bilgi ve tecrübelerini paylaşan ve esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Enver Ahmet DEMİR'e, tezin istatistiksel analiz aşamasındaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Sait BODUR ve Yrd. Doç. Dr. Fatih KARA'ya, laboratuar çalışmalarıma verdiği destekler için Prof.Dr. Sadık BÜYÜKBAŞ ve Arş. Gör. Dr. Yeşim Can'a, anlayışlarından dolayı mesai arkadaşlarıma, deney aşamasındaki yardımlarından dolayı tüm SÜDAM personeline, çalışmama maddi destek sağlayan Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne ve eğitimimin her aşamasında maddi-manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme ve eşime teşekkür ederim.

ii. İÇİNDEKİLER

i. ÖNSÖZ iii

ii. İÇİNDEKİLER iv

iii. SİMGELER VE KISALTMALAR vi

1. GİRİŞ 1

1.1. Kafeik Asit Fenetil Ester 2

1.2. Egzersizde Oksidatif Stres 4

1.3. İskelet Kaslarının Egzersize Adaptasyonu 9

1.4. İskelet kas Fizyolojisinde Reaktif Oksijen Türleri'nin Rolü 10

1.5. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller 10

1.6. Serbest Radikallerin Vücuttaki Üretimi 13

1.7. Reaktif Oksijen Türleri 15

1.8. Antioksidan Savunma Sistemleri 21

2. GEREÇ VE YÖNTEM 26

2.1. Gruplar ve Hayvanlar 26

2.2. Biyokimyasal Analizler 27

2.2.1. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi 27

2.2.2. Malondialdehit Tayini 27

2.2.3. Nitrik Oksit Tayini 28

2.2.4. Total Tiyol Tayini 28

2.3. İstatistiksel Analiz 28

3. BULGULAR 29

3.1. Plazma Süperoksit dismutaz Aktivitesi 29

3.2. Plazma Malondialdehit Düzeyleri 30

3.3. Plazma Nitrik oksit Düzeyleri 30

3.4. Plazma Tiyol Düzeyleri 31

5. SONUÇ VE ÖNERİLER 34

7. SUMMARY 36

8. KAYNAKLAR 37

9. EKLER 44

11. ÖZGEÇMİŞ 45

iii. SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP **:** Adenozin trifosfat

CAPE **:** Kaffeik asit fenetil ester

CAT **:** Katalaz

DMSO : Dimetil sülfoksit

GSH **:** Glutatyon

GSH-Px **:** Glutatyon peroksidaz

GSSG **:** Okside glutatyon

GST **:** Glutatyon S transferaz

GR **:** Glutatyon redüktaz

HOCl **:** Hipoklorus radikali

H_2O_2 **:** Hidrojen peroksit

IL-8 **:** İnterlökin-8

i.p **:** İntraperitoneal

LPO **:** Lipid peroksidasyonu

LOO. **:** Peroksil radikalleri

LOOH **:** Lipid hidroperoksit

MPO **:** Myeloperoksidaz

MDA **:** Malondialdehit

NF-Ķb **:** Nükleer faktör kappa - B

NO **:** Nitrik oksit

NOS **:** Nitrik oksit sentetaz

OH^- **:** Hidroksil radikali

$O_2^{\cdot -}$ **:** Süperoksit anyonu

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

ROS **:** Reaktif oksijen türleri

RNS **:** Reaktif nitrojen türleri

SOD **:** Süperoksit dismutaz

TAK **:** Total antioksidan kapasite

TBA **:** Tiyobarbitürik Asit

TBARS **:** Tiyobarbütirik asit reaktif maddeleri

TNF- α **:** Tümor nekroz faktör alfa

T-SH **:** Total tiyol

XO **:** Ksantin oksidaz

COX **:** Siklooksijenaz

1. GİRİŞ

Antioksidan maddeler vücudumuzu reaktif oksijen türlerinin (ROS) zararlı etkilerinden koruyan önemli bir savunma sistemidir (Frankel ve Meyer 2000). Yapılan son çalışmalar propolis maddesinin biyoaktif bir bileşeni olan kafeik asit fenetil ester'in (CAPE) önemli bir antioksidan olduğunu göstermektedir (Russo ve ark 2002). CAPE çeşitli bitkisel kaynaklardan elde edilen ve bal arısı propolisinin de aktif bileşeni olan (Almas ve ark 2001), antioksidatif (Russo ve ark 2002), antienflamatuvar (Michaluart ve ark 1999) ve antikanserojenik (Chen ve ark 2001) bir maddedir ve bal arıları tarafından kovanda oluşturulan doğal bir üründür. Propolis birçok farklı bitkinin yaprak, gövde ve tomurcuklarından işçi arılar tarafından toplanır ve arılar tarafından kovanda antiseptik, antibakteriyal, antenflamatuar, immünmodülatör, antioksidan, antimutajenik ve sitotoksik etkilerinden dolayı biriktirilir (Velikova ve ark 2000). Propolis'ten köken alan CAPE antioksidan etkinliğini; nükleik asit sentezini artırıp hasarı azaltarak ve trikarboksilik asit siklusu'nu (TCA) aktif tutarak (Uz ve ark 2002), nitrik oksit sentaz (NOS) ve ksantin oksidaz (XO) aktivitesini inhibe ederek ve lipit peroksidasyonunu baskılayarak gösterir (Yilmaz ve ark 2004).

Farklı modellerde uygulanan CAPE'nin oksidatif hasarı azalttığına dair pek çok veri vardır. Bal arısı propolisi ekstresinin aktif bileşeni olan CAPE, 10 mikromol konsantrasyonda ksantin-ksantin oksidaz sistemi ve insan nötrofil hücrelerinde serbest radikal üretimini tamamiyle inhibe ettiği bildirilmiştir (Yağmurca ve ark 2004). Yapılan başka bir çalışmada doksorubisin ve bir antikanser ilacı olan antrasilin ile miyokardial dokuda oluşturulmuş oksidatif hasara karşı CAPE'nin koruyucu etkisinin olduğunu gösterilmiştir (Fadillioglu ve ark 2003).

Gerçekleştirilen çalışmada sıçan kronik yüzme egzersiz modelinde CAPE'nin plazma redoks dengesi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

1.1. Kafeik Asit Fenetil Ester

Propolis, kahverengimsi ve sakızımsı yapıda arılar tarafından toplanan kovan içerisinde peteklerin tamiri, kovanın ince bir tabaka halinde cilalanması ve çatlak ve yarıkların kapatılması için kullanılan bal arısı zamkı denilen bir maddedir. CAPE, propolis ekstresinde en fazla bulunan biyolojik aktif bileşendir (Russo ve ark 2002).

Dünyanın değişik bölgelerinden toplanan propolis örneklerinde 160'dan fazla bileşik tanımlanmıştır. Yapısında flavonoidler, steroller, vitaminler, amino asitler, ketonlar, fenolik aldehitler, fenolik asit ve onların esterleri ile polifenoller saptanmıstır. Molekül ağırlığı 284.31 gr/mol olup, formülü $C_{17}H_{16}O_4$ tür. Dimetilsülfoksit (DMSO) ve etanolde tamamen çözünmektedir (Russo ve ark 2002) .

Yapısal olarak flovanoidlere benzeyen CAPE'in iki halkasal yapısının bir tanesinde bulunan hidroksil grupları, aktif bir şekilde elektron alıp vererek oksitleyici ve redükleyici özellik gösterirler. Çok uzun aromatik ve alifatik yapıda karbon grupları taşıdığı için aynı zamanda lipofilik özellikte olup bu sayede kolayca hücre membran yapılarından geçerek etki edeceği bölgeye ulaşır ve intraperitoneal (i.p) uygulanması ile yeterli kan konsantrasyonu sağlanır (Russo ve ark 2002).

Propolisin farmakolojik aktivitesi dört kategoriye ayrılmaktadır; biyolojik polimerlere bağlanma eğilimi, ağır metal iyonları bağlayabilmesi, elektron taşınmasının hızlandırılması ve serbest radikalleri tutma kabiliyetidir. Bundan dolayı propolis antimikrobiyal (Popova ve ark 2005), reperfüzyon hasarın engellenmesi (Maffia ve ark 2002), antienflamatuvar (Michaluart ve ark 1999), antihepatotoksik (Banskota ve ark 2001), antikanser (Chen ve ark 2001, Fadillioglu ve ark 2003) ve antioksidan (Russo ve ark 2002) etkiler göstermektedir.

CAPE antioksidan özelliğini NOS ve XO aktivitesini inhibe ederek ve lipit peroksidasyonunu baskılayarak (Yilmaz ve ark 2004, Russo ve ark 2002, Ilhan ve ark 1999) aynı zamanda hücre membranından araşidonik asit salınımı ile siklooksijenaz 1 ve 2 (COX-1 ve COX-2) enzim aktivitesini engelleyerek gösterir (Mirzoeva ve Calder 1996, Maffia ve ark 2002). Yapılan bir çalışmada CAPE lipopolisakkarit uyarımlı tümör nekroz faktörü TNF-α ve interlökin IL-8 ekspresyonunu orta kulak epitelyal hücrelerinde inhibe ettiği gösterilmiştir (Mirzoeva ve Calder 1996).

CAPE uygulanması sonucu oksidatif hasarın azaldığı çalışmalarda gösterilmiştir. Antrasilin ile uyarılmış nöronal oksidan hasara karşı koruyucu etkisinin yanı sıra (Fadillioglu ve ark 2003), doksorubisin ve bir antikanser ilacı olan antrasilin ile miyokardial dokuda oluşturulmuş oksidatif hasara karşı koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (Fadillioglu ve ark 2003).

Bir çalışmada 10 mikromol konsantrasyonda ksantin-ksantin oksidaz sistemi ve insan nötrofil hücrelerinde serbest radikal üretimini tamamiyle inhibe ettiği bildirilmiştir (Yagmurca ve ark 2004). Yapılan başka bir çalışmada poliansature yağ asitlerinin oksidasyonuna sekonder olarak oluşan, başlıca zincir reaksiyonlarının yıkım ürünü olup, dokulardaki oksidatif stres ve lipit peroksidasyonunun güvenilir bir belirteci olan MDA düzeyini anlamlı ölçüde düşürdüğü gösterilmiştir (Yilmaz ve ark 2004).

CAPE'nin yararlı etkilerinin açıklanmasının altında yatan moleküler mekanizmalar, NF-κB inhibisyonu (Akyol ve ark 2012), hasarlı dokuda glikoliz ve pentoz fosfat yollarının devamlılığını sağlarken nükleik asit sentezini artırarak hasarın azaltılması (Uz ve ark 2002), COX-2 ekspresyonunun ve/veya inhibisyonu (Michaluart ve ark 1999) lipoksijenaz yolağının baskılanması (Mirzoeva ve Calder 1996) ve TREK-1 potasyum kanallarının aktive edilmesi (Danthi ve ark 2004) dir. CAPE normal hücrelerde zararlı etki göstermez (Ilhan ve ark 1999).

Nükleer faktör kapa - B (NF-κB), rel mutajen ailesine bağlı bir transkripsiyon faktörüdür ve immünite ve inflamasyon döngüsünde rol oynayan pek çok geni aktive etmektedir. NF-κB'nin regülasyonunda bozulma; toksik şok, kanser ve akut enflamatuvar hastalıklar gibi birçok patolojide rol oynar. Ayrıca apopitozis'de önemli bir ajandır (Akyol ve ark 2012).

NF-κB proteinleri sitoplazmada inaktif olarak bulunmaktadır. Aktivasyon bakteriyel yapı taşları, oksidatif stres ve protein sentez inhibitörleri ile olmaktadır. ROS, NF-κB için ikincil haberci rolü oynamaktadır (Ozen ve ark 2004). CAPE nükleer transkripsiyon faktörü olan NF-κB'yi ve oksijen radikallerini bloke ederek başta TNF-α olmak üzere birçok enflamatuvar ajanları inhibe etmektedir (Akyol ve ark 2012).

Yapılan literatür taramalarında CAPE'nin egzersiz üzerine etkisi ile ilgili sınırlı miktarda bilgiye rastlanmıştır. Bir çalışmada eksantrik egzersiz ile oluşturulmuş kas hasarı modelinde lipit peroksidasyonu sonucu oluşan MDA düzeyinde bir iyileşme ile beraber NF-κB bağımlı enflamatuar yanıtın oluşumunu bloke ettiği gösterilmiştir (Shen ve ark 2013). Hipertermal stres oluşturulan atletlerde CAPE'nin etkisini araştıran başka bir çalışmada ise CAPE'nin hipertermal stresi iyileştirerek süperoksit gibi serbest radikallerin oluşumunu engellediği gösterilmiştir (Chen ve ark 2009).

1.2. Egzersizde Oksidatif Stres

Kas kontraksiyonu esnasında oluşan ROS'un egzersize adapte olmada etkili olduğu bilinmektedir (Ji 1995).

Yoğun ve şiddetli egzersizler esnasında, iskelet kas hücrelerinde oksijen akışı ve kullanımı önemli şekilde artmaktadır. Buna karşılık ATP'nin tüketiminin üretiminden daha fazla olması sebebiyle hücrelerde oluşan bu metabolik stres serbest radikal oluşumunu artırır. Normal koşullarda, serbest radikallerin yavaş bir hızla üretilmesi antioksidan enzimlerin ekspresyonunu ve antioksidan savunmayı artıran sinyaller gibi rol oynadıkları için antioksidan sistemin gelişmesine izin verirken, serbest radikallerin aşırı üretimi ile hücresel savunma sisteminin kapasitesi aşılır buna bağlı hücre canlılığı biter ve hücrede nekroz meydana gelebilir. Sonuç olarak yoğun egzersiz ile kas hasarı ve inflamasyon durumu ortaya çıkar (Powers ve Jackson 2008). İskelet kasında düşük düzeylerde H_2O_2, sarkoplazmik retikulumdan Ca^{+2} salınımını arttırarak güç üretimini arttırmaktayken, yüksek yoğunluklardaki H_2O_2 kasılma kuvvetinde ciddi bir azalma oluşturmaktadır (Hoene ve ark 2010).

ROS, ya direk yoldan hedef proteine etki eder ya da hücrenin redoks durumunu değiştirir. Bunun sonucu olarak gen ekspresyonunu düzenler ve redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerini etkileyerek antioksidan genleri aktif hale getirir. Bu moleküller egzersiz de kas adaptasyonunda rol oynarlar (Fischer ve ark 2004).

Oksidatif stres VO_2max'ın % 50' sine kadar olan egzersiz seviyelerinde oluşmayabilir. Bunun nedeni başlangıç olarak antioksidan kapasitenin aşılmamış olması, serbest radikallerin daha radikal hasarı ortaya çıkaracak kadar güçlü bir yoğunluğa ulaşmamasıdır (Finaud ve ark 2006).

Orta şiddetteki egzersizler antioksidan enzimlerin ekspresyonunu arttırırlar. Bu nedenle egzersiz bir antioksidan olarak değerlendirilebilirken, şiddetli egzersizler ile serbest radikal oluşumu sonucu hücre hasarı ortaya çıkacağından bu durumda antioksidan eklemesi ile serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunma sağlanabilir (Gomez-Cabrera ve ark 2008b).

Sportif aktivite esnasında splanknik bölge ve diğer organlardan kanın aktif iskelet kasına tekrardan yayılımı geçici bir süre hipoksik bir durum oluşturabilir. Sportif yüklenme sonlandığında oksijenlenmiş kanın bu bölgelere geri dönüşü ile reoksijenasyon yoluyla iskemi-reperfüzyon fazında ROS oluşabilir (Güzel-Atalay 2001).

Egzersiz esnasında ROS üretiminde ilk artış fagositik solunum patlaması yoluyla ilave sekonder prooksidan üretimine, kalsiyum homeostazında azalmaya ve demir bağalayan proteinlerin haraplanmasına yol açar. Oksihemoglobinin methemoglobine otooksidasyonu süperoksit üretimi ile sonuçlanır ve methemoglobin oluşum oranı da egzersiz ile artabilir (Popovic ve ark 2012).

Sportif aktiviteler süresince ROS doku hasarı, kas hasarı ve termal ısı nedenli olusabilir. Spor bilimcileri, sportif aktivite esnasında ROS üretimini mitokondrial elektron transfer zinciri, ksantin oksidaz sistemi, metal katalizörlü reaksiyonlar ve aktive olmuş nötrofiller gibi etkenlere de bağlamaktadırlar (Peake ve Suzuki 2004).

Akut yoğun egzersizlerde uzun dönem kronik egzersizler gibi aynı yanıt ortaya çıkarmaz. Düzenli fiziksel aktivitenin oksidatif stresi azaltmasına rağmen yoğun akut fiziksel egzersiz oksidatif strese yol açtığı ve sonrasında hem hücresel proteinlere, lipidlere ve nükleik asitlere zarar verdiği bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada antrene edilmemiş sıçanlarda akut egzersiz esnasında kalpteki SOD aktivitesinde bir azalma bulmuşlardır (Gul ve ark 2006).

Fiziksel egzersiz vücutta oksidatif stresi ROS yoluyla özelliklede süperoksit anyonu ile ortaya çıkarır. Oksijen tüketimi ile egzersiz performansını sınırlandıran ROS üretiminde bir artış oluşur. Bu nedenle antioksidan enzim fonksiyonlarının aerobik fiziksel performansı düzenleyen bir faktör olduğu rapor edilmiştir (Ookawara ve ark 2003).

Buna ek olarak egzersiz esnasında kan sıcaklığı ve laktat konsantrasyonunun artması, kan pH ve oksijen parsiyel basıncının azalması gibi tüm bu egzersiz ile ilişkili karışık adaptasyonlar oksidatif stres durumunu da değiştirebilir (Ookawara ve ark 2003).

Yüksek miktardaki serbest radikalin hücresel bileşenlerde hasar oluşturduğu, düşük miktardaki oksidanların ise hücrede gen kopyalanmasının kontrolü, protein sentezi, hücre haberleşme yollarının ve iskelet kaslarında güç oluşumunun düzenlenmesinde önemli rol oynadığı kabul edilmektedir (Powers ve Jackson 2008). Bu nedenle ROS'nin her zaman zararlı olmadığı; düşük miktarlardaki üretiminin hücre elemanları üzerine yararlı etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Pedersen ve Febbraio 2008).

Uzun süreli yapılan egzersizler kronik egzersiz sınıflandırmasına girmektedir. Bu tür egzersizler serbest radikal hasar etkilerine karşı korunmayı arttırarak organizmaya yüksek bir direnç sağlar. Ortaya çıkan bu durum egzersizin neden olduğu adaptasyonların bir sonucudur (Radák ve ark 2000).Yüksek yoğunluklu ve dinamik egzersizler sonucu endotel hipoksisi, mitokondriyal elektron transfer zincirinden elektron sızıntısı nedeni ile süperoksit radikalleri oluşur (Lamprecht ve ark 2004).

Düzenli yapılan fiziksel aktivitenin sağlık üzerine birçok yararlı etkisi olduğu bilinmekteyken, akut aerobik ve anaerobik egzersiz esnasında serbest radikal üretiminin arttığı, oksidan - antioksidan arasında bir dengesizliğe yol açarak oksidatif stres oluşturduğu, dolayısıyla hücresel hasar meydana getirdiği rapor edilmiştir (Bloomer ve Goldfarb 2004).

Düzenli egzersiz sayesinde akut egzersize bağlı oluşacak oksidatif stresi azaltmak için adaptasyonlar sağlanabilir. Antrenmana yanıt olarak antioksidan enzim aktivitesinin artması ile ROS ve RNS ye karşı, sistemi koruma ihtiyacı kolaylaştırılmış olur. Çok hafif yapılan egzersizler adaptasyon sağlamada başarılı değillerdir, çünkü oluşan ROS ve RNS antioksidan savunma sistemi tarafından elimine edilirler. Gerekli şiddet ve sürede tekrarlanarak yapılan egzersizlerin birikmiş etkileri sonucunda adaptasyon gerçekleşir (Bloomer ve Goldfarb 2004).

Genelde vücut fizyolojik şartlarda ve düşük yoğunluklu egzersizler esnasında ROS üretimi ile başa çıkabilmek için yeterli antioksidan rezervine sahiptir. Fakat uzamış ağır fiziksel egzersiz süresince ROS'un aşırı üretilmesine bağlı olarak oksidanlar ve antioksidanlar arasında bir dengesizlik oluşur ve bu denge oksidan tarafa kaydığında ise redoks haberleşmesinde ve kontrolünde moleküler hasar ortaya çıkar. Egzersizler sırasında O_2 tüketiminin artması serbest radikal üretiminde artışa yol açar (Urso ve Clarkson 2003).

Bitkinliğe kadar yapılan yüklenmeler kas hasarına yol açarken aynı zamanda oksidatif stres meydana getirir. Bazı araştırmacılar egzersiz ile oluşturulmuş oksidatif stresin, yüklenme bitkinliğe kadar sürdürülürse ya da laktik asit miktarı aşırı artış gösterirse meydana geleceğini desteklemektedirler (Mastaloudis ve ark 2001).

Kronik egzersiz sonucunda iki durum ortaya çıkar; egzersiz ile beraber oksidan maddelerin oluşumu ile oksidan - antioksidan denge bozulur ya da egzersiz ile oluşan oksidatif stresin zararlı etkilerinin asgariye indirilmesi için antioksidan enzimler etkili hale getirilir (Ji 1995).

ROS, serbest radikal oluşumunun bazı toksik sonuçlarına karşı korunmayı sağlayan sinyal aktarım yollarını aktivite eder. Aslında egzersiz idmanlarının öncelikli olarak kas hücrelerinde oksidatif strese adaptif bir yanıt oluşturabileceği de bildirilmiştir (Lima ve ark 2013). Bu nedenle sıçanlarda, 8 haftalık aerobik tredmil antrenmanı sonrası indirgenmiş/okside GSH oranlarında (GSH/GSG) ve 10 haftalık koşu antrenmanı sonrası SOD ve CAT karaciğer enzim aktivitelerinde artış olduğu bildirilmiştir (Botezelli ve ark 2011).

Egzersizin sonucu olarak oksidatif stres ve antioksidan savunma sistemi arasındaki ilişkileri inceleyen çalışmalar genellikle aerobik egzersiz çeşidi üzerinde odaklanmıştır. Çelişen sonuçlara rağmen aerobik egzersizin antioksidan savunma sistemini güçlendirerek, oksidatif strese bağlı doku hasarını engellediği bildirilmiştir. Anaerobik egzersiz modeli kullanılan bazı çalışmaların sonucunda ise oksidatif stres ile hücresel hasar oluştuğu gösterilmiştir (Inal ve ark 2001). Anaerobik egzersiz esnasında ya da sonrasında daha az oksijen ihtiyacı olmasına rağmen artan oksidatif stresin nedeni; ksantin ve NADPH oksidaz üretimi, prostanoid metabolizması,

iskemi/reperfüzyon, fagositik solunumsal patlama aktivitesi, demir içeren proteinlerin bozulması ve kalsiyum homeostazındaki değişim gösterilmiştir (Bloomer ve Goldfarb 2004).

Organizmanın egzersiz sonucu serbest radikal hasarını azaltan antioksidan savunmanın egzersize yanıtı, hareketsiz ve antrenmanlı kişilerde farklılık göstermektedir. Egzersizin tipi, siddeti, süresi ve bireyin fizyolojik kapasitesi bu farklılıkları oluşturmaktadır (Inal ve ark 2001). Oksijen tüketim oranının artması egzersiz sırasında meydana gelen en belirgin biyolojik değişimdir (Radák 2000).

Şiddetli fiziksel egzersiz nedeniyle ROS üretimindeki artış, oksidatif hasarla sonuçlanabilmektedir. Egzersiz ile ROS ve RNS oluşumu sonucu oksidatif hasar meydana geldiği, yapılan antrenmanlar sonucunda ROS'un neden olduğu lipid peroksidasyonuna karşı direncin artırıldığı ve DNA hasarının önlendiği bildirilmiştir (Bloomer ve Goldfarb 2004).

Egzersiz ile oluşturulan oksidatif stres ile ilgili ilk çalışma 1978 de yapılmıştır. Bu çalışmada 60 dakika dayanıklılık egzersizinde $VO_{2\ max}$'ın % 60 ında lipit peroksidasyon belirteci olan ve günümüzde geçerliliğini yitirmiş pentan' ın arttığını, antioksidan E vitamini desteği ile dinlenme ve egzersiz uyarımlı pentan oluşumunu azalttığını ortaya çıkardı (Dillard ve ark 1978).

Kas aktivasyonundaki yükselmeyle beraber enerjinin üretimi ve tüketimi, dinlenme durumuna göre artarken, aktive olan kasta kan akımı ve O_2 kullanımı da önemli derecede yükselmektedir. Yoğunluğu giderek artan egzersizlerde kullanılan O_2 yapılan egzersizin türüne ve şiddetine bağlı olarak doğrusal bir şekilde belli bir düzeye kadar artar (Sen ve ark 2000). Egzersiz esnasında O_2 kullanımının artması serbest radikal üretiminde de bir artışa yol açar. Egzersiz esnasında O_2 tüketimi kişinin performansına ve egzersizin yoğunluğuna bağlı olarak 8-16 kat kadar artar. Ortaya çıkan doku hasarı, NADPH oksidaz'a bağlı olarak serbest radikal üretimi ile nötrofil gibi inflamatuar hücrelerin aktivasyonuna neden olabilir (Deaton ve Marlin 2003).

Birçok hücre egzersiz esnasında ROS üretir. Fakat günümüze kadar birkaç çalışma, öncelikli olarak organların, birçok dokuya kısıtlı ulaşım nedeniyle insanlarda ROS üretiminden sorumlu oldukları araştırmıştır (Powers ve Jackson

2008). Aktive olan iskelet kaslarının ROS ürettiğinin bulunmasından beri (Davies ve ark 1982) birçok araştırmacı iskelet kasları egzersiz esnasında ROS üretimi ve serbest radikal oluşumundan sorumlu olduğunu savunuyordu. Bununla beraber kalp, akciğer ve kan gibi diğer dokuların da egzersiz esnasında total vücut ROS üretimine katkı sağladığı ortaya konmuştur. Örnek olarak fagositik beyaz hücreler egzersize bağlı kas hasarından sonra kas oksidatif stres durumunun değişiminde major rol alabilirler. Aslında kas fibrillerindeki önemli hasar, makrofajlar ve diğer fagositik hücrelerin hasarlanmış bölgeye taşınımı eşlik eder ve bu süreç etkili kas onarımı için esansiyel olmasına rağmen fagositik hücrelerden önemli miktarda ROS salınımına da yol açar (Malech ve Gallin 1987).

1.3. İskelet Kaslarının Egzersize Adaptasyonu

Egzersizin kas fenotipi ve protein sentezinde değişikliklere yol açan sinyalleşme yanıtlarını iskelet kaslarında geliştirdiği bilinmektedir. Örnek olarak 5 günden daha az dayanıklılık egzersizi (maksimal oksijen alımının % 60 günde 60 dakika) iskelet kaslarındaki hem mitokondriyal hem de antioksidan enzim miktarlarını artırmaktadır. Gerçekte ROS aktive olan kaslarda oluşturulur. Buna bağlı redoks duyarlı birçok sinyalleşme yolu ROS üretiminin, iskelet kaslarının aerobik egzersize adaptasyonunda esansiyel bir rol aldığı çalışmalarda gösterilmiştir (Vincent ve ark 2000).

Yapılan ilk çalışmalarda (Davies ve ark 1982) ROS üretiminin egzersiz programlarında iskelet kaslarının egzersize adapte olabilmesi için bir uyarıcı niteliği taşıdığı bildirilmiştir. Bu ilk öneri doğrultusunda yapılan bir çalışmada in vitro kültür miyotüplerinin H_2O_2 gibi oksidanlara maruz bırakılması sonucu sayısız gen ekspesyonunun oluştuğu gözlenmiş böylelikle ROS'un kültür kas hücrelerinde gen ekspresyonunu değiştirdiği rapor edilmiştir (Irrcher ve ark 2009).

Başka bir çalışmada antioksidan eklenmesinin sonucunda, insan iskelet kaslarında önemli antrenmana adaptasyonların gecikebileceğini rapor etmiştir. Kasta, vitamin C tedavisinin de egzersiz ile indüklenmiş birçok antioksidan enzimin ekspresyonunu engellediğini gösterilmiştir. Bununla birlikte bu bulgular ROS üretiminin egzersiz uyarımlı iskelet kas adaptasyonunda esansiyel bir rol aldığı sonucunu desteklemektedir (Gomez-Cabrera ve ark 2008a).

1.4. İskelet Kas Fizyolojisinde Reaktif Oksijen Türleri'nin Rolü

Oksidatif düzenlemede ve oksidatif streste iskelet kasları yeterli kasılmanın sağlanması için büyük miktarlarda enerji tedarikine gereksinimi olmasından dolayı hedef organdır ve sonuç olarak aşırı mitokondriyal ROS'a maruz kalma eğilimi vardır. ROS düzeyi kas antioksidan kapasitesi sınırını aştığında oksidatif stres meydana gelir. Bu nedenle uzun dönem ağır egzersizlerin hem hayvanları hemde insanları oksidatif hasara daha dirençli duruma getirmesi yoluyla ve antioksidan savunma mekanizmalarını artırdığından dolayı akut yada kronik egzersizin redoks homeostazının korunmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir (Alfadda ve Sallam 2012).

Daha önce yapılan çalışmalarda çelişkiler de vardır. Bazı çalışmalar egzersiz endojen enzimatik anitoksidan savunmayı geliştirebileceğini gösterirken (Miyazaki ve ark 2001) tam tersine bazı çalışmalar dayanıklılık egzersizinden sonra akut egzersiz oksidatif stres belirteçlerini artırdığını göstermiştir (Clarkson ve Thompson 2000).

1.5. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

Oksidatif stres, hücrelerde ya da dokularda fizyolojik dengenin değiştiği, organizmanın doğuştan kazandığı çok hassas bir savunma donanımı olan antioksidan düzeyin, fizyolojik aktivitenin doğal ürünü serbest radikal düzeyine göre serbest radikal lehinde artış gösterdiği bir dengesizlik durumu olarak tanımlanmaktadır (Selmeci ve ark 2005).

Oksidasyona yol açan moleküller dengeyi bozmadıkları sürece, organizmanın enfeksiyöz ajanlarla ve patojenlerle savunmasında anahtar rol oynarlar. Eğer oksidan maddeler homeostazın üzerinde üretilir ve antioksidanlar savunmada yetersiz kalırlarsa, organizmanın yapısal bütünlüğünü oluşturan lipit, protein, karbohidrat, nükleik asit ve yararlı enzimlere hasar vererek zararlı etkilere yol açabilirler. Serbest radikallerin özellikle DNA üzerinde yaptıkları hasarlar önemlidir (Tamer ve ark 2000).

Serbest radikaller ve oksijenin radikal olmayan türevleri birlikte ROS olarak adlandırılır. ROS ve reaktif nitrojen türleri (RNT), bütün aerobik organizmalar tarafından metabolik süreçlerin sonucu olarak üretilen serbest radikal ürünleridir (Halliwell ve Gutteridge 1999).

ROS ve oksijen içermeyen radikaller çoğunlukla stabil olmayıp çok reaktiftirler. Yaklaşık % 1-3 oksijen, vücut tarafından ROS'a dönüştürülür. Üç önemli ROS, süperoksit radikali, H_2O_2 ve hidroksil radikali büyüyen hücrelerde mitokondri tarafından sürekli üretilen normal metabolik ürünlerdir (Seifried ve ark 2007).

Yapısı steroid olan çok sayıdaki bileşiğin ve eikozanoidler gibi biyolojik aktif moleküllerin sentezi, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, çok sayıdaki oksidaz ve hidroksilaz enzimlerin etkileri ve sitotoksik etkilere sahip hücrelerin fonksiyonları için mutlaka ROS gereklidir (Fang ve ark 2002).

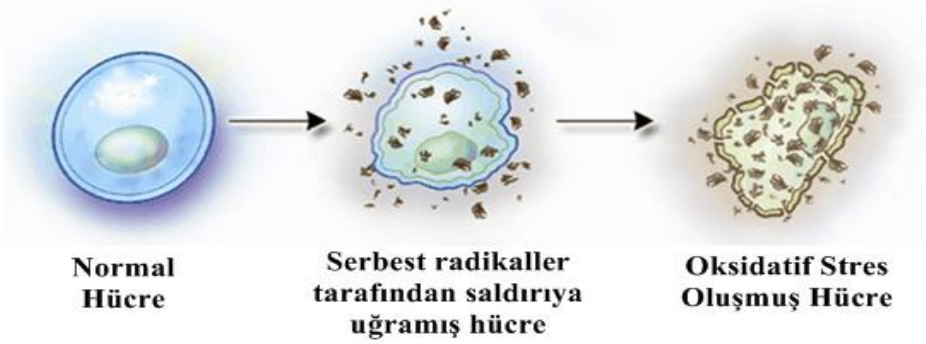
Radikallerin reaktivitesi duruma göre değişken olsa da radikaller radikal olmayan yapılara göre daha az kararlıdır. Radikallerin bir kez oluşması, diğer radikallerle ve başka moleküllerle reaksiyona girebileceği anlamına gelir. Bu reaksiyonların hızı ve seçiciliği, radikal düzeyine ve moleküldeki zayıf bağların olup olmadığına bağlıdır (Gümüş 2007).

Serbest radikaller hayatın kökeninde ve biyolojik evrimde önemli bir rol alan ve organizma üzerine yararlı etkileri gösterilmiş maddelerdir. Bu radikaller her zaman tehlikeli kimyasal türler olarak değerlendirilmemelidir. Serbest radikallerin kontrollü üretimiyle yaşam için gerekli bir takım döngülerin gerçekleşmesi sağlanır. Mesela oksijen radikalleri, hücrenin bir cins sinyal veya uyarıyı başka bir sinyale dönüştürme sürecinde, gen kopyalanmasında ve çözülebilir guanilat siklaz aktivasyonunun düzenlenmesinde kritik rolleri vardır. Bunun yanında NO, en yaygın sinyalleşme molekülüdür ve vücutta nerdeyse tüm hücresel ve organ fonksiyonları içerisinde yer alır. Fizyolojik düzeyi endotelyal hücreler tatarfından üretilen NO, vasküler düz kas hücrelerinin, lökosit adezyonunun, platelet agregasyonunun, anjiojenesizin, trombozisin, vasküler tonusun ve hemodinaminin relaksasyonu ve proliferasyonunun düzenlenmesi için gereklidir. Buna ek olarak nöronlar tarafından üretilen NO bir nörotransmitter olarak karşımıza çıkar ve aktive makrofajlar ile üretilen NO da immün yanıtın oluşmasında önemli bir mediatördür (Fang ve ark 2002).

Sonuç olarak biyoloji de serbest radikallerin fizyolojik seviyelerde sinyalleşme ve düzenleme gibi iki pozitif yönü karşımıza çıkmaktadır. Bu durum

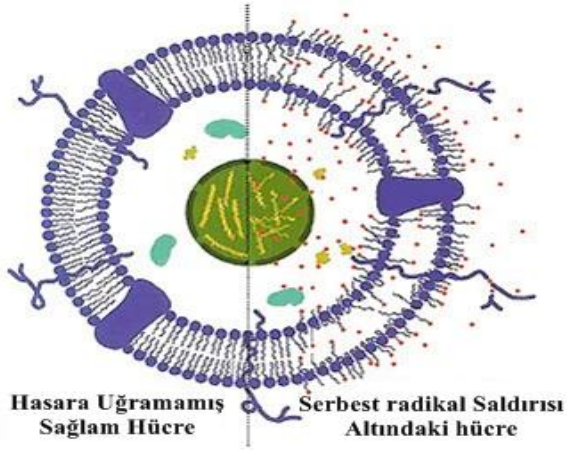
patolojik düzeye geldiğinde ise hücreye ve diğer moleküllere oldukça zarar verici bir hal almaktadır (Fang ve ark 2002).

Bir moleküle saldırdığında onun elektronunu alarak onu okside eder ve artık bu yeni molekül yeni bir serbest radikal haline gelir. Başlangıcı bu şekilde olan bir zincir reaksiyonlar dizisi sonucunda ise canlı hücre zarar görür (Demir 2008).



Şekil 1. Oksidatif Stres Oluşum Süreci (Demir 2008)

Serbest radikaller hücrenin tüm fraksiyonlarında oluşabilir. Serbest radikaller en büyük zararı hücre zarlarına verir. Hücre zarını okside ederek hücre zarı ve sonuç olarak hücre yapısını bozar (Demir 2008).



Şekil 2. Serbest radikal saldırısı (Demir 2008)

Serbest radikaller dış yörüngesinde bir yada daha fazla eşlenmemiş elektron bulunduran moleküller ya da moleküler parçacıklardır. Bu nedenle diğer

moleküllerle aktif bir şekilde kimyasal reaksiyona giren oldukça kararsız, yarılanma ömrü kısa, molekül ağırlığı düşük ve çok aktif moleküllerdir. Serbest radikaller radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron ayrılmasıyla veya radikal olmayan bir atom veya moleküle bir elektron ilavesiyle oluşurlar (Flora 2009).

Üç elementten oluşurlar bunlar; oksijen, nitrojen ve sülfür'dür. Bu yüzden ROS, RNS ve reaktif sülfür türleri (RST) olarak tanımlanır. ROS, süperoksit anyonu (O_2^-),hidroperoksil radikali, hidroksil radikali (OH^-), NO ve diğer türlerden H_2O_2, singlet oksijen (O_2^-), hipoklorik asit ve peroksinitrit (ONOO-) gibi serbest radikalleri kapsar. RNS süperoksit anyonu reaksiyonu ile NO dan oluşur, ve $ONOO^-$ şeklinde tanımlanır. RST ise T-SH ile ROS'un reaksiyonu ile kolay bir şekilde oluşur (Lu ve ark 2010).

Hücresel koşullarda da ciddi miktarlarda radikaller üretilmektedir. Radikaller başlıca üç temel mekanizma ile oluşmaktadır (Urso ve Clarkson 2003). Kovalent bağ ile bağlanmış normal bir molekülün, parçalarındaki ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi ile normal molekülden tek bir elektronun kaybı, bir molekülün heterolitik bölünmesi veya normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar (Kılınç ve Kılınç 2002).

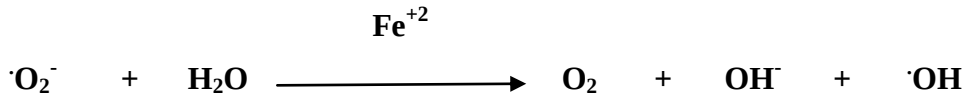
1.6. Serbest Radikallerin Vücuttaki Üretimi

Serbest radikal üretiminde hücre içi sebepler, ksantin oksidaz, peroksizomlar, inflamasyon süreçleri fagositoz, araşidonik asit yolu, iskemi ve fiziksel egzersiz gibi metabolizmanın normal bir süreci gibi mitokondride üretilir (Kehrer 1993, Lobo ve ark 2010).

Fosfolipaz A2 enziminin membran fosfolipitlerini araşidonik asit salınımı için parçalaması (Powers ve Jackson 2008), mitokondriyal elektron transport zinciri esnasındaki sızıntı ile (Alfadda ve Sallam 2012, Freeman ve Crapo 1982), endoplazmik retikulumda özellikle ksenobiyotiklerin metabolizmaları ve diğer endojen maddelerin metabolizmaları esnasında ara ürün olarak, katekolaminler gibi küçük moleküllerin otooksidasyonu esnasında (Akyol 2004), geçiş metallerinin oksido-redüksiyon tepkimeleri sonucunda (Halliwell ve Gutteridge 1990), endoplazmik retikulum ve çekirdek membranında sitokromlar okside olduğunda (Freeman ve Crapo 1982), ksantin oksidaz gibi çoğu enzimin katalitik döngüsü

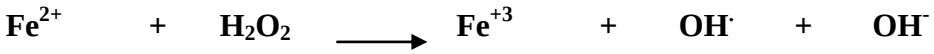
esnasında (Freeman ve Crapo 1982) ve makrofaj, nötrofil ve eozinofillerin fagositoz esnasında (Deaton ve Marlin 2003, Akyol 2004) serbest radikaller üretilirler.

Süperoksit anyonu ile H_2O, Fe^{+2} katalizörlüğünde reaksiyona girdiğinde zararlı hidroksil ($^{\cdot}OH$) radikallerini oluşturan "Haber-Weiss reaksiyonu" meydana gelmektedir (Duthie ve ark 1989).



Şekil 3. Haber-Weiss reaksiyonu (Duthie ve ark 1989)

Eğer H_2O_2 bir demir katalizti Fe^{+2} reaksiyona girerse Fenton raksiyonu meydana gelir ve hidroksil radikali oluşur (Flora 2009).



Şekil 4. Fenton Reaksiyonu (Flora 2009)

Serbest radikal oluşumuna artmasına yardım eden dış sebepler ise; sigara, çevresel kirlilik, radyasyon, ilaçlar, pestisidler, endüstriyel çözücüler ve ozondur. Oksijen gibi hayat için esansiyel olan bu unsurlar, reaktif türler yoluyla insan vücudunda hasarlara yol açarlar (Lobo ve ark 2010). Bu tip maddeler; toksinin kendisinin bir serbest radikal olduğu, toksinin bir serbest radikale metabolize olabildiği, toksinin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelebildiği ve toksinin antioksidan aktiviteyi düşürebildiği şeklinde gruplanırlar (Kehrer 1993).

Hücreler birbirleriyle iletişim kurarlar ve sinyal aktarımı yada hücre sinyalleşmesi olarak ta adlandırılan biyolojik mekanizmalar vasıtasıyla hüre dışı uyarılara yanıt oluştururlar. Sinyal aktarımı bir hücrenin dışından hücre içerisindeki farklı unsurlara fonksiyonel bilginin aktarılmasına fırsat sağlayan bir süreçtir. Sinyal aktarımı hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinler ve nörotransmitterler gibi hücredışı

sinyalleri tarafından tetiklenir. Bu sinyal aktarım süreçleri kas kontraksiyonu, gen ekspresyonu, hücre büyümesi ve sinir iletimi gibi birçok arklı biyolojik aktiviteyi uyarır. ROS baskın bir şekilde hücre hasarına neden olan duruma karışırsa, hücre içi haberleşmede ve düzenlemede birçok farklı yönden major fizyolojik rol oynar. Hücreler, endojen ve temel yolla hücre büyümesi ve farklılaşmasını da kapsayan sinyal aktarım yollarının bakımı ve indüklenmesinde kullanılan ROS'u oluşturabilme kapasitesine sahip olduğu da bilinmektedir (Valko ve ark 2007).

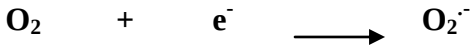
Birçok hücre tipinin sitokinler, büyüme faktörleri ve hormonlar tarafından uyarıldıklarında düşük kosantrasyonlarda ROS üretimi ile küçük bir oksidatif patlamayı ortaya çıkardığı gösterilmiştir. Bu, birçok sinyal aktarım yolunun düzenli yada başlamış fonksiyonları sinyal aktarım kaskadında farklı düzeylerde etki eden sinyalleşme molekülü olan ROS aksiyonuna dayandığı varsayımına yol açar. Bu nedenle ROS ikincil haberleşmede çok önemli bir rol alabilir. Büyük olasılıkla sinyalleşme yollarında metallerin ve ROS'un en önemli etkisinin mitojen ile aktive olan proetin kinaz (MAPK) üzerine olduğu tahmin edilmektedir (Valko ve ark 2007).

1.7. Reaktif Oksijen Türleri

Oksijenin indirgenmesi tepkimeleri ile ROS oluşmaktadır. Biyolojik sistemlerde hücreler, moleküler oksijenin (O_2) suya indirgendiği reaksiyonlar zinciri ile ATP oluşturmak üzere aerobik olarak enerji üretirler. Sitokrom c oksidazın katalizlediği reaksiyonlar oksijene dört elektronun transferini içerir. Oksijenin bu mitokondriyal düzeyde tüketilmesi, oksijen ara ürünlerinin üretilmesi ile ilişkilidir. Bu yolla moleküler oksijenin % 98'i suya indirgenirken, % 1-2'sinden ROS oluşmaktadır (Selmeci ve ark 2005).

ROS'un serbest radikal olma durumları değişebilir. Örneğin; süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$) bir serbest radikal iken; süperoksit radikalinden spontan olarak ya da SOD enziminin katalizi ile oluşan H_2O_2 radikal olmayan ROS'dir (Selmeci ve ark 2005).

Hemen hemen bütün aerobik hücrelerde oksidatif fosforilasyonun ana bileşeni olan moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu kararsız bir yapı olan süperoksit radikali oluşur (Selmeci ve ark 2005).



Şekil 5. Moleküler Oksijnden süperoksit oluşumu

Süperoksit redikalleri, demir-sülfür merkezli farklı mitokondriyal enzimlere atak yaparak serbest demir katyonlarının salınımına neden olduklarından mitokondriye hasar verirler. Bu demir katyonları daha sonra Haber-Weiss reaksiyonu içerisinde hidrojen preoksitten hidroksil radikali oluşumuna katılırlar (Buonocore ve ark 2010).

Fagositoz yapan lökositler aktivitesi esnasında yüksek miktarda süperoksit üreterek bulundukları ortama ve fagozom içine verirler. Bu şekildeki radikal yapımı antibakteriyel etki için gereklidir ve daha reaktif türlerin ortaya çıkmasını da sağlamaktadır. Görüldüğü üzere radikal yapımı bu türdeki bazı hücresel fonksiyonlar için gerekli olabilir (Leeuwenburgh ve Heinecke 2001).

Serbest radikal olmasına rağmen çok yüksek reaktifliği yoktur. Kendiliğinden, özellikle iç mitokondri zarında solunum zinciriyle birlikte oluşur. Süperoksit ayrıca iskemi-reperfüsyonda aktive olan ksantin oksidaz gibi flavoenzimlerce endojen olarak da oluşturulur. Lipooksijenaz ve COX ise diğer süperoksit oluşturan enzimlerdir (Leeuwenburgh ve Heinecke 2001) .

Süperoksit radikali kolaylıkla hasara neden olmaz. Çünkü SOD enzimi süperoksit radikalini hızlı bir şekilde H_2O_2'e çevirir. Süperoksit radikallerinin asıl zararları H_2O_2 kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmalarıdır (Leeuwenburgh ve Heinecke 2001).



Şekil 6. Hidrojen Peroksit oluşumu

Asidik ortamda moleküler oksijenin ortamdan iki elektron (Şekil 7) veya süperoksitin bir elektron alması sonucu H_2O_2 meydana gelir (Şekil 8).



Şekil 7. Hidrojen peroksit oluşumu



Şekil 8. Hidrojen peroksit oluşumu

Hidrojen peroksit (H_2O_2), serbest bir radikal olmadığı halde, ROS grubuna girer ve serbest radikaller içerisinde önemli bir rol oynar. Çünkü Fe ve Cu gibi geçiş metalleri varlığında süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve en zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir (Malo ve Wilson 2000). H_2O_2' in hücreye zararı, öncelikle fenton reaksiyonları gibi metal katalizli reaksiyonlar yolu ile hidroksil radikali oluşturma yeteneği ile ortaya çıkar. Belirtilen potansiyel oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2'nin derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan CAT ve peroksidaz enzimleri yerine getirirler (Powers ve Jackson 2008).

Hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$), Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu H_2O_2'ten oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşur. Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldir ve tüm biyolojik moleküllerle reaksiyona girebilir. Hücre içine diffüzyon hızı kontrollüdür. Yarılanma ömrü çok kısadır ama yaptığı hasar büyüktür. Hidroksil radikali olasılıkla ROS' un en güçlüsüdür. Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$), su dahil ortamda rastladığı her biyomolekülle diffüzyon limiti hızı ile tepkimeye girer. Bu nedenle 10^{-9} saniyeden daha kısa bir ömre sahiptir (Valko ve ark 2007).

Proteinler üzerinde oluşan oksidasyonlar yapı değişimine neden olacağından proteinleri proteolitik yıkıma götürür. Hücre zarı su içermediğinden hidroksil radikalinin ($OH^{\bullet}$) başlıca hedefi yağ asitleridir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini arttırıp hücre ölümüne neden olabilir. Bütün bu etkiler ne kadar hidroksil radikali üretildiğine bağlıdır ve gerek H_2O_2'den gerekse de organik peroksitlerden (ROOH), hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) yapımı ortamdaki serbest metal iyonları tarafından katalizlenir. Özellikle $OH^{\bullet}$ yapımını katalizlemelerindeki etkileri nedeniyle canlılarda metal iyonları radikal hasarlarından birinci derecede sorumludurlar ve bu etkiye sahip olamadıkları formda esas olarak proteine bağlı tutulmalıdırlar (Gutteridge 1995).

Hidroperoksit radikali ($HO_2^{\bullet}$), süperoksit radikali protonlandığında oluşur. Süperoksit radikaline göre daha güçlüdür. Önemli özelliği biyolojik membranları kolay geçebilmesi ve yağ asitleriyle direkt etkileşime girebilmesidir (Gutteridge 1995).

Nitrik oksit ($NO^{\bullet}$), aynı anda farklı hücre türlerinde sentezlenen, otokrin veya parakrin mediatör fonksiyonu gören, yağda çözünebilen ve biyolojik membranlardan kolaylıkla geçebilen bir radikaldir. Radikal olarak reaktivitesi düşük olan NO, metal içeren merkezler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girer. Özellikle lipid radikallerle tepkimeye girmesi NO'ya antioksidan bir etki kazandırır. Süperoksit ile NO arasındaki tepkime ile oluşan peroksinitrit, hidroksil radikali benzeri aktiviteye sahip olup radikal tepkimelerini başlatmaya ilave olarak biyomoleküllerin nitrasyonuna neden olur. Fizyolojik derişimde üretilen NO, esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata (NO_3^-) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, NO'yu ortamdan temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. Aerobik ortamda NO stabil değildir, derişiminin artması ile oksidasyonu hızlanır. Bu nedenle ortamdaki derişimi ile kendi ömrü arasında ters bir orantı vardır. Özellikle indüklenebilir NOS enziminin uyarılması sırasında NO derişiminin artması ile oksidasyonu da hızlanır ve çeşitli RNT oluşur. Bu reaktif türler NO'nun dolaylı etkilerinden sorumlu olup proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonuna neden olabilirler (Kılınç ve Kılınç 2002).

NO'nun endojen biyolojik bir haberci olarak, hücre haberleşmesi ve redox biyolojisinde rol almaktadır (Fukuto ve ark 2012). NO, birçok hücre tipi tarafından L-Arginin'den sentezlenir. (Powers ve Jackson 2008).

NO, bir azot bir oksijenden oluşan basit, yarı ömrü 3-5 saniye olan bir moleküldür. Bu madde ilk olarak Furchgatt ve Zawadzki tarafından (1980) endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) olarak tanımlanmış, daha sonra bunun Palmer ve ark (1988) tarafından NO olduğu gösterilmiştir.

NO üç izoformda nöronal (nNOS), uyarılabilir (iNOS) ve endotelyal (eNOS) olan ve biyolojik dokularda spesifik NOS ile oluşturulur. Birçok doku bu izoformlardan birini ya da birkaçını oluşturabilir. nNOS ve eNOS temel olarak aktiviteleri, hücre içi kalsiyum konsantrasyonu ile düzenlenir (Valko ve ark 2007).

Hücreler metabolik süreçlerin sonucunda devamlı olarak serbest radikal ve RNS üretirler. Alınan oksijenin % 1-5'i ROS oluşumuna neden olur (Urso ve Clarkson 2003).

Serbest radikallerin hücrede üretimi oldukça fazladır bu nedenle ani ölüm ve yıkımlardan korunmak için hücrede bir koruma sisteminin varlığı gereklidir. Birinci basamak endojen serbest radikal üretiminin azaltılmasıdır; bu basamakta mitokondriden ve hücrelerde kronik enflamasyonla üretilen serbest radikal sızıntısı azaltılır. İkinci basamak metabolik hızın azaltılmasıdır. Üçüncü basamak oksidatif stres hasarında anahtar hedeflerin dirençlerinin artırılmasıdır. Membrandaki doymamış yağ asitleri gibi perokside olabilen yağ asidi moleküllerinin azaltılması ile sağlanır. Dördüncü basamak antioksidanlar tarafından temizlenmek suretiyle serbest radikallere karşı korumanın artırılmasıdır. Bu basamakta savunma antioksidan moleküllerce sağlanır. Antioksidanlar serbest radikalleri katalitik yoldan uzaklaştıran SOD gibi enzimler içerirler. Bu enzimler serbest radikallerle reaksiyona girerek ortamdan uzaklaştırılırlar. Beşinci basamak onarım ve yenilenme sürecidir. Yenilenme süreci hücre bölünmesi, DNA replikasyonu ve birçok genel dokuda bulunur. Bu süreçlerin sonunda hasarlanmış bileşim uzaklaştırılır. Altıncı ve son basamakta hücrenin lipit, protein ve nükleik asit bileşimlerinin onarım süreci yer alır. Nükleik asitler, proteinler ve lipitler için son derece önemli onarım süreçleri bulunur.

Bu onarım süreçleri spesifik bir şekilde oksidatif hasarı tanır ve bu hasarı onarır (Cutler ve ark 2005).

Malondialdehit (MDA), doku hasarının bir göstergesi ve lipid peroksidasyonunun en önemli ürünüdür. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonundan ortaya çıkar. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelligi nedeniyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir (Kalender ve ark 2004). Genellikle lipit peroksidasyon belirteci olarak kullanılır. Çalışmalar egzersizden 4 saat kadar sonra MDA seviyesinin arttığını göstermiştir (Michailidis ve ark 2007).

Aerobik organizmalarda serbest oksijen radikallerinin yaptığı oksidatif strese bağlı hasarları önlemek için enzimatik ve non enzimatik savunma sistemleri vardır. Bu sistemler arasında SOD, CAT, GSH-Px, E vitamini, GSH ve C vitamini en etkin olanlardır (Groot 1994).

Oksidanların proteinler ile etkileşimi sonucu farklı birçok kovalent değişiklikler oluşur. Bu değişikliklerden bazıları serbest radikallerin protein molekülleri üzerine direkt etkileri sonucu oluşabildiği gibi bazıları da oksidasyon yan ürünlerinin proteinlere kovalent olarak bağlanması ile meydana gelir. Proteinlerin radikal aracılı hasarı; elektron kaybı, metal-iyon katalizli reaksiyonlar ve lipit ve şekerlerin oto-oksidasyonu ile başlatılabilmektedir. Bu ürünlerin oluşum hızının artması veya temizleyici mekanizmaların yetersiz kalması, proteinlerde dahil olmak üzere diğer hücresel moleküllerdeki oksidatif modifikasyonların artışına yol açar (Shacter 2000).

Proteinler üç yolla oksidatif olarak modifiye edilirler; spesifik aminoasitlerin oksidatif modifikasyonu, serbest radikal bağımlı peptid parçalanması ve lipid peroksidasyon ürünleri ile reaksiyon yoluyla protein çapraz bağ oluşumudur. Oksidatif yol ile hasarlanmış protein ürünleri hücre zarına ve birçok hücresel fonksiyona zarar verebilecek aşırı reaktif grupları içerir (Lobo ve ark 2010).

Oksidatif hasarın DNA yapısını bozduğu pek çok faktör vardır. İyonize radyasyon, artmış oksijen konsantrasyonu, ksantin oksidaz ve çeşitli kimyasallar aşırı radikal oluşumuna neden olarak direkt hasara yol açarlar. DNA tamir enzimlerinin etkilenerek işlev görememesi de bazı radikallerin etkisi nedeniyledir. Özellikle hidroksil radikalleri DNA yapısındaki pürin, pirimidin bazları ve deoksiriboz omurgası yapısında parçalanma ve yıkım sonuçta DNA nın denatürasyonuna neden olurlar. Oksidatif hasar dal kırıkları, baz çifti değişimleri, yeniden düzenlenme gibi yapısal değişimlere neden olmaktadır (Yıldız ve Cicek 2005).

Tüm biyolojik zarlar çoklu doymamış yağ asitleri ile amfipatik lipitler ve zar proteinlerinin birleşmesinden oluşur. Lipit peroksidasyonu serbest oksijen radikalleri tarafından başlatılan ve zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) oksidasyonunu içeren kimyasal bir otokatalitik zincir reaksiyonu olup, lipit peroksitlerinin aldehit türevleri, hidrokarbon radikalleri ve uçucu bazı ürünlere çevrilmesi şeklinde sonlanır (Tekkes 2006).

Hasar sonucu membranın yapısı ve fonksiyonları büyük ölçüde bozulur. PUFA'da oluşan oksidatif hasar LPO olarak bilinir. Lipid molekülünde iki doymamış bağ arasında bulunan bir metilen grubundan bir hidrojen atomunun çıkarılması ile başlayan kompleks olay LPO'dur. LPO bir kez oluşur sonra hücrede kendi kendine devam eden zincir reaksiyonlar başlar (Karihtala ve Soini 2007). LPO sonucu oluşan lipid peroksil radikalleri ($LOO^{\cdot}$) bir sonraki PUFA'yı okside eder böylece yeni zincirleme tepkimeler başlar (Gilbert ve Colton 1999). Devam eden reaksiyonlar sonucunda hidroperoksitler (LOOH) ve bunların da devam eden parçalanması ile daha şiddetli radikal özelliği olan türlere özellikle de rölatif olarak daha kararlı hal alan MDA'ya dönüşürler (Karihtala ve Soini 2007). Dokuda MDA seviyesinin artması o dokuda ROS'un arttığını gösterir (Sonntag 2006).

1.8. Antioksidan Savunma Sistemleri

Çeşitli mekanizmalar sonucu ortaya çıkan serbest radikallere karşı vücutta doğal bir savunma mekanizması vardır. Serbest radikallere karşı savunma mekanizmasını oluşturan bileşiklere antioksidanlar denir. Biyolojik sistemlerde çok düşük konsantrasyonlarda bile lipit, protein, DNA ve karbonhidrat gibi okside

olabilen substrat ile karşılaştığında substratın oksidasyonunu geciktiren veya önleyen madde olarak tanımlanmaktadır (Frankel ve Meyer 2000).

Antioksidanlar, kendi elektronlarını vererek serbest radikalleri nötralize ederken elektron vermelerine rağmen kendileri serbest radikallere dönüşmezler, çünkü antioksidanlar her iki durumda da kararlı yapıdadırlar (Frankel ve Meyer 2000).

Çok farklı kaynaklar sebebiyle serbest radikallere maruz kalınması sonucu organizmada bazı savunma mekanizmaları gelişir. Serbest radikal uyarımlı oksidatif strese karşı savunma mekanizmaları (i) önleyici mekanizmalar (ii) tamir edici mekanizmalar (iii) fiziksel savunma ve (iv) antioksidan savunmalarından oluşur (Valko ve ark 2007).

Antioksidanlar serbest radikal oluşumunu engelleyerek otooksidasyonu geciktiren ve bir yada daha fazla mekanizma ile serbest radikallerin yayılmasını durduran bileşikler yada sistemlerdir. Bu mekanizmalar (Brewer 2011);

1) Peroksidasyonu başlatan türlerin uzaklaştırılması

2) Metal iyonlarını bağlamak

3) Peroksit oluşumunu engelleyerek O_2^- nin uzaklaştırılması

4) Otooksidatif zincir reaksiyonlarını kırmak

5) Lokalize O_2 konsantrasyonunu azaltmak

Memeli dokuları, ROS oluşumu sonucu ortaya çıkan oksidatif doku hasarına karşı koruyucu yada azaltıcı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemlerini bulundurmaktadır. Çünkü birçok ROS'un in vivo $O_2^{\cdot-}$ den üretildiği, SOD'ın da iyi bir $O_2^{\cdot-}$ anyonu temizleyicisi ve antioksidan savunma sistem enzimi olduğu düşünülür. Bu nedenle SOD, ROS metabolizması içinde birinci basamakta yer alır. Memeliler 3 adet SOD izoenzimine sahiptirler; baskın olarak sitozolde bulunan CuZn-SOD, daha çok mitokondriyal matrikste bulunan Mn-SOD ve hücre dışı sıvıda lokalize olmuş EC-SOD'tur (Clarkson ve Thompson 2000).

Fiziksel egzersiz esnasında ortaya çıkabilecek oksidatif hasarın büyüklüğü sadece toplam serbest radikal oluşum miktarı ile değil antioksidanların savunma

kapasitesi ile de belirlenmektedir. Birçok ROS'un in vivo $O_2^{\cdot -}$ den üretildiği gösterilmekte ve SOD'un $O_2^{\cdot -}$ anyon temizleyicisi olarak endojen antioksidan savunma sistemi içerisinde en önemli enzim olduğu düşünülmektedir. Bundan dolayı da egzersizin doğrudan SOD ve CAT gibi antioksidan enzimler üzerine etki edebileceği düşünülmektedir (Ookawara ve ark 2003, Clarkson ve Thompson 2000).

SOD bir süperoksit molekülünü O_2 molekülüne yükseltgerken diğer süperoksit molekülünü H_2O_2'e indirgeyebilir. Endojen olarak üretilen SOD organizmadaki her hücre için esansiyel bir enzimdir. pH'ın nötr olduğu durumlarda enzimatik dismutasyon 10^9 kez daha hızlı olur ve bu nedenle SOD enzimi savunma için mutlaka gereklidir. Hücrelerde süperoksit birikememesinin nedeni SOD enziminin yüksek katalitik aktivitesi nedeniyledir (Ardağ 2008).

Süperoksiti, H_2O_2 ve moleküler oksijene çeviren reaksiyonu katalizleyen bir metalloenzimdir (Şekil 2.14). Bu sistem sayesinde hücre kompartmanlarındaki $O_2^{-\bullet}$ düzeyleri kontrol altında tutulur (Ardağ 2008).

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

Şekil 9. Süperoksit dismutaz enzim etkinliği

Tiyoller gibi indirgeyici ajanlar, standart indirgeyici potansiyele sahiptirler ve hızlı bir elektron alıcısıdırlar. Bu nedenle oksidan-tiyol ilişkisi reaksiyonunda oksidanlar, sırasıyla disülfitlere okside olan tiyollerin indirgeyici güçlerinin harcanması yoluyla daha az toksik olan biyolojik ürünlere nötralize edilirler (Prakash ve ark 2004).

Vücuttaki protein sülfidrillerinin serum düzeyi, antioksidan durumun belirtecidir ve düşük düzeydeki protein sülfidrilleri, pozitif olarak artmış lipit peroksit düzeyleri ve protein ürünleri oksidasyonu ile korelasyon gösterir (Prakash ve ark 2004).

Yapılarında antioksidan özelliği bulunan –SH bulunduran tiyoller serbest radikallerin oluşturduğu hasarı azaltmaya çalışırken bu reaksiyonlar esnasında plazma ve doku düzeylerini koruyamamaktadırlar. Plazmada en yüksek

konsantrasyonda bulunmaları nedeni erişkinlerde plazma protein seviyelerinin yüksek olmasından kaynaklanmaktadır (Sies 1997, McCord 1993).

Metabolizma olayları üzerine prooksidan yada antioksidan etki göstermelerine karşın genel olarak antioksidan olarak sınıflandırılırlar. Tiyollerin hangi etkiyi göstereceği oksidan durum, fizyolojik şartlar ve sülfür içeren aminoasitlerin ortamdaki yoğunluğu belirler. Sistein plazma T-SH 'leri arasında en çok bulunanıdır, homosistein ve GSH onu takip eder. (Caylak 2010).

Araştırmacılar tiyol redoks durumunun antioksidan savunma, elektrofilik ksenebiyotiklerin detoksifikasyonu, redoks ayarlı sinyal iletimi, sistein transport ve depolanması, hücre proliferasyonunun düzenlenmesi, deoksiribonükleotid sentezi, immün yanıt, lökotrien ve prostaglandin metabolizmalarında önemli olduğunu bildirmişlerdir (Sen ve Packer 2000).

Yapılarında T-SH grubu içeren antioksidanların kurşun zehirlenmesinde kullanılması ile kurşunun reaksiyona girdiği bileşiklerde onun yerine bağlanarak, dokulardan kurşun uzaklaştırılır ve oksidatif hasara karşı korunma sağlanmış olur (Yardım ve ark 2003).

T-SH 'ler Cu^{+2} veya Fe^{+3}'ü, direkt olarak radikalleri tutabilen Cu^{+2} ve Fe^{+2}'ye kendileri disülfite okside olarak indirgeyebilir. Bu indirgenmiş metal iyonları bir süperoksitle reaksiyona girerek yine yükseltgenebilir. SOD, süperoksidi H_2O_2'ye dönüştürür. Bu reaksiyonlar sonuçta süperoksit, H_2O_2 ve hidroksil radikalleri gibi ROS'leri üretir. T-SH bileşikleri ile uyarılan hasar verici etkiler böbrek iskemisi, karaciğer yetmezliği ile kalp-damar ve serebrovasküler dokuların hastalıklarında bildirilmiştir (Yardım ve ark 2003).

C vitamini çok güçlü bir indirgeyici ajan olup, süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kolayca reaksiyona girerler ve onları temizler (Barros ve ark 2011).

E vitamini, lipid peroksil radikallerini yıkarak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırdığı için zincir kırıcı bir antioksidan olarak da bilinir. Süperoksit radikali ve hidroksil radikallerini, singlet oksijen gibi reaktif oksijen ürünlerini indirger, nitrik asit ile de reaksiyona girebilir. Hücre membran

fosfolipidleri yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerini oksidatif hasardan koruyan savunma elemanıdır (Gilbert ve Colton 1999).

Polifenolik bileşikler, fenol grubu ve bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren aromatik yapılardır. Pek çok polifenol bazıları metilenmiş veya glikozillenmiş birden fazla hidroksil grubu içerir. Bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin yaklaşık 8000 çeşit olduğu tahmin edilmektedir. Polifenollerin serbest radikal süpürücüsü olarak aktivitesi için ideal kimyasal yapıya sahip oldukları ve derişim düzeyinde in vitro olarak α-tokoferol ve vitamin C'den daha etkin antioksidan özellik gösterdikleri ispatlanmıştır. Flavanoidler içeriği itibariyle en büyük gruptur ve 5000 farklı bileşenden oluşur. Flavanoid grubu içerisinde flavonolller, flavonlar, flavanoller ve izoflavonlar yer alırlar (Rice-Evans ve ark 1997).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gruplar ve Hayvanlar

Çalışma için Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen Wistar cinsi albino sıçanlar kullanıldı. Çalışma protokolü aynı merkezin etik kurulu tarafından onaylandı. Toplam 42 erkek erişkin sıçan kullanılan çalışmada hayvanlar 6 gruba ayrıldı.

Kontrol grubu (n=6): 4 hafta boyunca, haftada 5 gün, intraperitoneal (i.p) serum fizyolojik 1ml/kg olacak şekilde, her gün aynı saatlerde uygulandı.

Etanol grubu (n=7): 4 hafta boyunca, haftada 5 gün, % 40'lık 1ml/kg i.p etanol her gün aynı saatlerde uygulandı.

CAPE grubu (n=8): 4 hafta boyunca, haftada 5 gün, 10 μmol/kg i.p CAPE her gün aynı saatlerde uygulandı.

Kontrol-egzersiz grubu (n=5): 4 hafta boyunca haftada ardışık 5 gün, 1 saat/gün egzersiz yaptırılan deneklere egzersiz sonrası 1ml/kg olacak şekilde i.p serum fizyolojik her gün aynı saatlerde uygulandı.

Etanol-egzersiz grubu (n=8): 4 hafta boyunca haftada ardışık 5 gün, 1 saat/gün egzersiz yaptırılan deneklere egzersiz sonrası % 40'lık, 1ml/kg i.p etanol her gün aynı saatlerde uygulandı.

CAPE-Egzersiz grubu (n=8): 4 hafta boyunca, haftada ardışık 5 gün, 1 saat/gün egzersiz yaptırılan deneklere egzersiz sonrası 10 μmol/kg i.p CAPE her gün aynı saatlerde uygulandı.

Ortam sıcaklığı 20 ± 2^0C derecede sabit tutuldu. Her grup ayrı kafeslerde barındırıldı ve beslendi. Yüzme işi için plastik materyalden yapılmış havuz (150x80x60 cm) kullanıldı. Denekler 1 saat yüzebilir hale geldikten sonra egzersiz protokolüne başlandı.

4 hafta sonunda, son enjeksiyondan 24 saat sonra eter anestezisi altında, her bir denekten EDTA'lı tüplere intrakardiyak kan alındıktan sonra soğutmalı (4^oC) santrifüjde 10 dakika 3500 rpm de plazmaları alt tabakaya zarar verilmeden alınarak

ayrıldı. Ependorflara eşit miktarlarda transfer edilerek, -80 °C'de analizler gerçekleştirilene kadar saklandı.

2.2. Biyokimyasal Analizler

2.2.1. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

SOD (EC 1.15.1.1) enzim aktivitesi ölçümü Sun ve ark (1988)'nın yöntemine göre yapıldı. Bu yöntem ksantin / ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitro blue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi esasına dayanır. Oluşan süperoksit radikalleri ortamdaki NBT'yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorbans verir.

Enzimin olmadığı ortamda bu indirgenme meydana gelip mavi–mor renk oluşmaktadır. Ortamda SOD olduğunda ise NBT indirgenmesi olmayıp mavi–mor renk meydana gelmemekte ve enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmaktadır. Kör ve numune tüpleri hazırlandı. Tüm tüplere 1425 µL assay reaktifinin ardından numune tüplerine 50 µL plazma ve kör tüpüne 50 mL distile su pipetlendi. Tüm tüplere 25'er µL XO enzimi ilavesi ile tüpler alt üst edilip 25^{o} C'de 20 dakika inkübasyon sonu hemen tüm tüplere 500'er µL $CuCl_2$ ilavesi ile reaksiyonlar durduruldu. Distile suya karşı körden başlanarak 560 nm de absorbansları okundu. Sonuçlar U/ml şeklinde ifade edildi.

2.2.2. Malondialdehit Tayini

MDA seviyeleri Hammouda ve ark (1995)'nın metodu ile tiobarbitürik asit (TBA) reaktivitesi yöntemi kullanılarak ölçüldü. Yağ asidi peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA, TBA ile reaksiyona girerek sıcak ve alkali ortamda, 532 nm'de maksimum absorbans veren renkli kompleks oluşturur. Oluşan kompleksin okunan absorbansından faydalanılarak MDA değerleri elde edilir. Numune ve deney tüpleri hazırlandı. Tüplere 2,5 ml % 10'luk (w/v) TCA çözeltisi koyulduktan sonra kör tüpüne 0,5 ml distile su, numune tüpüne ise 0,5 ml numune koyularak vorteksle karıştırıldı. Tüplerin ağzı kapatıldıktan sonra 90 ^{0}C'lik su banyosunda 15 dakika bekletildi. Tüpler soğutulduktan sonra 3000 G hızda 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatanlardan 2 ml alınıp üzerine % 0,675'lik (w/v) TBA çözeltisinden 1 ml eklendi. Tekrar 90 ^{0}C'lik su banyosunda 15 dakika bekletildikten sonra tüpler

soğutuldu. Her numunenin 532 nm de köre karşı absorbansları ölçüldü ve standart grafiğinden faydalanılarak mmol/L olarak ifade edildi.

2.2.3. Nitrik Oksit Tayini

NO miktarı, Cortas ve Vakid'in (1990) yöntemine göre ölçüldü. Spesifik olmayan reaksiyonların oluşmasını önlemek için homojenatlar önce deproteinize edilip daha sonra nitrit/nitrat konsantrasyonları Griess reaksiyonu ile belirlendi. pH 9.7 olan glisin tamponunda bakır (Cu^{+2}) kaplı kadmiyum granüllerinin deproteinize numune süpernatanı ile 90 dakikalık inkübasyon sonunda nitratın nitrite indirgenmesi sağlandı. Üretilen nitrit; sulfonilamid ve N-naftil etilenedaimin (NNDA) reaksiyonu sonucu pembe renk oluşumuna yol açtı. Oluşan renk spektrofotometrede 545 nm dalga boyunda okundu. Elde edilen nitrit konsantrasyonu ilk konsantrasyondan çıkarılarak nitrat miktarı belirlendi. Sonuçlar mmol/L olarak ifade edildi.

2.2.4. Total Tiyol Tayini

Total tiyol seviyeleri Hu (1994)' nun tanımladığı yönteme göre çalışıldı. Bu yöntem serbest tiyol gruplarının bazik ortamda DNTB ile sarı renkli bir bileşik oluşturması ve bu bileşiğin renginin 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. 0,2 M Na_2HPO_4 ve 0.002 M Na_2EDTA ile reaktif 1 hazırlandı. 0.2 M Na_2HPO_4 ve DTNB ile reaktif 2 hazırlandı. Reaktif 2'nin reaktif 1'e oranı 1/45 olarak sağlanacak şekilde karıştırıldıktan sonra numune eklenerek oda ısısında 30 dakika bekletildi. Santrifüjde 15 dakika santrifügasyon sonunda elde edilen süpernatant 412 nm dalga boyunda spektrofotometrede köre karşı okundu. Sonuçlar μmol/L olarak ifade edildi.

2.3. İstatistiksel Analiz

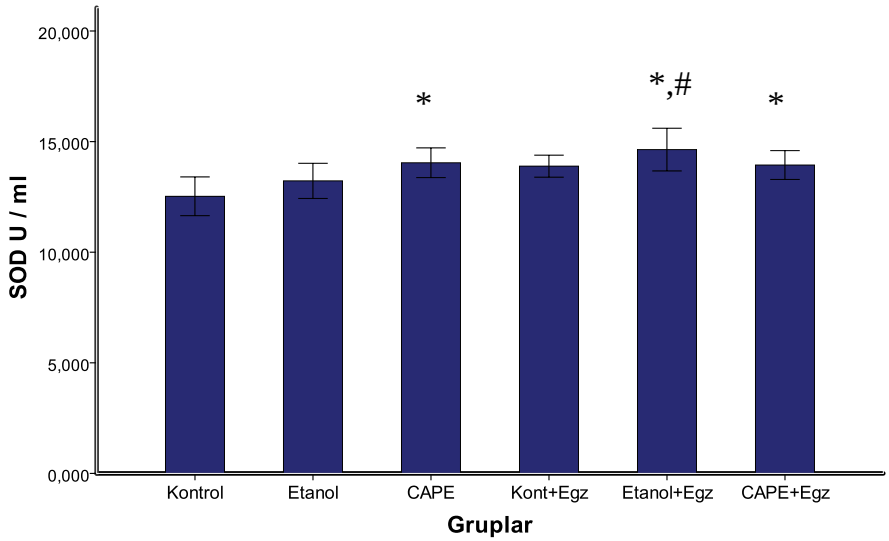
Değerler ortalama ± standart sapma olarak gösterildi. Varyansların homojenliği Levene's testi ile kontrol edildikten sonra gruplar arası karşılaştırma tek yönlü varyans analizi ANOVA ile değerlendirildi. Anlamlı çıkan parametrelerin ikili karşılaştırılması *post hoc* Tukey's testi ile yapıldı. İstatistiki anlamlılık için $p< 0.05$ kabul edildi.

3. BULGULAR

Çalışmada değerlendirilen biyokimyasal parametrelere ait değerler ortalama ± standart sapma şeklinde Çizelge 1' de gösterilmiştir.

3.1. Plazma Süperoksit dismutaz Aktivitesi

Egzersiz yaptırılan hayvanlar egzersiz yaptırılmayan hayvanlar ile kıyaslandığında SOD aktivitesi açısından farka rastlandı ($p = 0.02$). Grupların ikili karşılaştırılmalarında CAPE grubunun SOD aktivitesinin kontrol grubundan daha yüksek olduğu görüldü (p=0,02). Aynı zamanda kontrol grubuna göre Etanol+Egzersiz (p=0,01) ve CAPE+Egzersiz gruplarının SOD aktivitesi (p=0,04) daha yüksekti. Keza Etanol grubuna göre Etanol+Egzersiz grubunun SOD aktivitesi daha yüksek bulundu (p=0,03).



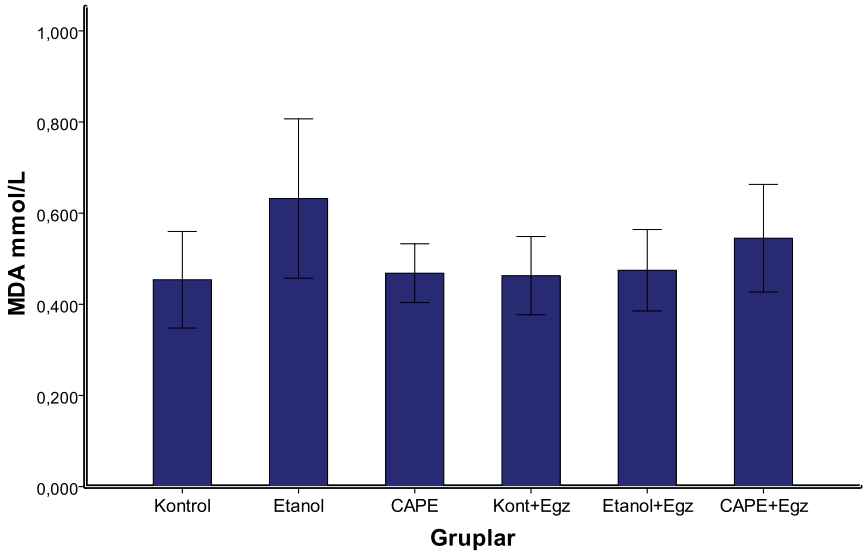
Şekil 10. Plazma SOD enzim aktivitesinin gruplara göre dağılımı

(*) Kontrol'e göre ($p < 0.05$)

(#) Etanol'e göre ($p < 0.05$)

3.2. Plazma Malondialdehit Düzeyleri

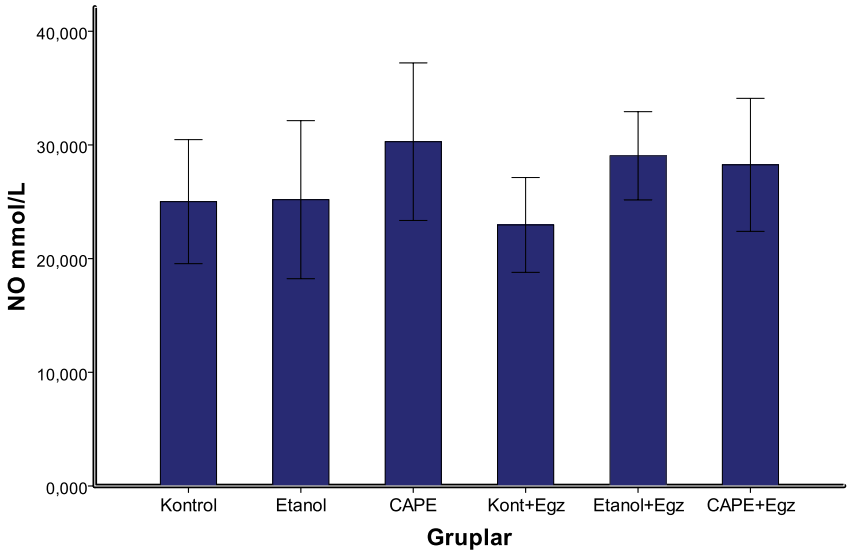
Gruplar arasında çapraz karşılaştırma yapıldığında MDA düzeyleri açısından istatistiki anlamlılığa sahip bir farka rastlanmadı (p=0.74).



Şekil 11. Plazma MDA düzeyinin gruplara göre dağılımı

3.3. Plazma Nitrik oksit Düzeyleri

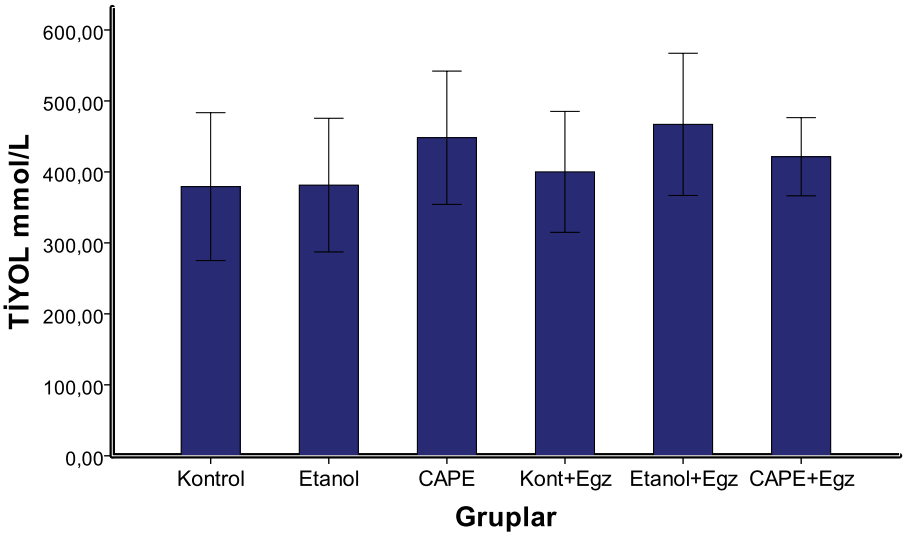
Gruplar arasında çapraz karşılaştırma yapıldığında NO düzeyleri açısından istatistiki anlamlılığa sahip bir farka rastlanmadı (p=0.45).



Şekil 12. Plazma NO düzeyinin gruplara göre dağılımı

3.4. Plazma Tiyol Düzeyleri

Gruplar arasında çapraz karşılaştırma yapıldığında tiyol düzeyleri açısından istatistiki anlamlılığa sahip bir farka rastlanmadı (p=0.30).



Şekil 13. Plazma Tiyol düzeyinin gruplara göre dağılımı

Çizelge 1. Araştırma grupları ve egzersize göre plazma SOD (U/ml) aktiviteleri, MDA (µmol/L), NO (µmol/L), Total Tiyol (µmol/L) düzeyleri

Gruplar	SOD	MDA	NO	TİYOL
Kontrol	12,53±0,83	0,45±0,10	25,01±5,20	379,25±99,26
Etanol	13,23±0,86	0,63±0,19	25,18 ±7,52	381,40 ±101,86
CAPE	14,04±0,80*	0,47±0,08	30,28±8,29	448,18±112,38
Kontrol+Egzersiz	13,89±0,40	0,46±0,07	22,96±3,36	400,07±68,63
Etanol+Egzersiz	14,64±1,16*,#	0,47±0,11	29,04±4,65	467,02±119,87
CAPE+Egzersiz	13,94±0,7*	0,55±0,14	28,25±7	421,33±65,89

(*) Kontrol'e göre ($p < 0.05$)

(#) Etanol'e göre ($p < 0.05$)

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada sıçan kronik egzersiz modelinde CAPE'nin oksidatif stres ve antioksidan enzim düzeylerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Tıbbi literatürde propolisin etken moleküllerinden olan CAPE'nin antioksidan aktivitesine dair güvenilir veriler mevcuttur. Buna karşın kronik egzersiz sürecinde uygulanan söz konusu polifenolün redoks dengesi üzerine etkisine dair araştırmaların yokluğu, geleneksel tıpta yaygın kullanım alanı bulan CAPE'nin besin desteği olarak tavsiye edilebilirliği noktasında tereddütlere kapı aralamaktadır.

Egzersize karşı gelişen redoks yanıtı başlıca egzersizin tipi ile belirlenmektedir. Akut egzersiz redoks dengesinin pro-oksidanlar yönünde kaymasına yol açarken kronik; yani düzenli egzersizin sağlık açısından faydaları iyi bilinmektedir. Kronik egzersiz sürecinde düzenli şekilde uyarılan endojen antioksidan savunma sistemi adaptif bir yanıt sergiler ve nihayetinde akut egzersizde görülenin aksine biyokimyasal analizlerde, oksidatif stres belirteçleri ile antioksidan savunma belirteçleri arasında bir denge kurulduğu görülür. Bu noktada eksojen antioksidan moleküllerin uygulanması hassas bir konudur; çünkü kronik egzersiz sürecinde kurulan dengenin redüksiyon yönünde kaymasına yol açabilecekleri gibi pro-oksidan aktivite sergileyerek bizatihi oksidatif hasara da neden olabilirler (Nyyssönen ve ark 1997).

Kronik egzersiz modeli kullanılan önceki hayvan çalışmalarına bakıldığında, antioksidan savunma sisteminin ilk basamağını teşkil eden SOD enzim aktivitesinin artışına dair raporlar dikkat çekmektedir (Lima ve ark 2013, Oh-ishi ve ark 1997, Miyazaki ve ark 2001). Bu sonucun klinik karşılığının değerlendirilebilmesi açısından yaşamlarının farklı dönemlerinde bulunan insan deneklerin kullanıldığı araştırmalara göz atıldığında benzer sonuçlar ile karşılaşılmaktadır (Ohno ve ark 1992, Gonenc ve ark 2000). Mevcut çalışmada, önceki çalışmaları destekler mahiyette SOD enzim aktivitesinin kronik egzersiz ile artış sergilediği görülmüştür. Egzersiz yaptırılmayan hayvanlarda CAPE uygulamasının SOD aktivitesini artırırken egzersiz yaptırılan hayvanlar da bu bağlamda bir artışın gerçekleşmemiş olması ise dikkat çekicidir. Egzersiz yaptırılmayan hayvanlarda endojen antioksidan savunma sisteminin stimüle edilmemiş olması, buna karşın egzersiz ile endojen savunmanın harekete geçmesi, bir eksojen antioksidan olan CAPE'nin iki farklı ana grupta

görülen etkileri arasındaki farkı izah etmektedir. Buradan hareketle sedanter hayvanlarda antioksidan savunmayı destekleyen CAPE'nin kronik egzersiz sürecinde redoks dengesi üzerine olumlu veya olumsuz etkisinin söz konusu olmadığı söylenebilir.

Lipid peroksidasyonunun bir son ürünü olan ve oksidatif stres belirteci olarak sıklıkla kullanılan MDA'nın kronik egzersiz neticesinde değişmediğine çalışmalar (Alessio ve ark 2000, Dixon ve ark 2006, Jimenez ve ark 2000, Lima ve ark 2012) çoğunlukta bulunmakla birlikte azaldığını belirten yazarlara da rastlamak mümkündür (Gönenç 1995, Groussard ve ark 2003). Çalışmamızın sonuçları kronik egzersizin MDA seviyeleri üzerine etkisine dair genel anlayışı destekler mahiyettedir. Bir kez daha bu sonucun olasılıkla kronik egzersiz sürecinde stimüle edilen endojen antioksidan savunma sisteminin eseri olduğu söylenebilir.

Lipid peroksidasyonu başlıca lipid membranların harabiyetini doğururken en az bunun kadar tehlikeli olan protein oksidasyonu, intra- ve ekstrasellüler biyolojik faaliyetlerin sekteye uğramasına neden olur. Tiyol seviyelerindeki azalma tiyil radikalinin oluşumuyla orantılıdır ve oksidatif stresin önemli göstergelerinden addedilir. Çeşitli kronik egzersiz modellerinde total tiyol seviyelerinde azalma bildirilmiş olmasına (Zinellu ve ark 2007, Anuradha ve Balakrishnan 1998) karşın çalışmamızda muhtemelen redoks dengesinin kronik egzersiz ile bozulmuyor olması sayesinde tiyol seviyelerinin değişmediği görülmüştür. Elde ettiğimiz bulguların önceki kronik egzersiz çalışmalarından farklı olması egzersizin süresi, şiddeti, deney hayvanının cinsi, beslenme ve bakım şartları gibi pek çok farklı faktörün müşterek etkisinin bir sonucu olabilir.

NO; vasküler reaktivite, immün yanıt, nörotransmisyon gibi fizyolojik görevler yürüten gaz formunda bir molekül olmasına karşın oksidasyonu neticesinde açığa çıkan reaktif nitrojen türlerinin oksidatif strese katkı sunduğu bilinmektedir (Kurtulus ve ark 2003). Tıbbi literatürde kronik egzersiz ve NO seviyeleri arasındaki ilişki net biçimde ortaya konulamamıştır ve çelişkili sonuçlara sıkça rastlanılmaktadır (Ashton ve ark 1999, Taylan-Deveden 2011, Balon ve Nadler 1997). Mevcut çalışmada kronik egzersizin ve/veya CAPE uygulamasının NO seviyeleri üzerinde herhangi bir etki sergilemediği görülmüştür. Bu durumun başlıca sebeplerinden biri NO'nun aşırı labil yapılı bir molekül olması ve temel kaynağı olan L-arjinin'den sentezi haricinde yıkım ürünü olan nitrattan tekrar oluşturuluyor olması olabilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kronik (düzenli) egzersiz, egzersizin sağlık açısından faydalarından sorumlu olan tipidir ve egzersize bağlı doku hasarının önemli nedenlerinden biri oksidatif strestir. Bu noktada antioksidanların kullanımı bahse konu olmakla birlikte düzenli egzersizde yeniden inşaa edilen redoks dengesinin bu moleküller tarafından ne şekilde değiştirildiği merak uyandırmaktadır.

Mevcut çalışmamızda geleneksel tıpta yoğun şekilde kullanılan CAPE'nin kronik egzersiz yaptırılan hayvanlarda redoks dengesini bozmadığı gibi endojen antioksidan savunma sisteminin ilk basamağını teşkil eden SOD aktivitesini güçlendirdiği gösterilmiştir. Bununla birlikte egzersizin ve egzersiz sürecinde CAPE uygulamasının lipid ve protein oksidasyonuna işaret eden diğer oksidatif stres belirteçleri üzerine etki sergilememiş olması bu molekülün homeostatik dengeyi desteklediğini düşündürmektedir.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KAFEİK ASİT FENİL ESTERİN SIÇANLARDA KRONİK YÜZME EGZERSİZİYLE OLUŞAN OKSİDATİF STRES VE ANTİOKSİDAN SAVUNMA ÜZERİNE ETKİLERİ

Mehmet Atilla ZEYREK

Fizyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2014

Propolisin aktif bileşeni olan Kefeik asit fenetil ester (CAPE) uzun yıllardır geleneksel tıpta kullanılmaktadır. Antioksidan, antiproliferatif, immün sistem düzenleyici ve antienflamatuvar özelliklerinin yanı sıra lipit peroksidasyonunu baskıladığı gibi lipoksijenaz aktivitesini de engelleyici özellik göstermektedir. Prooksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dengenin prooksidanlardan tarafa değişmesi oksidatif stres olarak bilinir. Egzersiz esnasında oksijen tüketimi ile reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Egzersiz ile uyarılmış oksidatif stres ile uyuşmayan bu yararlı bileşenler bilinse de, CAPE nin kan redoks düzeyi üzerine etkilerini değerlendiren kronik yüzme egzersiz modeli kullanılarak yapılan araştırma bulunmamaktadır.

Bu çalışmamızda wistar albino tipi erkek sıçanların 4 hafta süresince, haftadan 5 gün, günde 1 saat süreyle yüzdürülmesine dayanan kronik yüzme egzersizi modelinde CAPE'nin oksidatif parametreler üzerine etkisi araştırıldı. Bu amaçla hayvanlar önce egzersiz yaptırılan ve yaptırılmayan olmak üzere iki gruba ayrıldı. Daha sonra ise her iki grupta kontrol, etanol, CAPE olmak üzere alt gruplar oluşturuldu. Her egzersiz seansını takiben kontrol gruplarına 10 µmol/kg i.p. serum fizyolojik, etanol gruplarına % 40'lık 1 ml/kg i.p. etanol ve 10 µmol/kg i.p. CAPE verildi. Çalışma sonunda egzersiz yaptırılan grupta kronik egzersize bağlı oksidatif strese yanıt olarak plazma süperoksit dismutaz (SOD) egzersiz yaptırılmayan gruba kıyasla artış, malondialdehit (MDA), total tiyol ve nitrikoksit (NO) değerlerinde anlamlı bir değişimin olmadığı gözlendi. Egzersiz yapmayan sıçanlar plazma SOD aktivitelerini karşılaştırıldığında CAPE grubunda kontrol grubuna göre anlamlı artış gözlendi. CAPE'nin plazma MDA, NO ve tiyol seviyelerine anlamlı bir etkisi gözlenmedi. Kronik egzersizde CAPE tedavisi antioksidan kapasiteyi artırmadı. Akut egzersiz modeline karşılık bulduğumuz çelişkili sonuçlar; kronik yüzme egzersiz modelinde endojen savunmanın oksidatif hasarın engellenmesinde yeterli olduğunu göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: CAPE, Yüzme Egzersizi, SOD, MDA, Total Tiyol

7. SUMMARY

EFFECTS OF CAFFEIC ACID PHENYL ESTER ON CHRONIC SWIMMING EXERCISE INDUCED OXIDATIVE STRESS ANTIOXIDANT DEFENCE IN RATS

Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) is an active component of honeybee propolis extracts and has been used for many years as a folk medicine. It has antiinflammatory, immunomodulatory, antiproliferative and antioxidant properties and has been shown to inhibit lipooxygenase activities as well as suppress lipid peroxidation. Oxygen consumption during exercise results ROS generation. Changing the balance between prooxidants and antioxidants in the direction of prooxidants is named as oxidative stress. The beneficial effects of these components in the conflict of exercise induced oxidative stres are known but as we know there isn't any investigation that evaluates the effects of CAPE in chronic swimming exercise model in blood redox status.

In this study we investigated the effects of CAPE on oxidative stres parameters in wistar albino rats by chronic swimming exercise model (1h/day, 5days/week along 4 weeks). Rats were seperated into 2 groups as trained and untrained and then subgroups were generated as control, ethanol, cape. After every exercise bout 10 µmol/kg i.p.serum physiologic (SF) for control groups, 1 ml/kg i.p. ethanol (40%) for ethanol groups, 10 µmol/kg i.p. CAPE groups were given. At the end of this study when we compare trained group with untrained groups significantly increase in plasma superoxide dismutase (SOD) activity, any significant change in malondialdehit (MDA), thiol levels and NO levels were observed. When compared the untrained groups plasma SOD activity there have been a significant increase in CAPE group compared control group. There wasn't observed any significant effect of CAPE in plasma MDA, NO and thiol levels. Treatment with CAPE did not augment anti-oxidant capacity in chronic exercise. We deduce that our opposing results to that in acute exercise models show that endogen defence is sufficient to prevent oxidative injury in chronic swimming exercise.

Key Words: CAPE; Chronic swimming; Exercise; Quercetin; Oxidative stres

8. KAYNAKLAR

Akyol Ö. Şizofrenide Oksidatif Stres. Kocatepe Tıp Dergisi. 2004;5:15–25.

Akyol S, Ginis Z, Armutcu F, Ozturk G, Yigitoglu MR, Akyol O. The potential usage of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against chemotherapy-induced and radiotherapy-induced toxicity. Cell Biochem Funct. 2012;30(5):438–43.

Alessio HM, Hagerman AE, Fulkerson BK, Ambrose J, Rice RE, Wiley RLHM, Hagerman AE, Fulkerson BK, Ambrose J, Rice RE, Wiley RL. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. Med Sci Sports Exerc. 2000;32(9):1576–81.

Alfadda AA, Sallam RM. Reactive Oxygen Species in Health and Disease. Jou of Biomed and Biotech. 2012 ;(1):1–14.

Almas K, Mahmoud A, Dahlan A. A comparative study of propolis and saline application on human dentin. A SEM study. Indian J Dent Res. 2001;12(1):21–27.

Anuradha CV, Balakrishnan SD. Effect of training on lipid peroxidation, thiol status and antioxidant enzymes in tissues of rats. Ind J Physiol Pharmacol. 1998;42(1):64–70.

Ardağ A. Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemlerinin Analitik Açıdan Karşılaştırılması. Aydın, Yüksek Lisans Tezi 2008.

Ashton T, Young IS, Peters JR, Jones E, Jackson SK, Davies B, Rowlands CC. Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study. J Appl Physiol. 1999;87(6):2032-6

Balon TW, Nadler JL. Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. J Appl Physiol. 1997;82(1):359–63.

Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, Ishii E, Midorikawa K, Matsushige K, Kadota S. Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. Phytomedicine. 2001;8(1):16–23.

Barros A.I.R.N.A, Nunes FM, Gonçalves B, Bennett R, Silva AP. Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (Castanea sativa Mill.). Food Chemistry. 2011;128(1):165–72.

Bloomer RJ, Goldfarb AH. Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. Can J Appl Physiol. 2004;29(3):245–63.

Botezelli JD, Cambri LT, Ghezzi AC, Dalia RA, Scariot PP, Ribeiro, C. Different exercise protocols improve metabolic syndrome markers, tissue triglycerides content and antioxidant status in rats. Diabetol Metab Syndr. 2011;3(1):35.

Brewer MS. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2011;10(4):221–47.

Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. Semin Fetal Neonatal Med. 2010;15(4):186–90.

Caylak E. Lead Toxication and Oxidative Stress in Children and Antioxidant Effects of Thiol Compounds. J Child. 2010;10(1):13–23.

Chen YJ, Shiao MS, Wang SY. The antioxidant caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis associated with selective scavenging of hydrogen peroxide in human leukemic HL-60 cells. Anticancer Drugs. 2001;12(2):143–49.

Chen YJ, Huang AC, Chang HH, Liao HF, Jiang CM, Lai LY, Chan JT, Chen YY, Chiang J. Caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, protects peripheral blood mononuclear cells of competitive cyclists against hyperthermal stress. J Food Sci. 2009;74(6):H162-7.

Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? Am J Clin Nutr. 2000;72(2):637-46.

Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. Clin Chem. 1990;36(8 Pt 1):1440–3.

Cutler RG, Plummer J, Chowdhury K, Heward C. Oxidative stress profiling: Part II. Theory, technology, and practice. Ann N Y Acad Sci. 2005;1055:136–58.

Danthi S, Enyeart JA, Enyeart JJ. Caffeic acid esters activate TREK-1 potassium channels and inhibit depolarization-dependent secretion. Mol Pharmacol. 2004;65(3):599–610.

Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. Biochem Biophys Res Commun. 1982;107(4):1198–205.

Deaton CM, Marlin DJ. Exercise-associated oxidative stress. Clinical Techniques in Equine Practice. 2003;2(3):278–91.

Demir R. Paternli Cilt Fleplerinde Sildenafil'in Antioksidan Etkisinin Araştırılması. Samsun,Yüksek Lisans Tezi 2008.

Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, Dumelin EE, Tappel AL. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol. 1978;45(6):927–32.

Dixon CB, Robertson RJ, Goss FL, Timmer JM, Nagle EF, Evans RW. The effect of acute resistance exercise on serum malondialdehyde in resistance-trained and untrained collegiate men. J Strength Cond Res. 2006;20(3):693-8.

Duthie GG, Wahle KW, James WP. Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. Nutr Res Rev. 1989;2(1):51–62.

Fadillioglu E, Erdogan H, Iraz M, Yagmurca M. Effects of caffeic acid phenethyl ester against doxorubicin-induced neuronal oxidant injury. Neurosci Res Comm. 2003;33(2):132–8.

Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition. 2002;18(10):872–9.

Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress. Relationship with exercise and training. Sports Med. 2006;36(4):327–58.

Fischer CP, Hiscock NJ, Penkowa M, Basu S, Vessby B, Kallner A. Supplementation with vitamins C and E inhibits the release of interleukin-6 from contracting human skeletal muscle. J Physiol. 2004;558(Pt 2):633–45.

Flora SJS. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. Oxid Med Cell Longev. 2009;2(4):191–206.

Frankel EN, Meyer AS. The Problems of Using One-Dimensional Methods to Evaluate Multifunctional Food and Biological Antioxidants. Jou of the Sci of Food and Agriculture. 2000;80(13):1925–41.

Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. Lab Invest. 1982;47(5):412–26.

Fukuto JM, Carrington Samantha J, Tantillo DJ, Harrison JG, Ignarro LJ, Freeman BA. Small molecule signaling agents: the integrated chemistry and biochemistry of nitrogen oxides, oxides of carbon, dioxygen, hydrogen sulfide, and their derived species. Chem Res Toxicol. 2012;25(4):769–93.

Gilbert DL, Colton CA. Reactive Oxygen Species in Biological Systems. An Interdisciplinary Approach. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers 1999.

Gomez-Cabrera M, Domenech E, Romagnoli M, Arduini A, Borras C, Pallardo FV. Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. Am J Clin Nutr. 2008a;87(1):142–9.

Gomez-Cabrera M, Domenech E, Viña J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. Free Radic Biol Med. 2008b;44(2):126–131.

Gönenç S, Açıkgöz O, Semin I, Özgönül H. The effect of moderate swimming exercise on antioxidant enzymes and lipid peroxidation levels in children. Indian J Physiol Pharmacol. 2000;44(3): 340–4.

Gönenç S. Çocuklarda Dört Haftalık Yüzme Egzersizinin Antioksidan Enzimler ve Lipit Peroksidasyona Etkisi. İzmir, Uzmanlık Tezi 1995.

Groot H. Reactive oxygen species in tissue injury. Hepatogastroenterology. 1994;41(4):328–32.

Groussard C, Rannou-Bekono F, Machefer G, Chevanne M, Vincent S, Sergent O. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. Eur J Appl Physiol. 2003;89(1):14–20.

Gul M, Demircan B, Taysi S, Oztasan N, Gumustekin K, Siktar E. Effects of endurance training and acute exhaustive exercise on antioxidant defense mechanisms in rat heart. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2006;143(2):239–45.

Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem. 1995;41(12 Pt 2):1819–28.

Gümüş A. Isırgan Otu (Urtica dioica L.) Tohumu ekstresinin, akut karbon tetraklorür uygulanan albino sıçanlarda plazma ve karaciğer lipid peroksidasyonu ile glutatyon düzeylerine etkisi. İstanbul, Yüksek Lisans Tezi 2007.

Güzel AN. Sıçanlarda Akut Ve Kronik Egzersizde Askorbik Asit Yüklemesinin Lipid Peroksidasyona ve Antioksidan Sisteme Etkisi. Ankara, Doktora tezi 2001.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Meth Enzymol. 1990;186:1–85.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. Third edition, Oxford, New York, Oxford University Press 1999.

Hammouda AR, Khalil MM, Salem A. Lipid peroxidation products in pleural fluid for separation of transudates and exudates. Clin Chem. 1995;41(9):1314–5.

Hoene M, Franken H, Fritsche L, Lehmann R, Pohl AK, Häring HU. Activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathway in the liver of mice is related to plasma glucose levels after acute exercise. Diabetologia. 2010;53(6):1131–41.

Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. Meth Enzymol. 1994;233:380–5.

Ilhan A, Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, Ciralik H, Akyol O. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. Eur J Cardiothorac Surg. 1999;16(4):458–63.

Inal M, Akyüz F, Turgut A, Getsfrid WM. Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. Med Sci Sports Exerc. 2001;33(4):564–7.

Irrcher I, Ljubicic V, Hood DA. Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1alpha transcription in skeletal muscle cells. Am J Physiol. 2009;296(1):116-23.

Ji LL. Exercise and oxidative stress: role of the cellular antioxidant systems. Exerc Sport Sci Rev. 1995;23:135–66.

Jimenez L, Lefevre G, Richard R, Duvallet A, Rieu M. Exercise does not induce oxidative stress in trained heart transplant recipients. Med Sci Sports Exerc. 2000;32(12):2018–23.

Kalender S, Kalender Y, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Durak D, Açikgoz F. Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E. Toxicology. 2004;202(3):227–35.

Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. APMIS. 2007;115(2):81–103.

Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Crit Rev Toxicol. 1993;23(1):21–48.

Kılınç K, Kılınç A. Oksijen Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri. Hacettepe Tıp Dergisi. 2002;33(2):110–8.

Kurtulus H, Eskiocak S, Tütüncüler F, Basaran ÜN, Gülen S. Deneysel Sistemik Hipoksi Gelistirilmis Yenidogan Ratlarda Nasetisistein Uygulamasının Etkileri. Turkish Journal Of Biochemical. 2003;28(2):40–44.

Lamprecht M, Greilberger J, Oettl K. Analytical aspects of oxidatively modified substances in sports and exercises. Nutrition. 2004;20(7-8):728–30.

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

Lima FD, Stamm DN, Della-Pace ID, Dobrachinski F, de Carvalho NR, Royes LFF. Swimming Training Induces Liver Mitochondrial Adaptations to Oxidative Stress in Rats Submitted to Repeated Exhaustive Swimming Bouts. Plos One. 2013;8(2):556-68.

Lima MC, Marks G, Silva IS, Silva BAK, Cônsolo LZZ, Nogueira GB. Evaluation of oxidative stress in mice subjected to aerobic exercise. Acta Cir Bras. 2012;27(8):544–551.

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Phcog Rev. 2010;4(8):118-26.

Lu J, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. J Cell Mol Med. 2010;14(4):840–60.

Maffia P, Ianaro A, Pisano B, Borrelli F, Capasso F, Pinto A, Ialenti A. Beneficial effects of caffeic acid phenethyl ester in a rat model of vascular injury. British Journal of Pharmacology. 2002;136(3):353–60.

Malech HL, Gallin JI. Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. N Engl J Med. 1987;317(11):687–94.

Malo C, Wilson JX. Glucose modulates vitamin C transport in adult human small intestinal brush border membrane vesicles. J Nutr. 2000;130(1);63–69.

Mastaloudis A, Leonard SW, Traber MG. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. Free Radical Biology and Medicine. 2001;31(7):911–22.

McCord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. Clin Biochem. 1993;26(5):351–7.

Michailidis Y, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Fatouros IG, Koutedakis Y, Papassotiriou I, Kouretas D. Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. Med Sci Sports Exerc. 2007;39(7):1107–13.

Michaluart P, Masferrer JL, Carothers AM, Subbaramaiah K, Zweifel BS, Koboldt C. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. Cancer Res. 1999;59(10):2347–52.

Mirzoeva OK, Calder PC. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 1996;55(6):441–9.

Miyazaki H, Oh-ishi S, Ookawara T, Kizaki T, Toshinai K, Ha S. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. Eur J Appl Physiol. 2001;84(1-2):1–6.

Nyyssönen K, Poulsen HE, Hayn M, Agerbo P, Porkkala-Sarataho E, Kaikkonen J, Salonen R, Salonen JT. Effect of supplementation of smoking men with plain or slow release ascorbic acid on lipoprotein oxidation. Eur J Clin Nutr. 1997;51(3):154-63.

Oh-ishi S, Kizaki T, Ookawara T, Sakurai T, Izawa T, Nagata N, Ohno H. Endurance training improves the resistance of rat diaphragm to exercise-induced oxidative stress. Am J Respir Crit Care Med. 1997;156(5):1579–85.

Ohno H, Yamashita H, Ookawara T, Saitoh D, Wakabayashi K, Taniguchi N. Training effects on concentrations of immunoreactive superoxide dismutase iso-enzymes in human plasma. Acta Physiol Scand. 1992;146(2):291–2.

Ookawara T, Haga S, Ha S, Oh-Ishi S, Toshinai K, Kizaki T. Effects of endurance training on three superoxide dismutase isoenzymes in human plasma. Free Radic Res. 2003;37(7):713–19.

Ozen S, Akyol O, Iraz M, Söğüt S, Ozuğurlu F, Ozyurt H. Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. J Appl Toxicol. 2004;24(1):27–35.

Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature. 1988;333(6174):664–6.

Peake J, Suzuki K. Neutrophil activation, antioxidant supplements and exercise-induced oxidative stress. Exerc Immunol Rev. 2004;10:129–41.

Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. Physiol Rev. 2008;88(4):1379–406.

Popova M, Silici S, Kaftanoglu O, Bankova V. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. Phytomedicine. 2005;12(3):221–8.

Popovic LM, Mitic NR, Radic I, Miric D, Kisic B, Krdzic B, Djokic T. The effect of exhaustive exercise on oxidative stress generation and antioxidant defense in guinea pigs. Adv Clin Exp Med. 2012;21(3):313–20.

Powers SK, Jackson MJ. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. Physiological Reviews. 2008;88(4):1243–76.

Prakash M, Upadhya S, Prabhu R. Protein thiol oxidation and lipid peroxidation in patients with uraemia. Scand J Clin Lab Invest. 2004;64(6):599–604.

Radák Z. Free radicals in exercise and aging. Champaign IL, Human Kinetics 2000.

Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Science. 1997;2(4):152–9.

Russo A, Longo R, Vanella A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. Fitoterapia. 2002;73(1):21-9.

Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. J Nutr Biochem. 2007;18(9):567–79.

Selmeci L, Seres L, Antal M, Lukács J, Regöly-Mérei A, Acsády G. Advanced oxidation protein products (AOPP) for monitoring oxidative stress in critically ill patients: a simple, fast and inexpensive automated technique. Clin Chem Lab Med. 2005;43(3):294–7.

Sen CK, Packer L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. Am J Clin Nutr. 2000;72(2):653-69.

Sen CK, Packer L, Hänninen O. Handbook of oxidants and antioxidants in exercise. Amsterdam Oxford, Elsevier 2000b.

Shacter E. Protein oxidative damage. Meth Enzymol. 2000;319:428–36.

Shen YC, Yen YC, Liou KT. Ameliorative effects of caffeic acid phenethyl ester on an eccentric exercise-induced skeletal muscle injury by down-regulating NF-κb mediated inflammation. Pharmacology. 2013;91(3-4):219-28.

Sies, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Exp Physiol. 1997;82(2):291–5.

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

Tamer L, Polat G, Eskandari G, Ercan B, Atik U. Serbest radikaller. Mersin Üniv Tıp Fak Der. 2000;1(1):52-8.

Taylan-Deveden EY. Tüketici egzersizin egzersiz eğitimli ve eğitimsiz sıçanlarda kas sitokini IL-6 ve oksidatif stres üzerine etkileri. Ankara, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi 2011.

Tekkes Y. Streptozotisin ile diabe oluşturulmuş farelerde aspirin ve e vitamininin dokularda lipit peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması. Kahramanmaraş, Yüksek Lisans Tezi 2006.

Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. Toxicology. 2003;189(1-2):41–54.

Uz E, Yılmaz HR, Iraz M, Fadıllıoğlu E, Özyurt H, Söğüt S, Akyol Ö. Effects of vitamin E and Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on methabolic enzymes of rats with experimental liver ischemia-reperfusion injury. Ege Tıp Dergisi. 2002;41(2):77–82.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(1):44–84.

Velikova M, Bankova V, Marcucci MC, Tsvetkova I, Kujumgiev A. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae. Z Naturforsch C. 2000;55(9-10):785-9.

Vincent HK, Powers SK, Stewart DJ, Demirel HA, Shanely RA, Naito H. Short-term exercise training improves diaphragm antioxidant capacity and endurance. Eur. J. Appl. Physiol. 2000;81(1-2):67–74.

Yagmurca M, Erdogan H, Iraz M, Songur A, Ucar M, Fadillioglu E. Caffeic acid phenethyl ester as a protective agent against doxorubicin nephrotoxicity in rats. Clin. Chim. Acta. 2004;348(1-2):27–34.

Yardım AS, Ozkan Y, Ozkan E, Torun M, Simşek B. The role of plasma thiol compounds and antioxidant vitamins in patients with cardiovascular diseases. Clin. Chim. Acta. 2003;338(1-2):99–105.

Yasui N, Nishiyama E, Juman S, Negishi H, Miki T, Yamori Y, Ikeda K. Caffeic acid phenethyl ester suppresses oxidative stress in 3T3-L1 adipocytes. Journal of Asian Natural Products Research. 2013;15(11):1189–96.

Yıldız M, Cicek E. İyonize radyasyonun Biyolojik Etkileri. Sendrom. 2005;17(3):89–93.

Yilmaz HR, Uz E, Yucel N, Altuntas I, Ozcelik N. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. J Biochem Mol Toxicol. 2004;18(4):234–8.

Zinellu A, Sotgia S, Caria MA, Tangianu F, Casu G, Deiana L, Carru C. Effect of acute exercise on low molecular weight thiols in plasma. Scand J Med Sci Sports. 2007;17(4):452–6.

11. ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Adana'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini aynı ilde tamamladı. Yüksek öğrenimini 2000-2005 yılları arasında Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü'nde tamamladı. 2005 yılında lisans eğitimini tamamladıktan sonra Başkent Üniversitesi Konya Eğitim ve Araştırma Merkezi' nde göreve başladı. 2009 yılında Konya Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D'de yüksek lisans eğitimine başladı. 2014 yılından itibaren Özel Büyükşehir Hastanesi'nde görevine devam eden Mehmet Atilla ZEYREK evlidir.