

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

84272

ADRIYAMİSİN KULLANILARAK SIÇAN BEYNİNDE
ORTAYA ÇIKARILAN NÖRAL OKSİDATİF HASARA MELATONİNİN
ETKİSİ

İlknur Özdemir

DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

MALATYA
1999

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANİZASYON MERKEZİ

**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ADRIYAMİSİN KULLANILARAK SIÇAN BEYNİNDE
ORTAYA ÇIKARILAN NÖRAL OKSİDATİF HASARA MELATONİNİN
ETKİSİ**

İlknur Özdemir

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

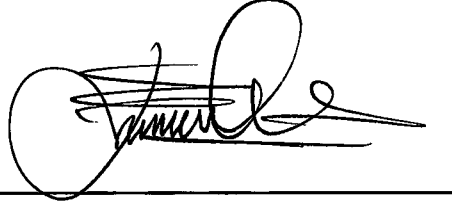
“ Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne”

İş bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Bülbin SUNAR AKBAŞAK



Üye : Prof. Dr. Engin GÖZÜKARA



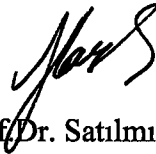
Üye : Prof. Dr. Yakup ALICIGÜZEL



Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

..26.../08.../ 1999



Prof. Dr. Satılmış Kaya
Enstitü Müdürü



Didem'e

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
1.1. Oksidatif Stres	1
1.2. Serbest Radikal Nedir?	1
1.3. Serbest Radikaller Nasıl Oluşur?	4
1.4. Serbest Oksijen Radikallerin <i>in-vivo</i> Oluşumu	6
1.5. Serbest Radikal Saldırılarının Hedefleri	7
1.5.1. Proteinler	7
1.5.2. Nükleik asitler	8
1.5.3. Lipidler	8
1.6. Lipid Peroksidasyonu Canlıda Serbest Radikallerin Kaynağıdır	10
1.6.1. Lipid Peroksidasyonunun Sonuçları	11
1.7. Antioksidan Savunma	17
1.8. Beyin	23
1.8.1. Ön beyin	23
1.8.2. Orta beyin	24
1.8.3. Beyin kökü	24
1.9. Beyinde Serbest Radikallerin Neden Olduğu Hasarın Sonuçları	24
1.10. NO' in Keşfi Ve Kullanımı	26
1.10.1. NO' in hazırlanması	26
1.10.2. NO' in fiziksel özellikleri	26
1.10.3. NO' in kimyasal özellikleri	26
1.10.4. NO' in diğer non-metaller ile reaksiyonu	28
1.10.5. NO' in koordinasyon kimyası	29
1.10.6. Toksikolojik açıdan önemli olan azot oksitleri	29
1.10.7. NO' in biyolojisi	29
1.10.8. Vücutta NO' in fonksiyonları	31
1.10.9. NO' in uzun süreli hafıza (long-term memory) üzerine etkisi	35
1.10.10. NO, beyin ve diğer organlar	35
1.10.11. NO metabolizması bozukluklarının neden olduğu hastalıklar	37
1.11. Nitrik Oksit Sentetaz (NOS) Enzimi	38
1.11.1 Nitrik oksit sentetaz (NOS)' in fonksiyonları	40

1.11.2. Nitrik oksit sentazın izoformları.....	40
1.12. NO ölçüm yöntemleri	44
1.13. Adriyamisin (doksorubisin)	45
1.14. Melatonin	50
1.14.1.Melatonin metabolizması.....	50
1.14.2. Melatoninin etkileri	52
1.15. Radyoaktiflik.....	56
1.15.1 Radyoaktif ışının doz birimleri.....	57
1.15.2. Radyoaktif diziler	57
1.15.3. Radyoizotopların kullanılması	57
1.15.4. Sintilasyon sayıcıları (sintillation counters).....	58
2. DENEYSEL BÖLÜM.....	59
2.1. Materyal ve Yöntem	59
2.1.1. Deneyleerde kullanılan kimyasal malzemeler	59
2.1.2. Materyal	59
2.1.3. Metod.....	60
2.2. Protein Tayini.....	61
2.3. Kolon Hazırlanışı.....	62
2.4. Standart NOS Ölçümü	63
2.4.1. Reaksiyon karışımlarının hazırlanışı	63
2.4.2. NOS' ın radyometrik ölçümü.....	64
2.4.2.1. A Reaksiyon karışımının ölçümü	64
2.4.2.2. B Reaksiyon karışımının ölçümü	65
2.5. İstatistik Hesaplamalar.....	65
3. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Lipid peroksidasyonu	9
Şekil 1.2. Serbest radikallerle hücre hasarının mekanizması	13
Şekil 1.3. Serbest radikaller ve biyomoleküller için savunma ve onarım sistemleri.	18
Şekil 1.4. Biyolojik antioksidan savunma sistemleri: Bütün aerobik hücreler kimyasal ve enzimatik antioksidan dağılımına sahiptir. Bunlar da oksidatif reaksiyonların hücre içinde sebep olduğu istenmeyen reaksiyonları minimum düzeye indirirler. (SOD : Süperoksit dismutaz, GSH: Redükte glutatyon, GSSG: Glutatyon disülfid).	20
Şekil 1.5. Nitrik oksit sentaz (NOS) ile L-arjininden NO sentezi.....	29
Şekil 1.6. Nitrik oksitin biyosentezi.....	39
Şekil 1.7. NOS izoenziminin polipeptid zincirindeki katalitik ve regülatör bölgeler. (PDŽ: Protein-protein etkileşimi için sorumlu bölge, M: ec-NOS izoenziminin myristoylation bölgesi).....	41
Şekil 1.8. Klinik kullanımda geçerli olan dört antrasiklinin yapısı .	45
Şekil 1.9. N-asetil-5-metoksitriptamin (Melatonin)	50
Şekil 1.10. Melatonin sentezi	51
Şekil 1.11. Melatonin tarafından serbest radikal tutuklanmasının tahmin edilen mekanizması .	54
Şekil 3.1. Adriyamisin (ADR), kontrol ve plasebo grupları arasındaki NOS aktivitesinin karşılaştırılması.	72
Şekil 3.2. Melatonin, kontrol ve plasebo grupları arasındaki NOS aktivitesinin karşılaştırılması.	73
Şekil 3.3. Adriyamisin (ADR) + Melatonin, kontrol ve plasebo grupları arasındaki NOS aktivitesinin karşılaştırılması.	74

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1. Serbest radikal reaksiyonları.....	2
Tablo 1.2. Reaktif Oksijen Türleri.....	3
Tablo 1.3. NO'in moleküler hedefleri.....	34
Tablo 1.4. Nitrik oksit sentazın inhibitörleri	43
Tablo 3.1. Sıçan beyin dokusunda NOS enzim aktivitesinin ADR 1. Gün (yüksek doz), ADR 6 gün (düşük doz), kontrol ve plasebo grupları arasındaki istatistiksel değerler.....	67
Tablo 3.2. Sıçan beyin dokusunda NOS enzim aktivitesinin Melatonin 1. Gün, Melatonin 6. Gün, kontrol ve plasebo grupları arasındaki istatistiksel değerler. ...	68
Tablo 3.3. Sıçan beyin dokusunda NOS enzim aktivitesinin ADR + Melatonin 1. Gün (yüksek doz), ADR + Melatonin 6. Gün (yüksek doz), ADR + Melatonin 6.gün düşük doz, kontrol ve plasebo grupları arasındaki istatistiksel değerler.....	69
Tablo 3.4. Sitrulin oluşum aktivitesinin nonspesifik NADP ⁺ oluşum (NArg) aktivitesinden çıkarıldıktan sonra IU olarak bulunan NOS değerleri.	70

SİMGELER VE KISALTMALAR

TocOH	: Tokoferol
EDRF	: Endotelyum bağımlı relaksing faktör
CGMP	: Siklik guanozin mono fosfat
GC	: Guanilat siklaz
NA	: Noradrenalin
CaM	: Kalmodulin
Hb	: Hemoglobin
EPR	: Elektron paramanyetik rezonans
ESR	: Elektron spin rezonans
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NO ⁺	: Nitrozonyum
L-NA	: N ^w -nitro-Larjinin
L-NMMA	: N ^w -metil-L-arjinin
L-NAME	: N ^w -nitro-L-arjinin metil ester
i-NOS	: İndüklenebilir NOS
nc-NOS	: Nöral NOS
ec-NOS	: Endotelial NOS
DMBA	: 7,12-dimetilbenzantrasen
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
CNS	: Santral nevroz sistem
ALA	: δ-aminolevulinik asit
CAT	: Katalaz
GSH	: Redükte glutatyon

GSSH	: Glutatyon disülfit
Ci	: Curie
Bq	: Becquerel
ADR	: Adriyamisin
NOS	: Nitrik oksit sentetaz
NO	: Nitrik oksit
DTT	: Dithiothreitol
EGTA	: Etilenglikol-bis (β - aminoetileter)-N, N,N ¹ , N ¹ - tetraasetik asit
BSA	: Bovine serum albumin
Hepes	: N- (2- hidroksietil) piperazin-N ¹ - (2- etansülfonik asit)
Pipes	: Piperazin – N, N ¹ - bis (2- etan sülfonik asit)
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
PMSF	: Fenil metan sülfonid florid
Narg	: N ^G - nitro -L – arjinin
O ₂ ^{•-}	: Süperoksit radikali
¹ O ₂	: Singlet oksijen
HO [•]	: Hidroksil radikali
ROO [•]	: Peroksil radikali
HOO [•]	: Perhidroksil radikali
SOD	: Süperoksit dismutaz
GPX	: Glutatyon peroksidaz
OA	: Oleanolik asit
UA	: Ursolik asit
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
FMN	: Flavinmononükleotid

FDN	: Flavin dinükleotid
FAD	: Flavin adenindinükleotid
ATP	: Adenozin trifosfat
PUFA	: Polidoymamış yağ asidi
MDA	: Malondialdehit
TBA	: Tiyobarbütirik asit
DHFR	: Dihidrofolat redüktaz
DHPR	: Dihidropiteridin redüktaz



ÖZET

Adriyamisin (ADR) başta katı tümörler olmak üzere kanser kemoterapisi alanında çok kullanılan kinoid antrasiklin antitümör ilaçları grubuna dahildir. Bununla beraber klinik kullanımı potansiyel hücre toksisitesi nedeniyle sınırlanmıştır. Bugüne kadar yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda ADR'nin sıçan merkezi sinir sistemi lipid peroksidasyonunun uyarılmasına yol açtığı gözlenmiştir. ADR nöral hücrelere ulaştığında sıçanlarda duyumsal nöropatiye neden olmaktadır. Serbest radikal saldırısından nöronlar özellikle etkilenir ve nöronların dejenerasyonu sözkonusu olur.

Antioksidan enzimler ADR' in uygulanışı sırasında azalır, dolayısıyla hücrelerde oksidatif hasar ortaya çıkar. *In vitro* oksidatif hasar süpürücüler verilirse beyin hücrelerinde lipid peroksidasyonundan kaynaklanan hasarın azaldığı görülür.

Melatoninin yaşlanma karşıtı etkisi, immün düzenleyici, onkostatik ve nöroendokrin etkileri gibi pek çok fizyolojik fonksiyonları vardır. Melatoninin beyinin elektriksel aktivitesini düzenlediği de bilinmektedir. Bunun yanısıra melatoninin en toksik radikal olan (OH) hidroksi radikaline karşı antioksidan etkisi olan lipofilik bir ajandır.

Son 10 yılda NO, fizyoloji ve nörobiyolojideki ilginç rollerinin ortaya çıkması ile yeniden gündeme gelmiştir. Nitrik oksit sentazın (NOS) L-arjinin ile reaksiyonu sonucu NO meydana gelir. NO guanilat siklazı aktive eder. Bu da vasodilasyon, hücre yapışması ve nörotransmisyonu neden olur. NOS' ın üç farklı izoformu izole edilmiş, klonlanmış ve tanımlanmıştır. NO' in hücrelere toksik etkisi vardır. Fakat hala hangi nitrojen oksitlerinin reaktif olduğu ve bunlardan hangisinin nitrosatin ürünlerini (NO, NO₂, N₂O₃, NO₂⁻, NO₃⁻, nitrozaminler, nitrotioller) taşımada, depolamada kullanıldığı bilinmemektedir. Bu nedenle çalışmamızda oksidatif hasar ve sitotoksik etkiyi

incelemek üzere nitrosatin ürünlerinin ortaya çıkmasında önemli rolü olan NOS enzimi üzerinde durulmuştur.

Çalışmamızın amacı, serbest radikal hasarını indükleyen adriyamisine karşı melatoninin koruyucu etkisini incelemektir. Bu çalışmada 62 adet erkek albüno wistar rat kullanılmış ve 10 deney grubu oluşturulmuştur. Gruplar; Kontrol, Plasebo, Adriyamisin 1. Gün, Adriyamisin 6. Gün (yüksek doz), Adriyamisin 6.Gün (düşük doz), Melatonin 1. Gün, Melatonin 6. Gün, Melatonin + Adriyamisin 1. Gün, Melatonin + Adriyamisin 6. Gün (düşük doz), Melatonin + Adriyamisin 6. Gün (yüksek doz) olarak belirlenmiştir. Oluşturulan bu gruplarda oksidatif stres enzimlerinden olan nNOS enzimi aktivitesi radyometrik olarak tayin edilmiştir. Çalışmamızda ADR ile indüklenen oksidatif hasarın melatonin suplementasyonu ile azalması halinde ilacın kemoterapik değerinin artırılabilceği görülmüştür.

ABSTRACT

Adriamicine (ADR), member of kinoid antitumor drug groups, is used for cancer chemotherapy especially for the solid tumors. However its clinical use is not at large, because of the potential cell toxicity. *In vivo* and *in vitro* studies showed that ADR causes lipid peroxidation on the central nervous system of a rat when ADR reaches neural cells, it causes neuropathic sensitivity in rats.

The neuron is readily attacked by free radical attack and this results in degeneration of the neurons. The level of antioxidative enzymes decreases when ADR is applied, therefore the oxidative cell destruction occurs. When *in vitro* oxidative radical scavenger is applied, it is seen that the damage in brain due to the lipid peroxidation decreases. Melatonin has many potential physiological functionalities, such as, the effect against aging, immunologic regulator, oncostatic and neuroendocrine effect. It has been known that melatonin has regulatory effect on the electrical activity of the brain. Furthermore, melatonin is being a lipophilic agent against $\cdot\text{OH}$ radical, that is known to be very toxic, has an antioxidative effect.

For the last 10 years, NO is attracting much attention of many researchers, due to the role of NO in physiology and neurobiology showed unexpected behaviour. When nitric oxide synthase reacts with L-arginine NO is formed as a main product. NO activates guanylate cyclase formation and this results in vasodilation, cell adhesion and neurotransmission. Three different forms of NOS have been isolated, cloned and identified. Although it is known that NO has a toxic effect on cells, it has not been stated that which one of the reactive nitrogen oxide species is responsible for transporting, storing of nitrosamine products (NO , NO_2 , N_2O_3 , NO_2^- , NO_3^- , nitrosamines, nitrothiols). For this reason the object of this study was forwarded to the oxidative damage and the

cytological effect of NOS enzymes that is responsible for the appearance of nitrosatine products.

The aim of this work is to study the preventive effect of melatonin against adriamycin that induces free radical damage. In this study, 62 albino wistar male rat were used and 10 experimental groups were formed. The sub groups has chosen to be; the control, placebo, ADR first day, ADR 6th day (high dosage), ADR 6th day (low dosage), Melatonin first day, Melatonin 6th day, Melatonin + ADR the first day, Melatonin 6th day (low dosage) , Melatonin + ADR 6th day (high dosage). The enzymatic activity of nNOS, one of the stress enzymes, is determined by radiometry.

As a result of this study, it has been found that the chemotherapeutic effect of the drug would be increased, if oxidative damage induced with ADR decreases with melatonin supplementation.

TEŞEKKÜR

Tez konusunu öneren ve çalışmalarımı yapabilmem için büyük bir özveri ile tüm imkanlarını seferber eden, değerli bilgi ve önerileri ile çalışmalarına ışık tutan, desteği ile bana güç ve moral veren, çok büyük yardım ve ilgilerini gördüğüm tez danışman hocam Prof. Dr. Bülbin Sunar Akbaşak' a teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Ayrıca çalışmam boyunca yakın desteklerini gördüğüm değerli hocalarım Prof. Dr. Yakup Alıcıgüzel'e, Yrd. Doç. Dr. Ayhan Koçak'a , Doç. Dr. Muhittin Yüreklî'ye ve Yrd.Doç.Dr. Gülsen Güneş'e sonsuz teşekkürlerimi arz ederim.

Tüm çalışmalarım boyunca desteğini gördüğüm Kimya Bölüm Başkanlığına, Hocalarıma, Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma ve deneysel çalışmalarımın bir bölümünü yapmış olduğum Biyoloji bölümü laboratuvarlarında bana çalışma olanağı sağlayan Biyoloji bölümü hocalarına ve tüm elemanlarına, Tıbbi Biyoloji Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bugüne gelmemde büyük emekleri olan sevgili aileme, çalışmam sırasında gerek duyduğum hertürlü yardımı büyük bir anlayış ve sabırla yapmış olan eşim Yrd. Doç. Dr. İsmail Özdemir'e teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

1.1. Oksidatif Stres

“Oksidatif Stres” prooksidanların lehinde prooksidant-antioksidant dengesindeki düzensizlikten meydana gelir.

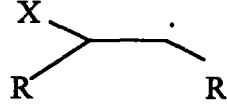
Sağlıklı insan metabolizmasında bile serbest radikaller yapılır ve buna zaten ihtiyaç vardır. Şaşılacak olan şey, bu aktif hasara sebep olan türlerin metabolizmaya çok çeşitli faydalarının da olmasıdır. Son çalışmaların ilginç yanı oksijen serbest radikallerinin uyarıcı ve sinyal moleküllerin kontrolündeki ara metabolizmalarda ortaya çıktığının bulunmasıdır. Sağlıklı bir insanın birçok hücre tipinde oksidatif bir yarış olduğu düşünülmüştür, fakat bu yalnız başına bir oksidatif stresi oluşturamaz. O halde oksidatif stres prooksidant-antioksidant dengesindeki, potansiyel hasara yol açan bir dengesizlik olarak tanımlanabilir.¹

Aerobik yaşamın normal bir tarzı olarak çok çeşitli organik bileşiklerdeki (DNA, proteinler, karbonhidratlar, lipidler) yapısal hasar, oksidatif reaksiyonların bir sonucu olarak meydana gelebilir.²

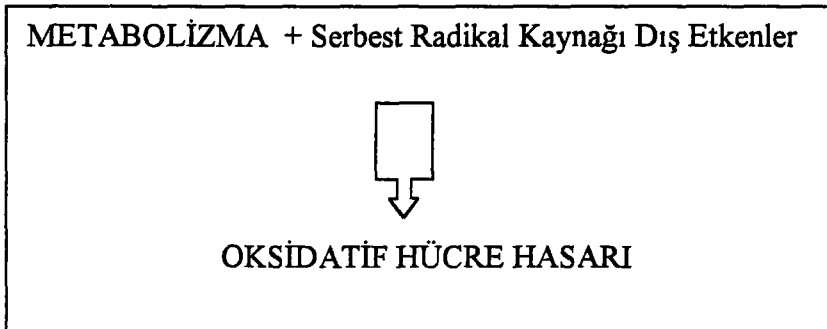
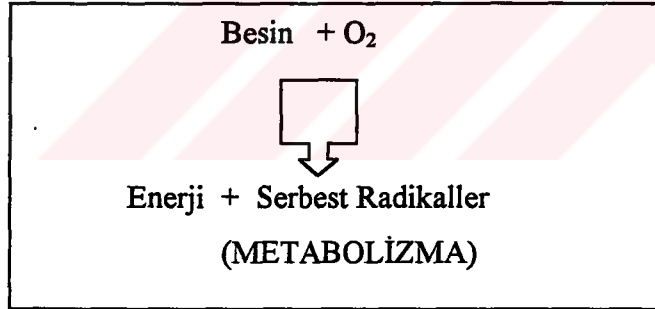
1.2 Serbest Radikal Nedir?

Serbest radikaller dış orbitalleri üzerinde bir tane eşleşmemiş elektrona sahip olan atom veya moleküllerdir. Serbest radikaller çok kararsızdır ve elektron almak veya vermek suretiyle diğer moleküllerle reaksiyona girebilir.³ Radikallerin 5 temel karakteristik reaksiyonları vardır (Tablo 1.1).

Tablo 1.1. Serbest radikal reaksiyonları.

Hidrojen ayrılması	$H^{\cdot} + RH \rightarrow AH + R^{\cdot}$
Elektron transferi	$X^{\cdot} + Y \rightarrow X + Y^{\cdot}$
Katılma	$X^{\cdot} + RCH=CHR \rightarrow$ 
Terminasyon	$A^{\cdot} + A^{\cdot} \rightarrow A_2$
Disproporsiyon	$CH_3CH_2^{\cdot} + CH_3CH_2^{\cdot} \rightarrow CH_3CH_3 + CH_2=CH_2$

DNA, protein ve lipidler dahil biyolojik molekülleri kapsayan bu reaksiyonların aerobik çevrenin bir sonucu olarak sürekli meydana geldiği görülür.⁴



Canlılar için oksijenin önemi iki temel fonksiyona sahip olmasından kaynaklanır. Bunlardan birincisi oksijenin yapısal bir molekül olup, canlı organizmaları oluşturan moleküllerin yapısına katılması ve besin kaynağı olan maddelerin yapısındaki ana elementlerden biri olmasıdır. İkinci temel görevi ise fonksiyonel nitelikte olup, bu görev oksijenin canlılarda meydana gelen oksidasyon tepkimeleri ile solunum sisteminde rol almasıdır. Anaerobik canlılar da dahil olmak üzere tüm canlıda toksik etkili olan, doğrudan doğruya moleküler oksijen değil, oksijenin tam olmayan indirgenmesi sonucu oluşan oksijen radikalleridir. Bu radikaller biyolojik sistemlerin tanıdıkları en reaktif ve toksik maddeler olup oksijenin toksik etkisinin gerçek nedenidirler.⁵

Tablo 1.2. Reaktif Oksijen Türleri.⁶

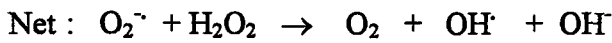
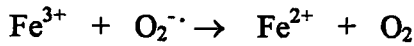
Süperoksit radikali	$\rightarrow O_2^{\cdot -}$
Hidroksil radikali	$\rightarrow \cdot OH$
Peroksil radikali	$\rightarrow ROO\cdot$
Singlet oksijen	$\rightarrow {}^1O_2$
Perhidroksil radikali	$\rightarrow HOO\cdot$
Ferryl hem protein radikali	$\rightarrow \cdot X-[Fe^{(IV)}=O]$
Nitrik oksit	$\rightarrow NO\cdot$
Hidrojen peroksit	$\rightarrow H_2O_2$

1.3. Serbest Radikaller Nasıl Oluşur?

Serbest radikaller vücutta devamlı olarak üretilirler. Örneğin:

- Çoğukez, normal hücre metabolizmasının bir parçası olarak meydana gelen, oksijen kullanan biyokimyasal redoks reaksiyonlarından,
- Fagositle, inflamasyon reaksiyonunun kontrolünün bir parçası olarak,
- Bazen de radyasyon iyonizasyonuna, UV ışığa, çevre kirliliğine, sigara dumanına, hiperoksiye dayanan, fazla egzersiz ve de iskemiye maruz bırakıldığında dokularda oluşan tepkiler sonucu ortaya çıkarlar.⁷

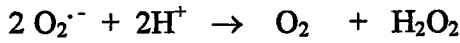
Serbest radikallerin üretiminde geçiş metal iyonları çok önemlidir. Toksik radikal reaksiyonlarının çoğunun üremesi ve oluşumu için temel, bu iyonların göç eden elektronlara karşı ilgi göstermesidir. Örneğin süperoksit anyonu, sulu çözeltisinde nisbeten reaktif değildir. Bununla birlikte demir gibi bir geçiş metali ve hidrojen peroksitin varlığında aşırı derecede reaktif hidroksil radikali meydana getirir. Bu yol, demir katalizleyen Haber-Weiss reaksiyonu olarak bilinir.^{3-5,8,9}



Süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ve hidroksil (OH^{\cdot}) radikalleri çok reaktiflerdir. Hücre hasarına veya ölümüne neden olabilirler.⁷ Süperoksit radikalinin birçok biyolojik reaksiyon esnasında üretildiği saptanmıştır. Aşırı reaktif oluşu nedeni ile direk toksik etkisi yanında çeşitli organik bileşiklerle etkileşimi sonucu hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) ve aşırı reaktif hidroksil radikali (OH^{\cdot}) gibi toksik etkisi bulunan diğer oksidan ajanlara

dönüşerek, dolaylı yoldan da toksik etki gösterebilir. Süperoksit radikal anyonunun moleküler oksijene ve daha az toksik olan hidrojen peroksit'e dismutasyonunu katalizleyen süperoksit dismutaz (SOD) enzimi oksijeni metabolize eden hücrelerde geniş bir dağılıma sahiptir, ve canlı hücreleri bu radikalın toksik etkisinden korur.¹⁰

Bu radikal NADPH oksidaz (fagositoz), mitokondriyal sitokrom oksidaz (hücre solunumu), karaciğer sitokrom P-450 (ksenobiyotiklerin oksidatif metabolizması) ve ksantin oksidaz (iskemi reperfüzyon) ile enzimatik olarak üretilir. Proton varlığında $O_2^{\cdot-}$ 'in dismutasyonu oksijen ve H_2O_2 'i oluşturur.



Hidroksil radikali (OH^{\cdot}) oksijen radikallerinin en reaktif ve toksik etkili olanıdır. $O_2^{\cdot-}$ 'den birkaç kez reaktiftir ve kolaylıkla yeni serbest radikallerin oluşumuna yol açar. Hidroksil radikalleri fenton reaksiyonuna göre OH^{\cdot} , $^{\cdot}OH$ ile sonuçlanan $Fe(II)$ iyonları varlığında hidrojen peroksitten oluşabilir.



Hidrojen peroksit bir serbest radikal değildir. Ama yukarıda gösterilen reaksiyonda önemli bir yükseltgeme gücüne sahiptir. H_2O_2 , $^{\cdot}OH$ serbest radikallerinin oluşumuyla sonuçlanan fenton reaksiyonuyla hücrel hasara yol açabilir ve biyolojik membranları çaprazlayabilir.

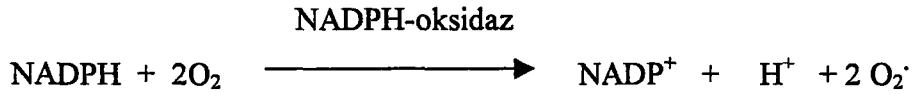
Peroksil (ROO^{\cdot}) ve alkoksil (RO^{\cdot}) serbest radikalleride esasen poli doymamış yağ asitlerinden ya direk ve kontrollü bir şekilde ya da indirek ve kontrolsüz bir şekilde sentezlenir.^{3,8}

1.4. Serbest Oksijen Radikallerin *in-vivo* Oluşumu

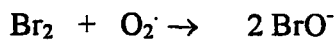
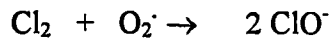
Yakın geçmişte serbest oksijen radikallerinin birkaç özel hücre tarafından oluşturulduğu zannedilirdi. Beyaz küreler , organizmada normal yollardan oluşan yabancı maddelerin parçalanmasında kullanmak için serbest radikaller oluştururlar. Mitokondri iç membranında elektron transfer zinciri reaksiyonlarında küçük kantitede serbest oksijen radikalleri oluşturduğu gözlenmiştir. Hemogloblin (Hb) tarafından O₂ transportu, serbest radikallerin oluşmasına sebep olur.

O₂ içeren bütün reaksiyonlar normalde sınırlı olarak serbest oksijen radikali oluşumuna yol açarlar. Bu oksijen radikallerinden yeniden O₂ oluşumundan sorumlu mekanizmalar vardır. Patalojik durumlarda, bu mekanizmalar aşılır ve bütün kontroller dışında O₂ oluşur.

Serbest oksijen radikalleri oluşturan spezialize hücreler fagositer hücrelerdir, yani polinükleer lökositler ve makrofajlardır. Süperoksit formasyonu bu hücrelerin plazma membranında bulunan enzimatik bir sistem tarafından gerçekleşir.



Süperoksit oluşumunun başlaması ile beraber bu fagositer hücrelerin fazla miktarda O₂ kullandığı ortaya çıkar. Buna *solumumsal patlama* denir. Bir kısmı membranda bulunan halojenlerle reaksiyona girerek tansforme olur.



Bu oksitler yabancı maddeleri degrade etmede O_2^- 'den veya Cl_2^- 'den daha aktiftirler.

Fogasit hücrelerin dışında farklı oranlarda bütün hücreler elektron transport zinciri esnasında O_2^- oluştururlar. Çeşitli flavoproteinler ve metaloproteinler bu radikalleri libere eder gibi görünmektedir. Mitokondri elektron transport zincirinde NADH koenzim Q redüktaz, koenzim Q, Sitokrom C redüktaz ve sitokrom C oksidaz süperoksit iyonu bırakabilirler ve bunlardan H_2O_2 oluşur.

Hücre nükleusunda NADPH bağımlı FAD monoksijenaz veya NADPH sitokrom C redüktaz gibi bazı oksijenasyon sistemleri ve mikrozoamlarda sitokrom P450 sistemi O_2^- ve H_2O_2 oluşturmaya muktedirler.¹¹

1.5. Serbest Radikal Saldırıların Hedefleri

Serbest radikal saldırılarının hedefleri üç grupta toplanır. Bunlar: Proteinler, nükleik asitler ve lipidlerdir.

1.5.1. Proteinler

Serbest oksijen radikalleri tarafından bir proteinin modifikasyonu, o proteinin karakteristik yapısına bağlıdır. Proteinlerde, serbest radikaller üç grupta sınıflandırılabilen yapısal değişikliklere sebep olurlar. Bunlar:

- 1- Aminoasitlerin modifikasyonu,
- 2- Proteinlerin fragmentasyonu,
- 3- Proteinlerin çapraz bağlanması veya agregasyonu.

Aromatik aminoasitlerden triptofan, triozin ve fenilalanin oksidatif saldırılara en çok duyarlı olanlardır. Çünkü doymamış yapıya sahiptirler. Serbest oksijen radikallerinin saldırısına duyarlı olan diğer amino asitler sülfür içeren sistein ve sistin

aminoasitleridir. Serbest radikal partiküllerinin yapısı ve proteinin hücredeki yeri meydana gelen protein hasarının derecesini tayin edecektir.

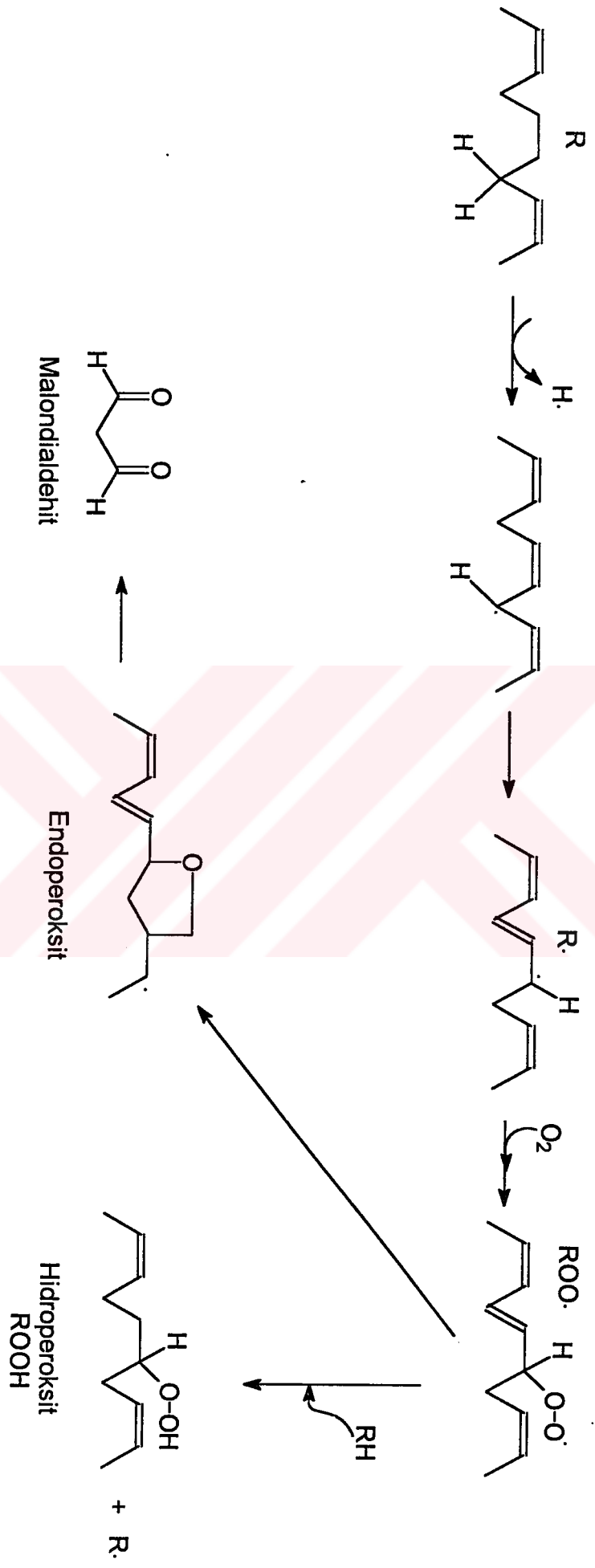
1.5.2. Nükleik asitler

DNA molekülleri çekirdekle bölmelere ayrılmıştır ve sıkıca bağlı bir helikste sıralanmıştır. Şöyleki, serbest radikallerle teması mümkün olduğu kadar azaltılmıştır. İlaveten DNA moleküllerin çoğu histonlar tarafından korunur ve hasar meydana gelirse etkili DNA onarım enzim sistemleri tarafından onarılabilir. Hernekadar DNA'nın serbest radikallere maruz kalma ihtimalinin az olduğu ifade edilirse de DNA'nın organik komponentleri hidroksil radikal saldırısına hassastır. Primidinler özellikle duyarlıdır, bunu purinler ve deoksiriboz kısımları takip eder. Süperoksit radikalının DNA ipliklerindeki kırılmaları başlatmada alakalı olduğu varsayılmıştır. Temel nükleik asit modifikasyonları ve şeker-fosfat iskeleti ile serbest radikal reaksiyonları sonucunda meydana gelen çift iplikli DNA'daki iplik bölünmesi, gen ekspresyonunda sapma veya kromozomal delesyonlarla hücre ölümüne neden olabilir.

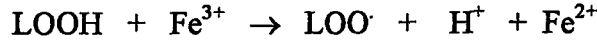
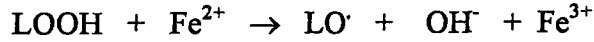
1.5.3. Lipidler

Membran kolestorolünün ve serbest yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girebilir ve peroksidasyona uğrayabilirler. Herbir lipid peroksidi başlatılır başlatılmaz aynı zamanda bir serbest radikaldir. Peroksidasyon işlemi otokatalitik hale gelebilir ve herbir lipid peroksiti ilave lipid peroksiti oluşturmak üzere komşu bir yağ asidine saldırır.¹²

Lipid hidroperoksitler, demir ve bakır gibi geçiş metallerinin varlığında özellikle kararsızdırlar. Lipid peroksil radikalleri ve lipid alkoksit radikallerine bozunurlar.



Şekil 1.1. Lipid peroksidasyonu¹³



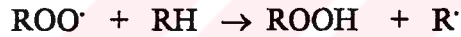
1.6. Lipid Peroksidasyonu Canlıda Serbest Radikallerin Kaynağıdır

Lipid peroksidasyonu , hücre hasarına dolaylı olarak neden olan serbest radikallerde önemli bir mekanizmadır. Lipid peroksidasyonu bir zincir reaksiyonu olup daha ileri peroksidasyonu başlatan serbest radikaller için devamlı bir kaynak sağlar. Tüm olay aşağıdaki şekilde gösterilir.

1- Başlama: Bir ön maddeden R' 'nin oluşumu



2- İlerleme: R' + O₂ → ROO'



3- Sonlanma: ROO' + ROO' → ROOR + O₂



Lipid hidroperoksit yıkımı iki nedenle önemlidir:

- a) Lipid peroksidasyonunu başlatan maddeler oluşturur.
- b) Birçoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler gibi radikal olmayan fragmentler oluşur.

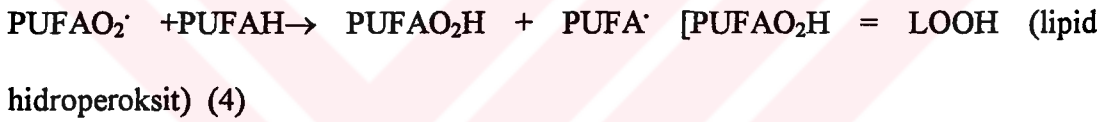
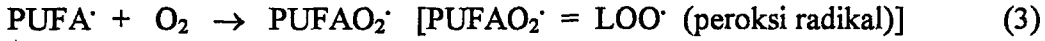
Lipid peroksidasyonuna karşı çok spesifik savunmalar vardır. Bu savunmalar;

- i) Üreyen radikallerin meydana gelmesini engelleyerek lipid hidroperoksitin yıkımının önlenmesi
- ii) Lipid peroksidasyon reaksiyonunun zincirlerini taşıyan serbest radikallerin

süprülmesini içerir.¹⁴

Oksidatif indirgenme, depolimerizasyon tepkimeleri olarak tanımlanan bir dizi tepkime ile reaktif oksijen metabolitleri hiyaluronik asidi parçalamaktadır. Hiyaluronik asit ve kollajenin yıkımı, yaşayan dokuların yapısal özellikleri ile membran geçirgenliklerini belirgin olarak değiştirmektedir.

Memeli hücre membranları peroksidatif hasara karşı çok duyarlı olan büyük miktarda polidoymamış yağ asiti (PUFA) içermektedir. Bu yağ asitlerinin peroksidasyonu en çok araştırılan radikal tepkimeleri arasında yer almaktadır.



Yağ asidi ile birleşen radikal, yukardaki tepkimeler dizisini başlatmaktadır (2). Radikal yağ asidinin oksijenle birleşmesi sonucu lipid peroksi radikali (ROO \cdot) oluşmaktadır (3). Lipid peroksit radikalleri, başka yağ asidinin yan zincirleri ile tepkimeye girerek lipid hidroksi peroksitleri meydana getirmektedir (4). Metal iyonları varlığında bu peroksit ürünleri bazı enzimatik tepkimeler ile etan, pentan, malondialdehit benzeri yıkım ürünlerinin yanısıra kemilüminesans ve floresans veren bileşikler oluşturmaktadırlar (5).

1.6.1. Lipid Peroksidasyonunun Sonuçları

- Polidoymamış yağ asitlerinin kaybı,
- Lipid akışkanlığında azalma,
- Membran permabilitesinde değişme,

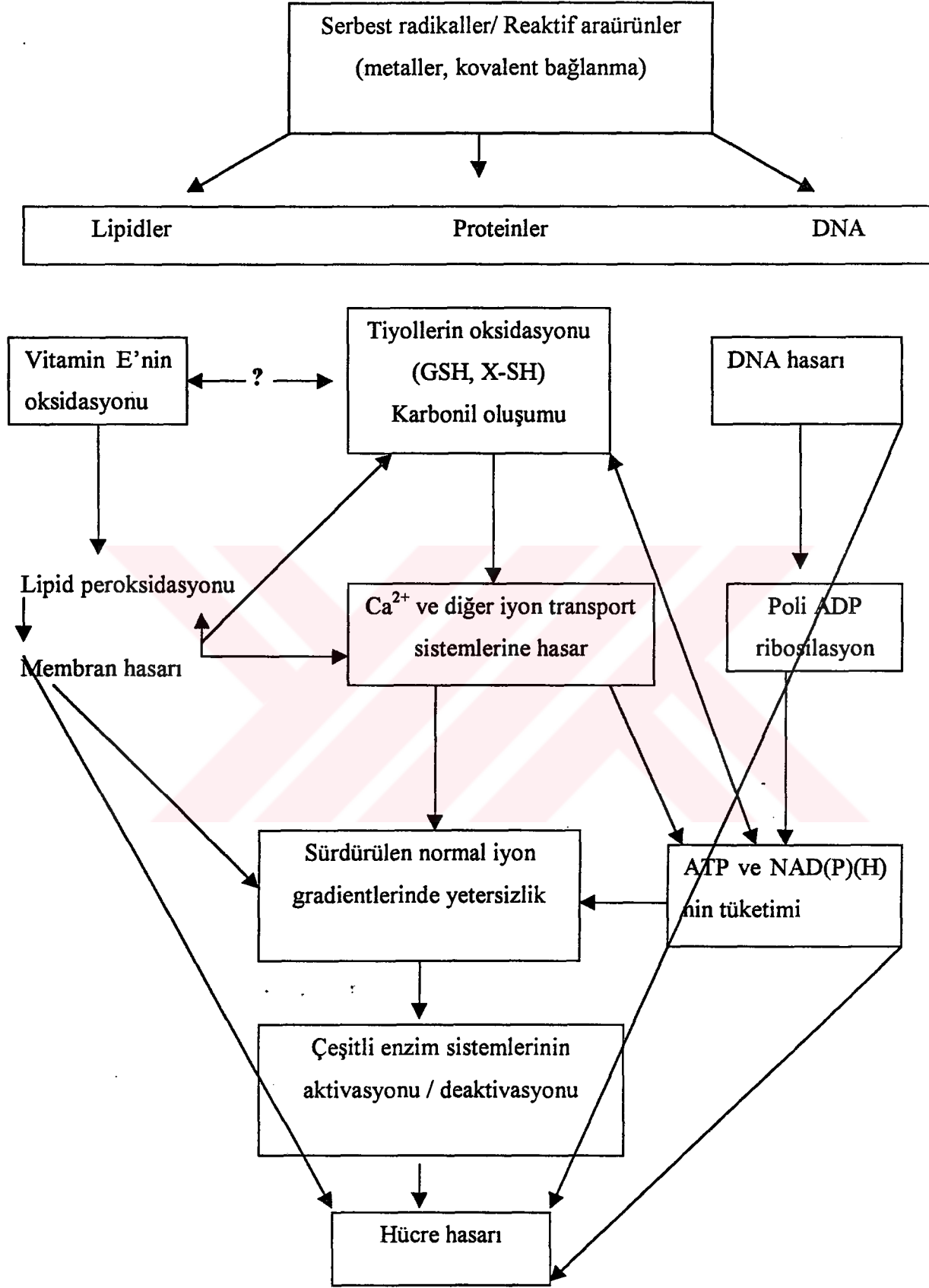
- Memran ilişkili enzimler üzerindeki etkileri,
- İyon transportunda değişme,
- Lipid hidroperoksitlerinin sitotoksik metabolitlerinin jenerasyonu,
- Subseluler bölümlerden materyallerin serbest bırakılması.

Lipid peroksidasyonu ve kükürt içeren proteinlerin oksidasyonu sonucu membran geçirgenliği ve kırılabilirliğinin artmasına bağlı olarak membran enzimlerinin aktivitesi azalmakta ve hücreye Ca^{2+} girişi artmaktadır. Hücre içi serbest Ca^{2+} miktarının artması, fosfolipaz aktivitesi ile fosfolipid kaybında artış, membran geçirgenliğinde değişiklik ve potansiyel kaybına bağlı toksik etkinin çoğalması, proteaz aktivasyonu ile proteolitik etkinin şiddetlenmesi, katabolik enzimlerin aktivitesinde artışa ve endonükleaz aktivitesi ile DNA kırılmalarının oluşumu gibi pek çok hasar yapıcı olayı başlatmaktadırlar.^{6,8}

Hasarlı dokularda lipid peroksidasyonu sağlıklı olanlardan daha hızlı ilerler. Bu dokularda peroksidasyona yatkınlıktaki artış antioksidanların inaktivasyonunun ve metal iyonlarının hücre içinden serbestleşmesinin sonucudur. Metal iyonları lipid peroksitlerin sitotoksik ürünlere dekompozisyonunu kolaylaştırır.¹⁵

Yaşlanma, kas distrofileri, dejeneratif hastalıklar, yanıklar, akciğer hastalıkları, karsinogenez, diabet, ateroskleroz ve katarakt oluşumunda serbest radikallerin ve lipid peroksidasyonunun etkisi çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır.^{15,16}

Lipid peroksidasyonunun dekompozisyon ürünü olan MDA, hücre ve dokulardaki oksidatif hasarın bir indikatörü gibidir.¹⁷ Doğal malondialdehit (MDA) bileşiği, prostoglandin ve tromboksan biyosentezinin bir yan ürünü gibi memeli dokularda önemli miktarda üretilir. Mevcut analitik teknikler MDA-TBA katılma ürünü veren tiyobarbütirik asit (TBA) ile reaksiyonu üzerine kurulmuştur ki spektrofotometri, florometri ve yüksek basınç sıvı kromatografisi ile tayin edilebilir.^{16,18-22}



Şekil 1.2. Serbest radikallerle hücre hasarının mekanizması⁴

Dokuda paraquat, adriyamisin, etanol, alloksan, asetaminofen ve karbontetraklorür gibi madde ve ilaçların toksik etkisinin oluşmasından serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu sorumlu tutulmuştur.^{15,23} Serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu sonucu vucutta oluşan çeşitli ürünler, lipidler, karbohidratlar, proteinler ve DNA gibi biyolojik molekülleri etkileyerek membran hasarına, protein denatürasyonuna, enzim inaktivasyonuna, DNA sarmal kırıklıklarına ve baz modifikasyonuna neden olabilmekte, oluşan bu değişiklikler de birçok patolojik olayla sonuçlanabilmektedir.²⁴ Çeşitli hastalıkların pathogenesisinde ve çeşitli kimyasalların toksisitesinde serbest radikallerin rolü çeşitli çalışmalarda araştırılmıştır. Serbest radikallere bağlı olarak ortaya çıkan klinik pozisyonlar aşağıda belirtilmiştir.

Serbest radikallere bağlı olarak ortaya çıkan klinik pozisyonlar:

1) İnflamatuvar-immün bozukluklar

- Glomerülonefritler
- Vaskülitler (Hepatit B virüsü)
- Otoimmün hastalıklar
- Romatoid artritler

2) İskemi

- Konjesyon / Miyokard infarksiyonu
- Organ nakli

3) İlaç ve toksinlerin indüksiyon reaksiyonları

4) Demir Sürşarjı

- İdiyopatik hemokromatozis
- Talasemi ve diğer kronik anemiler
- Beslenme yetersizliği

5) Alkolizm**6) Radyasyon Hasarı****7) Yaşlanma**

- Erken yaşlanma bozuklukları

8) Kırmızı küreler

- Fenilhidrazin
- Primaquine, ilgili ilaçlar
- Kurşun zehirlenmesi
- Protoporfirin foto-oksidasyon
- Malaria
- Orak hücreli anemi
- Favizm
- Anemi Fanconi

9) Akciğer

- Sigara içme etkisi
- Amfizem
- Hiperoksi
- Bronkopülmonerdisplazisi
- Hava kirliliği oksidanları (O₃)
- ADRS
- Mineral tozu pnömokonyozisi
- Bleomycin toksisitesi
- SO₂ Toksisitesi

10) Kalp ve Kardiyovasküler Sistem

- Alkol kardiyomiyopatisi

- Aterosklerozis
- Adriyamisin kardiyotoksitesisi

11) Böbrek

- Otoimmün nefrotik sendromları
- Aminoglikozid nefrotoksitesisi
- Eser element nefrotoksitesisi

12) Gastrointestinal traktus

- KC endotoksin bozuklukları
- KC hidrokarbon halojen bozuklukları
- Alloksanın diyabetojenik etkisi
- FFA pankreatit indüksiyonu
- Oral demir zehirlenmesi

13) Beyin

- Hiperbarik oksijen
- Vitamin E yetmezliği
- Nörotoksinler
- Parkinson hastalığı
- Hipertansif serebrovasküler bozukluklar
- Nöronalseroid lipofusinozis
- Allerjik ansefalamiyelitis ve diğer demiyelizasyon bozuklukları
- Alüminyum sürşarjı
- Travma

14) Göz

- Katarakt
- Oküler hemoraji

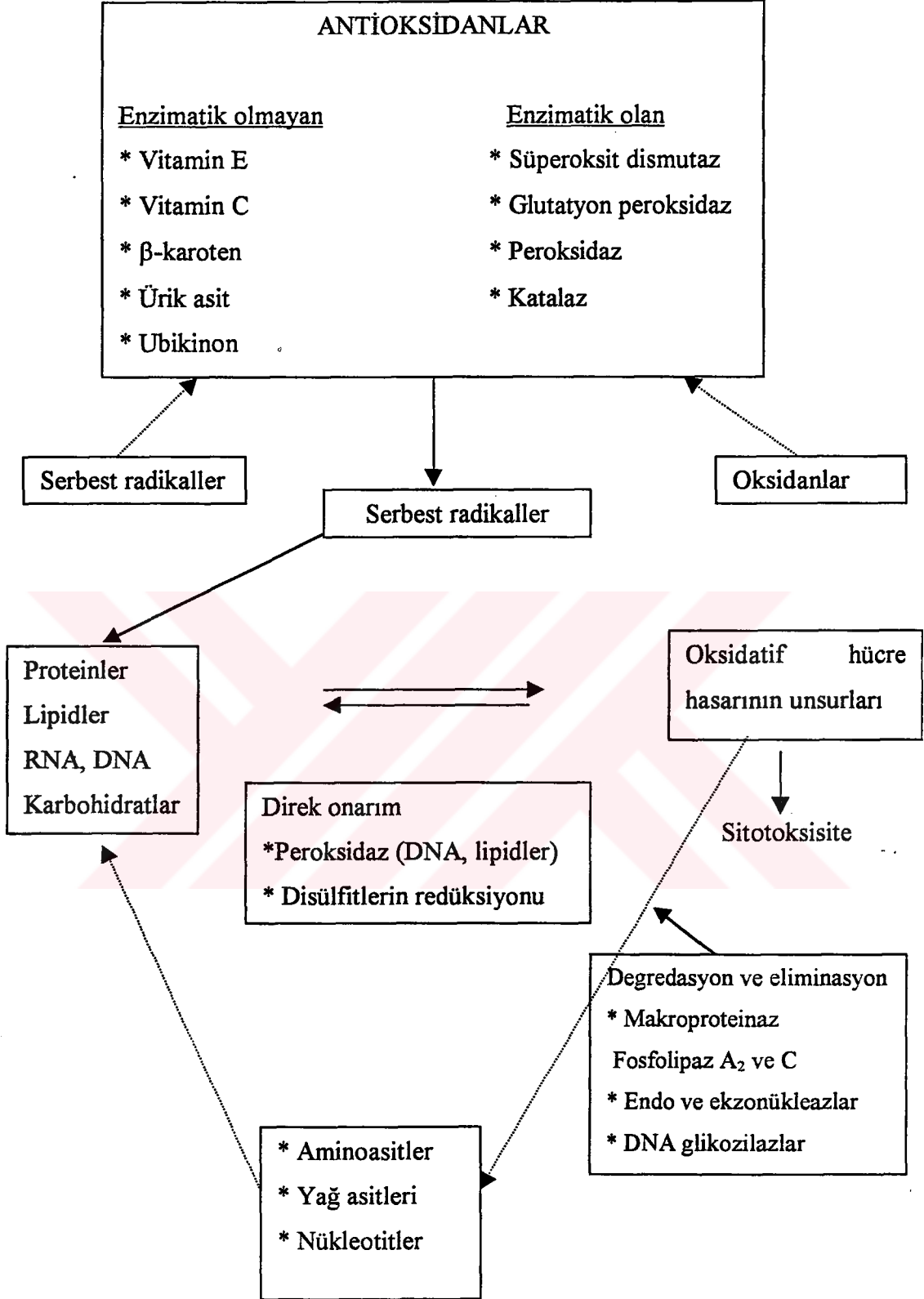
- Dejeneratif retinal hasarlar
- Prematür retinopati
- Fotik retinopati

15) Deri

- Güneş ışınları
- Isı bozuklukları
- Porfiran
- Hypericin, diğer fotosensitizerler
- Kontrakt dermatitis^{4,11,25}

1.7. Antioksidan Savunma

Antioksidanlar serbest radikallere karşı savunma sağlayan küçük moleküller ve enzimlerden oluşurlar. Bunlar, dokuda serbest radikalleri çeşitli biyomoleküller üzerinde hasar oluşturmadan yok eden veya oksidatif hasarın yayılmasını engelleyen maddelerdir.²⁴



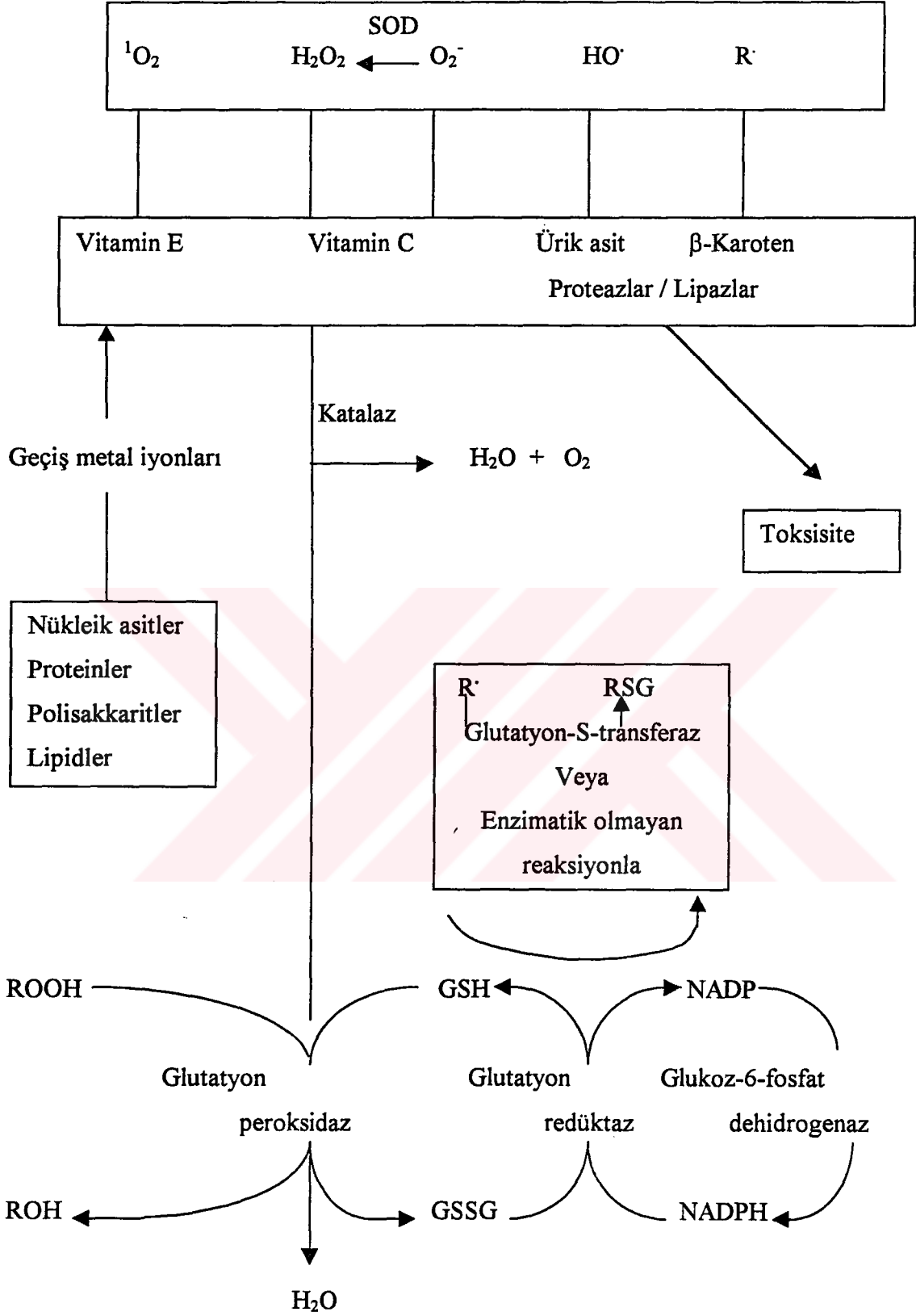
Şekil 1.3. Serbest radikaller ve biyomeküller için savunma ve onarım sistemleri.³

Antioksidanlar dört farklı mekanizma ile oksidanları inaktif hale getirirler.

Bunlar:

- 1- Temizleme etkisi: Oksidanları tutma ve zayıf moleküle dönüştürme şeklinde gerçekleştirilen bu etki, enzimler tarafından gerçekleştirilmektedir.
- 2- Baskılama etkisi: Oksidana bir hidrojen aktararak etkisiz hale getiren vitaminler ve flavonoidler bu şekilde etki etmektedirler.
- 3- Onarma etkisi: Biyomoleküllerdeki hasarı başlangıç safhasında onarmaktadırlar.
- 4- Zincir koparma etkisi: Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını önleyen ağır metaller, hemoglobin, seruplazmin, E vitamini bu yolla etkili olmaktadır.⁸





Şekil 1.4. Biyolojik antioksidan savunma sistemleri: Bütün aerobik hücreler kimyasal ve enzimatik antioksidan dağılımına sahiptir. Bunlar da oksidatif reaksiyonların hücre

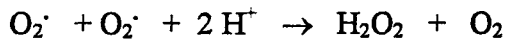
içinde sebep olduğu istenmeyen reaksiyonları minimum düzeye indirirler. (SOD : Süperoksit dismutaz, GSH: Redükte glutatyon, GSSG: Glutatyon disülfid).⁴

Serbest radikallerin etkisinden dokuyu koruyan antioksidan sistemdir. Antioksidan sistemi oluşturan antioksidanlar üç gruba ayrılır.

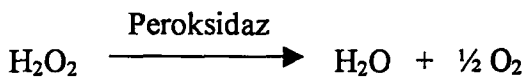
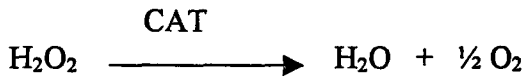
- i) Primer antioksidanlar,
- ii) Sekonder antioksidanlar,
- iii) Tersiyer antioksidanlar

i)Primer antioksidanlar: Primer antioksidanlar yeni serbest radikal türlerin oluşumunu engelleyerek görev yaparlar. Diğer moleküllerden serbest radikallerin oluşumunu engeller veya var olan serbest radikalleri daha az zararlı moleküllere çevirmeyi başarırlar. Hücreyi reaktif oksijen ürünlerinin oluşturduğu hasara karşı koruyan en önemli üç antioksidan enzim, SOD, GPX ve CAT'dır.

Süperoksit dismutaz (SOD): Süperoksit radikal anyonunun moleküler oksijene ve daha az toksik olan hidrojen peroksite dismutasyonunu katalizleyen SOD enzimidir. Oksijeni metabolize eden hücrelerde iki tip SOD bulur. Bunlardan biri bakır ve çinko içeren, siyanide dirençli olan ve hücre sitozolünde bulunan CuZn-SOD, diğeri ise mangan içeren, siyanide duyarlı olan ve hücre mitokondrisinde bulunan Mn-SOD'dır.^{7,10,11,26,27}



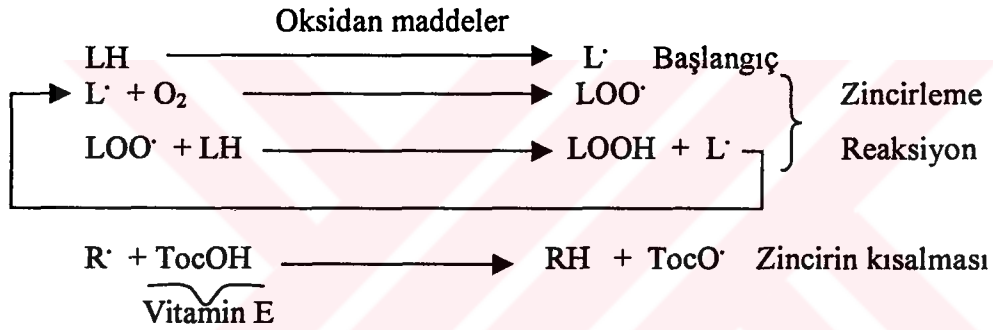
Katalaz (CAT) ve Glutatyon peroksidaz (GPX): İntraselüler çevreden H_2O_2 'yi H_2O ve O_2 'ye indirgeyerek uzaklaştırır.



Metal bağlayıcı proteinler (ferritin, seruplasmin): $\cdot\text{OH}$ radikallerinin oluşumu için gerekli Fe^{2+} 'nin mevcudiyetini sınırlar.

ii) **Sekonder antioksidanlar:** Zincir reaksiyonlarını durduran radikaller sekonder antioksidanlardır. Örneğin Vitamin E (α -tokoferol), vitamin C (askorbat), β -karoten, urik asit, bilirubin ve almumin.

Örneğin, E vitamini oksitlenebilmesi sayesinde "antioksidan" olarak etki eder, yani aşırı doymamış maddelerin kendiliğinden oksidasyonunu ve özellikle membran lipidlerinde bulunan yüksek oranda doymamış yağ asitlerinin peroksit oluşturmasını engeller.^{7, 30-33}



LH → Lipid

$\text{L}\cdot$ → Lipid radikali

$\text{LOO}\cdot$ → Lipid peroksit radikali

LOOH → Lipid peroksit

$\text{R}\cdot = \text{L}\cdot$ veya $\text{LOO}\cdot$

TocOH → Tokoferol (Vit. E)

$\text{TocO}\cdot$ → Tokoferil radikali³⁴

iii) **Tersiyer antioksidanlar:** Tersiyer antioksidanlar, serbest radikaller tarafından hasar gören biyomolekülleri onarırlar. Bunlar, DNA onarım enzimlerini ve methionin sülfoksit redüktazı içerirler.⁷

1.8. Beyin

Beyin üç bölgeden oluşur.

- 1) Ön beyin
- 2) Orta beyin
- 3) Beyin kökü

1.8.1. Ön beyin

Ön beyinin kraniyal kısmı serebral korteks (büyük beyin) ve kavdal kısmı talamus ve hipotalamus olmak üzere iki ayrı bölge halinde çok gelişmiş ve büyümüştür.

- Serebral korteks, dış dünyayı idrak etme, dış ortamdaki değişikliklere karşı gerekli reaksiyonları gösterebilmeyi sağlayan esas yapıdır.

- Hipotalamus, insan ya da hayvan vücudunun esas fonksiyonlarının vücudun ihtiyacına göre yapılmasını sağlar. Vücut suyunun, vücut ağırlığının ve vücut sıcaklığının normal durumda muhafazasını kontrol eder. Streslere karşı reaksiyon gösterir. Kısaca bütün organların yahut organlar sisteminin fonksiyonlarında düzenleyici görevleri vardır ve homeostasis'i sağlar.

- Talamus, beyinin üçüncü ventriculusu boyunca yer almış gri cevher kitesidir. Periferden gelen bütün impulsları almakta, bunları değerlendirmekte ve vücudun ihtiyacına göre beyin korteksinin çeşitli merkezlerini uyarmaktadır.

1.8.2. Orta beyin

En ilkel omurgalılarda beyinin oldukça geniş bir bölgesini işgal eden görme merkezi halinde ise de evrimi ilerlemiş omurgalılarda orta beyin küçülmüş fakat arka ve ön beyin bölgeleri gittikçe büyümüştür.

1.8.3. Beyin kökü

Beyin kökü, santral sinir sisteminin (CNS) en önemli kısımlarını taşır. Anatomik olarak beyin kökü üç kısımdan oluşur.

- a) Beyin soğanı
- b) Beyin köprüsü
- c) Orta beyin

Özellikle beyin soğanı solunum, sindirim, dolaşım ve metabolizma gibi vejetatif fonksiyonların merkezlerinin bulunduğu yerdir. Serebellum (küçük beyin) bölgesi beyinin diğer merkezlerinin kontrolörü ve koordinatörüdür.³⁵

Beyin ve sinir sistemi aşağıdaki nedenlerden dolayı radikal hasara yatkındır:

- 1) Membran lipidlerinde polidoymamış yağasiti yan zincirleri çok fazladır.
- 2) Beyin; katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidazdan fakirdir.
- 3) İnsan beyininin bazı bölgeleri (globus pallidus ve substantia nigra) demirden zengindir.
- 4) Askorbik asit konsantrasyonu CNS' nin beyaz ve gri maddesinde yüksektir.^{29,36,37}

1.9. Beyinde Serbest Radikallerin Neden Olduğu Hasarın Sonuçları

- 1) Lipid peroksidasyonu tarafından membranların yıkımı
- 2) Membran proteinlerinin fonksiyonlarının değişmesi

- 3) Kapiller geçirgenliğin artışı
- 4) Selüler enzim ve yapıların faydalarının yok olması
- 5) Litik enzimlerin aktivasyonu (elastaz, fosfolipaz, siklooksijenaz, ksantin oksidaz)
- 6) Mitokondrial oksidatif fosforilasyonda hasar
- 7) Mitokondrial ve nükleer DNA' nın bozulması
- 8) Glutamin sentetazın inhibisyonu
- 9) Poli(ADP-riboz) sentetazın aktivasyonu
- 10) İnflamasyon ve lökosit kemotaksis
- 11) Trombosit aktivasyon ve adhesyon
- 12) Ekstraselüler anti-proteolitik enzimlerin ve norotransmitterlerin bozulması
- 13) İntraselüler K⁺ azalması³⁷

Yukarıda belirtilen hasarlar beyinde, önemli bir radikal kaynağı olan nitrik oksit aracılığı ile gerçekleşir. Normalde beyinde nitrik oksit toksik olmadığı halde, reperfüzyon sırasında potansiyel olarak hidroksil radikali benzeri reaktif ürünlerin oluşmasına neden olur.¹⁵

Serbest radikal saldırısından nöronlar özellikle etkilenir ve aşırı serbest radikallere maruz kalma ya da bozulan savunma mekanizmaları nedeniyle nöronal ölümler başlayabilir. Serbest radikaller serebral iskemide, kanamalarda nöronlarda hasara yol açar ve Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, normal yaşlanma belirtileri, şizofreni ve sara gibi hastalıklarda nöronların dejenerasyonuna neden olabilir. Bu şartlarda nöronlar üzerinde serbest radikallerin saldırısını önleyen yada sınırlayan ilaçların tespit edilerek geliştirilmesi tedavide önemli bir ilerlemeye neden olacaktır.¹²

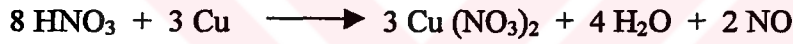
1.10. NO' in Keşfi Ve Kullanımı

NO ilk keşfedilen gazlardan biridir. 1772'de Priestley tarafından keşfedilen NO, fizyoloji ve nörobiyolojideki beklenmeyen rollerinin ortaya çıkması ile güncellik kazanmıştır.³⁸

Makromoleküler polimerlerde görülen sekansa bağlı spesifik özellik göstermeyen inorganik radikal bir gazın (NO) çok önemli biyolojik olaylarda rol alması alışılmıyın dışında bir olaydır. Gerçekte NO, biyoaktif memeli salgı hücrelerinin salgıladığı en ufak moleküler ağırlığı olan kimyasaldır. NO' in yüksek kimyasal aktivitesinin manası NO' in ömrünün kısa olması ve spesifik reaksiyonlara girmesini minimal hale getirmesidir.³⁹

1.10.1. NO'in hazırlanması

NO renksiz bir gazdır ve nitrikasitin redüksiyonu sonucu oluşur.



NO' in ticari eldesi NH₃' in HNO₃' e çevrildiği Oswald prosesi olarak bilinen üç basamaklı bir prosesin ilk adımıdır.³⁸

1.10.2. NO' in fiziksel özellikleri

NO küçük bir dipol momente sahiptir. Birçok solventte az ama eşit miktarda çözünür. O₂ gibi sudan, biyolojik membran ve proteinlerin hidrofobik kısımları gibi organik solventlere kolayca difüze olur. Bununla birlikte suda çözünürlüğünün dioksijen ve CO gibi çok düşük olması nedeni ile suda fazla miktarda bulunmaz.⁴⁰

1.10.3. NO' in kimyasal özellikleri

NO oda sıcaklığında renksiz bir gazdır. Elektronik konfigrasyonu: (σ2s)² (σ2s*)² (σ2pz)² (π2p)⁴ (π2p*)¹ dir. Çiftleşmemiş elektron NO' in radikal olduğunu ve bu molekülün nadir özelliklerinin olduğunu gösterir. NO paramanyetiktir.⁴¹ NO lipide çözünür. Yarı ömrü çok kısadır. NO üç redoks formunda bulunur.³⁷

- 1) Nitrosonyum (NO⁺)
- 2) Nitrik oksit (NO[·])
- 3) Nitroksil anyonu (NO⁻)

NO çok reaktif olup gaz fazında oksijen ile reaksiyona girerek NO₂ meydana getirir.



Su ile NO₂ nitrit ve nitratı meydana getirir, fakat NO ile nitratın redüksiyonu amonyak kaynağı olarak hem insan hem de bakteriler tarafından kullanılır.

Metal-nitrosil kompleksleri epeydir bilinmekle birlikte çok detaylı çalışılmamıştır.

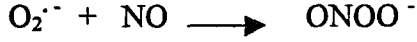
Bunun bir nedeni M-NO bağının çok stabil oluşudur.

NO metallere üç çeşit kompleks yapar:

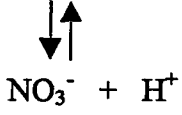
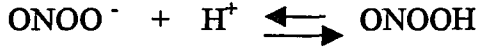
- 1) Lineer, terminal M-N grupları
- 2) Eğimli, terminal M-N grupları
- 3) NO grupları ile köprüleme

Johnson Matthey' deki Biomedikal Teknoloji Grubunun özellikle platinyumlu antikanser ilaçları sahasında metal bazlı ilaçların araştırma ve geliştirilmesinde temel katkıları olmuştur. Biyoloji bilimindeki yeni gelişmeler NO ve geçiş metallerine farklı açıdan bakılması gereğini ortaya koyar. 1995' de S. P. Frisker' ın yaptığı çalışmada özellikle Rutenyum (III) poliamino karboksilat olmak üzere rutenyum bileşiklerinin potansiyel tedavi edici özellikleri üzerinde durulmuştur.⁴¹

NO, süperoksit anyonu ile direkt olarak reaksiyona girer ve peroksinitrit meydana getirir. Bu biyolojik sistemlerde önemli ve hızlı bir reaksiyondur. Burada açığa çıkan OH oldukça fazla güçlü belirteç olduğundan organizmayı riske sokar.

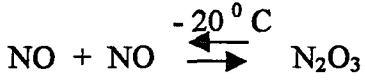


Peroksinitrit anyonu



Bu reaksiyon sonunda nitrit ve nitratlar üretilir.^{6,38}

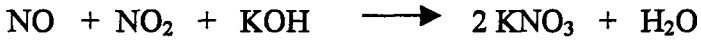
Eşit miktarda NO ve NO₂ etkileşimi düşük sıcaklıkta mavi renkli kararsız bir sıvı olan N₂O₃ bileşimini verir.



Eşit miktardaki NO ve NO₂ karışımı, soğuk sudan geçirilirse nitroz asidi (HNO₂) oluşur.

Soğuk çözeltilerde HNO₂' in disproporsiyonu sonucunda HNO₃ , NO -ve su oluşur.

Nitroz asitlerinin tuzu olan nitritler ise, bir metal hidroksit çözeltisinden NO ve NO₂ gaz karışımının geçirilmesi ile elde edilirler.³⁸



1.10.4. NO' in diğer non-metaller ile reaksiyonu

NO, bir çok non-metal ile katalizörler olmaksızın hızlıca reaksiyona girmez. NO, tiolat ve sülfidlerle bile reaksiyona girer fakat bu reaksiyonlar savunma mekanizması hariç biyolojik sistemler için çok büyük öneme sahip değildir.

1.10.5. NO' in koordinasyon kimyası

NO, oldukça güçlü bir liganttır ve hem serbest hem de kompleks halde metal iyonlarına (Fe, Cu, Co, Mn) yüksek bağlanma sabiti değerinde bağlanır. Bu metal iyonları stokrom oksidazın aktivitesi için gereklidir.

Metallerin düşük oksidasyon durumları $M^+ NO^-$ verirken, yüksek oksidasyon durumları $M^+ NO^+$ verirler. Örneğin $[Fe(CN)_5(NO)]^{2-}$ tıpta nitroprussid olarak kullanılır.⁴⁰

1.10.6. Toksikolojik açıdan önemli olan azot oksitleri

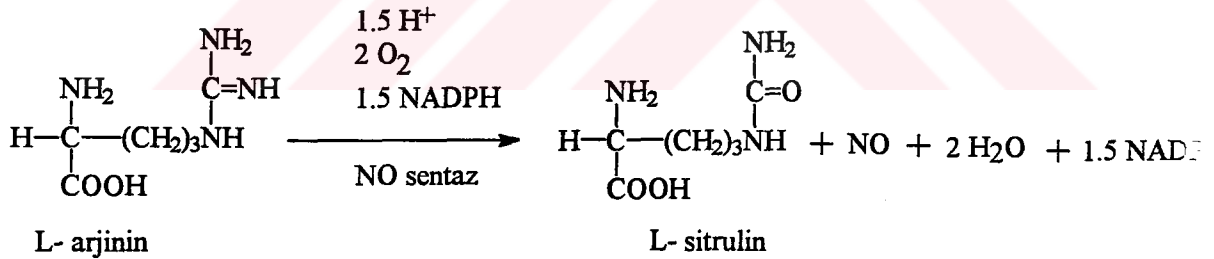
a) Nitröz oksit (N_2O) : Güldürücü gaz olarak da bilinir. Genel anestezide kullanılır.

Diğer azot oksitlerinden daha az toksiktir.

b) Nitrik oksit (NO) : Renksiz bir gaz olup hemen azot dioksite oksitlenir.

c) Azot dioksit (NO_2) : Ağır, kırmızı bir gazdır. Kalıcı kokudadır ve toksikoloji bakımından önemlidir.⁴²

1.10.7. NO'in biyolojisi



Şekil 1.5. Nitrik oksit sentaz (NOS) ile L-arjininden NO sentezi.

NO, nitrik oksit sentaz tarafında moleküler oksijen ve L-arjininin guanido azotundan sentez edilir (şekil 1.5). NOS, stokrom p-450 gibi demir-protoporfirin IX ihtiva etmektedir. Arjininin terminal guanidin azotunun beş elektronluk yükseltgenmesi, indirgenmiş nikotin amid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ve diğer kofaktörler

sayesinde gerçekleşir. Bir oksijen molekülü Fe(II)'ye bağlanır. NADPH'dan hem grubuna bir elektron transferinin ardından O-O bağı ayrılmakta, oksijen atomlarından biri arjininin terminal N-H bağlarından birine bağlanmaktadır. Demirin Fe(II)'ye indirgenmesinin ardından ikinci bir oksijen molekülü bağlanır. Bu moleküller, N-hidroksi arjininden bir elektronun uzaklaştırılması sonucunda, bir perokso-demir ve N-hidroksi-arjinin katyon radikali oluştururken, bir oksidant gibi davranabilmektedirler. Guanidin karbonundaki katyon radikaline perokso-demir molekülü tarafından yapılan saldırı sonucunda, L-sitrulin ve NO oluşur. Arta kalan oksijen su oluşturur.^{37,38}

NO'in bazı memeli hücrelerden sentez edilmesi ve ayrılmasından sonra biyoloji biliminde köklü değişiklikler olmuştur. Küçük, dinamik ve inorganik bir molekülün biyolojik sinyal ajanı olduğunun keşfi, birçok hayati vücut fonksiyonlarını düzenleyici mekanizmalar hakkındaki düşünceleri tamamen değiştirmiştir. Kardiyovasküler fonksiyonun regülasyonu, merkezi ve uç sinirler arasındaki etkileşim, mikroorganizmalar ve tümör hücrelerine karşı savunma mekanizmaları gibi bir çok fizyolojik metodun en temel elemanının NO olduğu belirlenmiştir. NO' in biyolojik aktivitesinin demir içeren proteinlerin nitrosilasyonu ile ilgisi olduğu gösterilmiştir. Kan basıncının regülasyonu, öğrenme ve hafıza, mikroorganizmalara ve tümörlere karşı müdafaa gibi bazı temel biyolojik proseslerin metal-nitrosil komplekslerinin oluşumu ile olduğu bilinmektedir.

NO metabolizmasının regülasyonundaki bir aksama hipertansiyon, epilepsi, şeker, artirit ve septik şok gibi bazı hastalıklara neden olabilir.⁴¹

1980 yılında Furchgott, asetilkolinin vasodilatör olarak görev yapması için atar damarın bozulmamış endotelyuma sahip olması gerektiğini ortaya koymuştur. Bu, asetilkolinin endotel hücreler üzerinde etkin olduğunu ve sonuçta ikinci bir kimyasal sinyal meydana getirdiğini göstermektedir. Bu kimyasala endotelyumdan türeyen relaksing faktör

(EDRF) denilmiştir. İki ayrı grup (Furchgott ve Ignarro) EDRF' nin gerçekte NO olduğunu iddia etmişler ve daha sonra 1987' de Ignarro' nun laboratuvarı ve Welcome laboratuvarındaki bir çalışma grubu bu hipotezi doğrulamıştır.^{38,40,41} EDRF, arter ve venden serbest bırakılan kararsız bir maddedir. Bu da endotelyuma bağımlı vazodilatörlerin davranışlarını ortaya çıkarır.

NO ise, gliserilnitrat ve nitropurussid gibi vasodilatör ilaçlardan serbest bırakılan kararsız, endotelyuma bağımsız bir vazodilatördür. 1987' de Lois J. Ignarro'nun yapmış olduğu çalışma sonucu vasküler düz kas üzerine NO' in etkisinin EDRF' nin etkisine benzerliği gözlenmiştir.⁴³

1.10.8. Vücutta NO' in fonksiyonları

Nitrik oksit, biyolojik sistemlerde medyatör olarak tanımlanmaktadır. NO bir transmitterdir, trombosit agregasyonunu önler ve makrofaj fonksiyonunda önemli bir rolü vardır. İskemi sırasında hücre içi kalsiyumun aşırı miktarda artması birçok zararlı sonuçlar verir. Örneğin, hücre içi kalsiyumun aşırı artışı nitrik oksit sentazı aktive eder, arjininden NO' in oluşumunu sağlar. NO guanilat siklazın aktivasyonu ile cGMP üretir. cGMP' nin anti-oksidant, anti-agregant ve anti-inflamatuar etkisi vardır. NO, Fe-S proteinlerinden demiri çıkararak yerine kendisi bağlanır. Böylece, Fenton tepkimesini uyarır ve bu mekanizma ile karsinogenezisde rol oynar.^{37,38}

NO' in kan basıncını düzenlemede anahtar bir rol oynadığı bilinmektedir. 1988 yılında NO' in transmitter olarak fonksiyon yaptığı belirlenmiştir. Perifer sinir sistemindeki iki major transmitter asetil kolin ve noradrenalindir. Bu kimyasallar sinir / sinir ve sinir / kas bileşim yerlerinde mesajcı olarak etki yaparlar. Bununla beraber bazı perifer sinirlerin noradrenalin (NA) ve norasetilkolin (NC) kullanmadığı bilinmektedir. Bunlar bunlar NANC sinirleri olarak adlandırılır. NANC sinirleri gastrointestinal bölge, solunum bölgesi, kardiyovasküler kas ve urogenital sistemler gibi dokularda bulunurlar.

NO' in NANC sinirlerinin nörotransmitteri olduğu belirlenmiştir. NO ayrıca beyinde de bir nörotransmitterdir, uzun vadeli deneyim ve hafıza olayında etkilidir.

İmmun cevap (vücudun bakteri, virus, tümörler gibi yabancı hücrelere karşı savunması) konusundaki çalışmalar NO' in yeni bir fonksiyonunun bulunmasına yol açmıştır. Diğer bazı çalışmalar makrofajların intraselüler demiri hedef alarak hücreleri öldürdüklerini ortaya koymuştur. Makrofajların NO kullanarak hedef hücreleri yok ettiği belirlenmiştir.^{38,41}

NO sadece vasodilasyon ve nörotransmisyon gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonları düzenleyen sinyal molekülü değil aynı zamanda inflamatuvar oluşumlarda önemli rol oynayan makofajların mediatörü gibidir.⁴⁴ Peroksinitrat patofizyolojik şartların değişiminde üretilir. İskemik organların reperfüzyonu, akut ve kronik inflamasyona tipik örnektir.⁴⁵

İnflame dokularda, nitrik oksit ve süperoksit hızlıca peroksinitrit anyon formuna dönüşür ve en güçlü bir oksidanttır. Hidroksil radikali (HO[•]) nitronyum iyonu (NO₂⁺) ve nitrojen dioksit radikali (NO₂[•])'nin karakteristik reaksiyonlarını başlatabilir.⁴⁴ Bundan dolayı peroksinitrit DNA yada doku hasarına neden olabilir. Peroksinitrit sülfidril gruplarının *in vitro* olarak DNA' da zincir kırılmasına neden olduğu rapor edilmiştir.⁴⁶

1997'de Yumiko Yoshie ve arkadaşları bir katekolamin (örneğin, L-DOPA) ve NO-serbest bırakan bir bileşik (örneğin sodyum nitroprussid) varlığında plazmid DNA' sı ile inkübe edildiği zaman DNA ipliği kırılmasının sinerjik olarak arttığını göstermişlerdir. DNA ipliğini kırmada sorumlu olan oksidantın ise peroksinitrit olabileceğini ifade etmişlerdir.⁴⁷ Peroksinitrit sülfidril gruplarını okside eder ve membran lipid peroksidasyonuna neden olur.⁴⁶

Peroksinitrit, sülfidril gruplarının oksidasyonu, aromatik bileşiklerin hidrosilasyonu ve nitrolanması gibi durumlarda yüksek reaktif bir türdür.⁴⁵

Yine 1997'de Yumiko Yoshie ve arkadaşları aynı konuyu sigara dumanında incelemiştir. Gaz fazında azot oksitleri, nitrik oksit, katranda kinon/hidrokinon kompleksi mevcuttur. Katrandaki polihidrokinon aromatik bileşiklerin otooksidasyonu ile O_2^- meydana gelir. Böylece peroksinitrit içeren güçlü reaktif türler sigara katranındaki interaksiyon ile oluşur. Çalışmada NO'nin sigara ilişkili akciğer kanseri hastalıklarında önemli rol oynayabileceği belirtilmiştir.⁴⁸

Hücre sinyal yollarının bazılarındaki anahtar adım ikinci bir mesajcı molekülün oluşmasıdır. Örneğin, GTP'den cGMP oluşması. cGMP daha sonra sinyal sıralamasındaki diğer kimyasal aksiyonları aktive eder. Bu biyokimyasal reaksiyon (GTP'den cGMP oluşması) guanilat siklaz (GC) enzimi ile katalize edilir. NO ile ilgili çalışmalarda önemli gözlemlerden birtanesi de, NO'nin arterlerin düz kas hücrelerindeki guanilat siklazın aktivitesini artırdığı gerçeğidir. Guanilat siklaz hem grubu içeren bir enzimdir.⁴¹

Tablo 1.3. NO'in moleküler hedefleri.³⁷

Moleküler sınıf	Aktivite artışı	Aktivite azalışı
Hem proteinler	Çözülebilir guanilil siklaz	Hemoglobin, miyoglobin
Fe-S proteinler		NADH: Ubikinon oksidoredüktaz, NADH: süksinat oksidoredüktaz, Cis-akanitaz
Diğer non-heme Fe proteinler		Ferritin, ribonükleoit redüktaz
Tirozil radikal protein		Ribonükleoit redüktaz
Protein tioller	EDRF-benzeri aktivite	Dehidrogenaz
DNA	Mutasyon fonksiyonlarının artışı	Mutasyon fonksiyonlarının azalışı
Süperoksit anyonu	Hidroksil radikallerinin oluşumu	Süperoksit radikallerinin azalışı

1.10.9. NO' in uzun süreli hafıza (long-term memory) üzerine etkisi

Uzun süreli hafızanın temelini oluşturan düzenlemeler, hafızanın sinapsis denilen kısmında yer alıp, sinyaller buradan bir sinir hücresinden diğerine iletilirler. Değişimin sinyali gönderen hücrede mi veya sinapta bulunup mesajı alan hücrede mi olduğu araştırılmaktadır. En son modelde araştırmacılar, mesajın alındığı sinir hücresinin, mesajı geri götürücü haberciler aracılığıyla sinyali gönderen hücreye geri gönderildiği şeklinde olup, bu ikili arasındaki bağlantının kuvvetlendirilmesinin uzun süreli hafızaya yardım edeceği görüşünü savunmaktadırlar. NO' in beyinde bilgi depolamada anahtar rolü oynayan bir kimyasal molekül olduğuna ilişkin bazı kanıtlar vardır. Bu, geri götürücü haberci molekül olduğu anlamına gelebilir. Eğer bu doğru ise, bu molekül hücreler tarafından kullanılan beklenmedik moleküllerden biridir. Hücre membranlarını geçebilme ve ortaya çıkışları ile birlikte görünmeme kabiliyetleri vardır. NO kolayca hücre membranından geçer ve yapıldıktan 1-2 sn. sonra yok olur. NO, presinaptik hücrelerde guanilat siklaz veya ADP riboziltransferaz enzimleri üzerinden etkili olur.. Nöron, birkaç ard arda uyarıcı aldığı anda LTP (uzun dönem potensiyasyonu) faaliyet gösterir. Sinyaller, kalsiyumun hücre içine gönderilmesine yarayan bir grup L-glutamat reseptörlerini harekete geçirmektedir. Kalsiyum, sinapslardan yayılan sinyalleri güçlendirmektedir. Bu durum, potensiyasyon denilen ve alıcı hücrenin mesajın bir daha gönderilmesi halinde daha güçlü tepki vermesine neden olur. NO, postsinaptik (alıcı) hücre ile presinaptik (gönderici) hücre arası haberci görevi yapıp, presinaptik hücrenin sinyali artırmasını sağlar.³⁸

1.10.10. NO, beyin ve diğer organlar

Santral nevroz sistem (CNS)'de NO nörotoksik ve nöromodülatör etkilerin herikisine de sahip bir nöronal mesajcı ve EDRF salınımının önemli bir mediatörüdür. Bununla birlikte reperfüzyon boyunca süperoksitin mevcudiyetinde, nitrik oksit peroksinitrit anyonunun oluşmasına yol açabilir.³⁷

Beyinde çok sayıda nörotransmitter vardır. Major transmitter aminoasit glutamattır ve direkt olarak elektrik sinyallerine cevap verir. Bununla birlikte, donör sinir hücresine geri dönüş sırasında serbest bırakılan NO tarafından kavranan bir sinir hücresi üzerinde glutamatın rol oynadığı görülür. Bu glutamat aktivitesinin düzenlenmesinde bir feed-back gibi düşünülebilir. Glutamat ve NO'nin bileşik etkisinin potansiyel hafızada bir rol oynayabileceği fikri vardır.⁴⁰

NO keza majör nöronal hasar ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılır. Sinir harabiyeti aşırı miktarda glutamat açığa çıkması ile meydana gelir. Lipton ve arkadaşları NO'nin nörotoksik etkilerinin, NO'nin süperoksit ile reaksiyonu sonucu oluşan peroksonitrit nedeni ile olduğunu ortaya koymuşlardır.³⁸

Bazı çalışmalarda bununla beraber NO sinir koruyucu gibi görünmektedir. Lipton ve arkadaşları NO'nin nitrozonyum iyonu (NO⁺) şeklinde NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptörü tiyol grubu ile reaksiyona girerek nörotransmisyonu engellediğini göstermişlerdir.

NO, felç esnasında oluşan sinirsel harabiyet ve buna bağlı olarak oluşan rahatsızlıklarda etkili olur. Aşırı heyecanlanma sonucu oluşan sinirsel ölümlerin olduğu durumlarda, NMDA reseptör alt tipi boyunca glutamat aşırı miktarda salınmaktadır ki bu durum nöronal hasarın etkisiyle oluşan felç durumu ile izah edilir.³⁸

NO'nin serabral iskemide rol oynadığı konusunda tezat sonuçlar rapor edilmektedir. Nowicki ve arkadaşları NO'nin farelerde fokal iskemiye artırdığı belirtilirken, Yamamota ve arkadaşları aksini iddia etmektedirler. Şöyle ki NO'e bağlı patofizyolojiyi anlamak için *in vivo* beyin iskemisinde NO'nin üretimini ölçmenin önemini vurgularlar. Teiji Tominoga 1993'de iskemik beyin tahribatının oluşumu ve gelişmesinde NO'nin biyokimyasal rolünün tesbiti konulu çalışmasında EPR (elektron paramanyetik rezonans) tekniğini kullanarak *in vivo* NO üretimini direkt olarak tayin etmeyi başarmıştır.⁴⁹

Fazla aktif nöronlar aşırı miktarda NO meydana getirirler ve bu da beyin hastalıkları ile NO arasında ilişki kurulmasına neden olmuştur.³⁸

NO endotel hücrelerde c-NOS benzeri aktiviteyi vasküler sistemde artırır. Son zamanlarda NO'in i-NOS benzeri aktiviteyi hem endotelyumda, hem de vasküler düz kas hücrelerinde indüklediği görülmüştür. Vasküler orjinli NO'in etkileri düz kas kasılması, plakaların birleşmesi ve yapışmasının inhibisyonu olarak belirtilmiştir ki bu etkilerin herbiri patofizyolojide önemli rol oynar.

Bazı periferik nöronlar için NO'in nörotransmitter olarak rolü bilinmektedir. Farmakolojik kanıtlar NO'in özafagus, mide, onikiparmak bağırsağında nöronal uyarıma cevap verdiğini de göstermiştir.

Tavşanlarda, endogenous NO'in ventilasyon-perfüzyonunun düzenlenmesine katkıda bulunduğu ve hipoksi yoluyla indüklenen pulmonari vasküler rezistansta artışı sağladığı belirtilmiştir.^{39,50}

1.10.11. NO metabolizması bozukluklarının neden olduğu hastalıklar

NO'in vücutta çok fonksiyonlu işlevi olduğu bilindiğine göre, NO metabolizmasındaki aksaklıkların bazı hastalıklara yol açması da şaşırtıcı değildir. Örneğin, endotel hücrelerde c-NOS aktivitesinin bozulmasının esaslı hipertansiyona neden olduğu iddia edilmektedir. Hipertansiyon, organonitralar gibi NO ilaçları ile tedavi edilmektedir. İnorganik NO ilacı olan sodyum nitroprusside acil hallerde kullanılır. Bununla beraber NO'in fazla oluşumu vücuda toksik etki yapar. Toksik miktarda NO oluşumu şeker, arthritisi, inflamasyon, sara, ve septik şoka neden olur.

Septik şok olarak bilinen hastalık, kanda sirküle olan yüksek oranda bakteridir. Bu immün cavabı harekete geçirir ve NO konsantrasyonunda artışa neden olur. Bunun iki etkisi vardır. Birincisi NO'in toksik seviyesi doku harabiyetine neden olur. İkinci ve en önemlisi ise NO'in vasodilasyona neden olmasıdır. Bu da kan basıncının düşmesine yol açar.^{38,41}

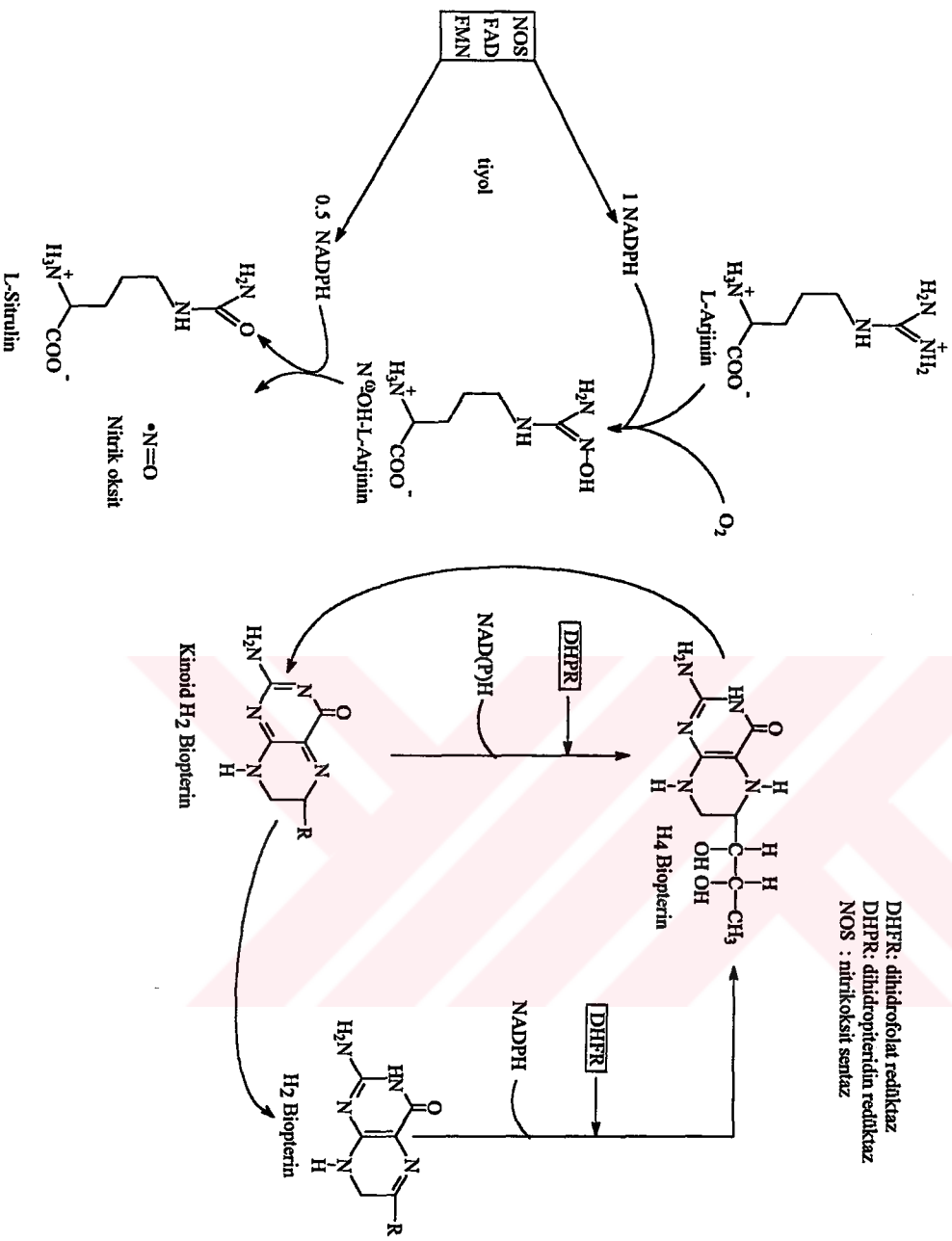
1.11. Nitrik Oksit Sentetaz (NOS) Enzimi

NOS'ın üç farklı izoformu izole edilmiş, sıralanmış, klonlanmış ve tanımlanmıştır.

- i) İzofom I: Nöronal izoform (nc-NOS) nöronlarda ve epitel hücrelerde bulunur. Ca^{2+} -kalmodulin bağımlıdır.
- ii) İzofom II: İndüklenebilir izoform (i-NOS) makrofajlarda ve glial hücrelerde bulunur.
- iii) İzofom III: Endotelial izoform (ec-NOS) endotel hücrelerde bulunur. Aktivitesi Ca^{2+} -kalmodulin tarafından düzenlenir.

Tüm izoformlar L-arjinin ve moleküler oksijen gibi substratlar ve NADPH, tetrahidrobioptin, FAD, FMN gibi kofaktörleri kullanır. Tamamı kalmodulin bağımlıdır ve hem içerir. i-NOS kalsiyum duyarsızdır ve endotoksinler, interferon γ ve lipopolisakkaritler tarafından uyarılırlar. i-NOS kalmodulini sıkıca bağlar bu sebepten dolayı Ca^{2+} 'nin bulunmasına gerek duymaz. nc-NOS kalmodulini gevşek olarak bağlar. Sitozolda Ca^{2+} arttıkça kalmodulin sıkıca bağlanır ve NOS, NO üretir. ^{41,37,47,52,53,54}

NOS, organizmada bir tek biyokimyasal reaksiyon ile NO açığa çıkaran bir mono oksijenazdır. Bu enzimin sistematik ismi ise, L-arjinin, NADPH: oksijen oksidoredüktaz [EC 1.14.13.39]dir. Katalitik aktif formda NOS, iki özdeş altünite içerir. Herbiri CaM molekülüne çapraz bağlanır. Bu enzim bir flavohem proteini olup ökaryotik enzimler arasında nadir bir türdür. Her bir alt ünite 4 prostetik grup içerir: hem (demir-protoporfirin IX), flavin mononükleotid (FMN), flavin dinükleotid (FDN) ve tetrahidrobiopterin.⁵¹



Şekil 1.6. Nitrik oksitin biyosentezi³⁹

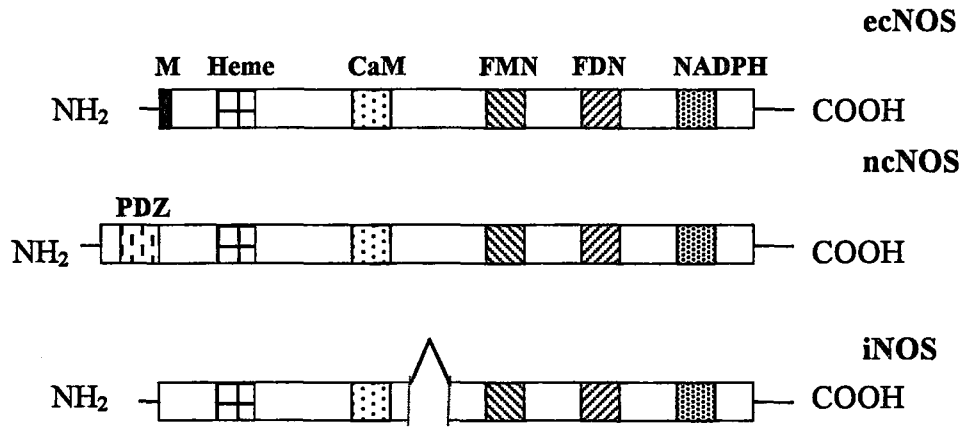
1.11.1 Nitrik oksit sentaz (NOS)' ın fonksiyonları

- i) Endotel hücreler yolu ile düz kasın gevşemesi. Kan akışının düzeni (mesajcı olarak NO').
- ii) Merkezi sinir sisteminin yanıtı: hafıza? (mesajcı olarak NO').
- iii) Daha düşük organizmalarda ve bakteriye direnç kazandırma (NO' ile O₂ birlikte zehir gibidir).⁴⁰

NOS makrofajlarda bulunur.Üç farklı fakat birbirine benzeyen NOS enzimi farklı dokularda bulunmaktadır.

1.11.2. Nitrik oksit sentazın izoformları

Üç NOS izoenzimi bilinmektedir. Bunlar spesifik olduğu dokuya, indüklenebilirliğine ve kalsiyuma bağımlılığına göre birbirinden ayrılır. NOS izoenzimleri farklı kromozomlardaki (kromozom 12, 17 ve 7) genlerden kodlanır. Ekzon-intron organizasyonu, promotor bölgelerinin yapısı belirlenmiştir. Kemirgenlerin makrofajlarında ilk olarak kalsiyuma bağımsız indüklenebilen i-NOS izoenzimi bulunmuştur. İnsanlarda iNOS geni hepatositlerde, respiratör endotelyumda, kondrositlerde, nötrofillerde, astrositlerde ve bazı diğer hücre tiplerinde bulunmaktadır. İki devamlı salgılanan enzim nc-NOS ve ec-NOS izole edildikleri dokulara göre isimlendirilmişlerdir. ec-NOS kan damarlarının epitel hücrelerine spesifiktir. nc-NOS izoenzimi ise değişik dokularda sentezlenir: İskelet kaslarında, miyokardiyumda, nötrofillerde, pankreatik adacık hücrelerinde, endometriumda, respiratör ve gastirik epitelyumda vardır.⁵¹



Şekil 1.7. NOS izoenziminin polipeptid zincirindeki katalitik ve regülatör bölgeler.

(PDZ: Protein-protein etkileşimi için sorumlu bölge, M: ec-NOS izoenziminin myristoylation bölgesi) ⁵¹

Bütün NOS izoenzimleri yapısal olarak homologdur. Bunların C- terminal oksidaz bölgeleri hem grubu, tetrahidrobiopterin ve kalmodulin (CaM) için bağlayıcı bölgeler içerir. N- terminal redüktaz bölgeleri, flavinler ve NADPH için bağlayıcı bölgeler içerir. Sadece nc-NOS 'ın N- terminali PDZ bölgesi içerir ki bu bölge membran glikoprotein komplekslerinin enzimin sinirlerdeki sinaptik kompartmanları için gerekli membran glikoproteinlerine bağlanmasından sorumludur. İskelet ve kardiyak hücrelerde nc-NOS bu yönle bağlanır. ec-NOS N- terminal bölgesinde (Gly 2) hidrofobik bir bölgeye sahiptir ki bu hücrelerin epitel plazma membranının iç kısmına enzimin bağlanmasını sağlar. Kalsiyumun hücre içi konsantrasyonunun yaklaşık 100 nM olması aktif holoenzimin oluşumunu sağlar. i-NOS' ın aktivitesi diğer izoenzim tiplerinden daha çok tetrahidrobiopterinin yüksek konsantrasyonundan etkilenmektedir. i-NOS' ın dimerleşmesi için bu faktör gereklidir. Proteinkinazlar NOS aktivitesinin regülasyonunda rol oynarlar. NOS izoenzimlerinin fosforilasyonu ile proteinkinaz C_α

geri dönüşümlü olarak bu enzimin aktivitesini inhibe eder. Buna rağmen hücrelerde kalsiyuma bağımsız i-NOS izoenziminin ekspresyonunun ortaya çıkması, NO' in oluşumu tamamıyla i-NOS mRNA' sının transkripsiyonu seviyesinde olur.⁵¹

Endotelial NOS (ec-NOS) bütün trombositlerin inhibisyonu, vasodilasyon veya lökosit adhesyonunda NO' i endotelyumdan serbest bırakır. ec-NOS serebral kan akışını sürdürmede önemli bir rol oynar. İndüklenebilir NOS (i-NOS) makrofajlarda bulunur ve indirgendiği zaman vücudun immun cevabının bir kısmı gibi NO' in büyük bir miktarını üretir. i-NOS nörodejenerasyonda anahtar rol oynar. Nöral NOS (nc-NOS)' dan üretilen NO merkezi ve periferal nevroz sistemlerde nörotransmisyonu artırır. nc-NOS da nörodejenerasyonda anahtar rol oynar ve indüklenebilir.⁵⁵

nc-NOS süperoksit radikalini L-arjinin konsantrasyonu düşüken yapar. Arjinin seviyesini kontrol etmek, hücre hasarının O_2^- / NO tarafından ortaya çıkarılan hastalık çeşitlerinde tedaviye yönelik bir yaklaşım olabilir. Nöronlardan, glial hücrelerden ve CNS' in vasküler endotelyumundan NO üretilir. Üretildiği dokuya spesifik olarak etkileri de farklıdır. Nöral NO akut iskemik hasarı artırır. Halbuki vasküler NO iskemik hasarı serebral kan akımını artırarak azaltır. Serebral iskemi bölgesel inflamatuvar bir cevap ile karşılaştığında postiskemik periyodun süresine bağlı olarak doku hasarını artırmada rol oynar.³⁷

Tablo 1.4. Nitrik oksit sentazın inhibitörleri.³⁷

Sınıf	nc-NOS	i-NOS
Substrat analoglarının inhibitörleri	N ^w -nitro-L-arginin (L-NA)	N ^w -amnio-L-arginin
	N ^w -iminoetil-L-ornitin	N ^w -metil-L-arginin
	N ^w -amino-L-arginin	N ^w -nitro-L-arginin
	N ^w -metil-L-arginin (L-NMMA)	
Flavoprotein bağlayıcılar	N ^w -nitro-L-arginin metilester (L-NAME)	
	Difeniliodonyum	Difenilen iodonyum İodonyum difenil Di-2-thieniliodonyum Tanımlanmamıştır
Kalmodulin bağlayıcılar	Kalsinötrin	
	Trifloroprazin	
	N-(4-aminobutil)-5-kloro-2-naftolen sülfonamid	
	N-(6-aminohexzil)-1-naftalen sülfonamid	
Hem bağlayıcılar	Karbon monoksit	Karbonmonoksit 2-4-Diamino-6-hidroksiprimidin Kortikokosteroidler
Uyarılmayı önleyiciler	Tanımlanmamıştır	TGF-β ^c -1,2,3 İnterlökin-4 İnterlökin-10

1.12. NO ölçüm yöntemleri

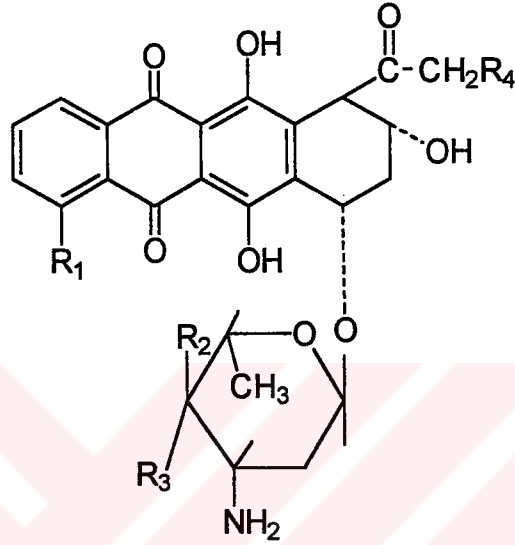
NO'nin yarı ömrü çok az (4 sn.) olduğu için değişime uğramadan tayini ve miktarının belirlenmesi zordur. Eldeki mevcut metodlara göre:

- i) NO seçici elektrotları içeren çeşitli potansiyometrik aletler ile,
- ii) Spin-trapping / ESR (elektron spin rezonans) veya EPR (elektron paramanyetik rezonans) tayini ile,
- iii) O₃ ile head space reaksiyonundan dolayı NO gazının reaksiyonu ile oluşan NO₂'nin kemilüminesans tayini ile,
- iv) Fe(II) oksihemoglobin tarafından NO'nin tutuklanması ile tayin edilebilir.⁵⁵

NO, Fe(II) hem ve Fe(III) hem'i ile kompleks oluşturur. Hemoglobinde (Hb) normal oksidasyon basamağı Fe(II) (d⁶)'dır ve bu durumda NO, Hb[Fe(II)] NO'i oluşturmak için elektron donörü gibi hareket ederek iki elektron verir. Arta kalan çiftleşmemiş elektron, molekülü paramanyetik konuma getirir ki bu da NO' in EPR ile tayininin esasını sağlar. HbNO daha sonra oksijenin varlığında biraz daha oksitlenerek methhemoglobinine dönüşür. Bu durumda NO Griess reaksiyonuna göre nitrat olarak araştırılır.^{41,53}

1.13. Adriyamisin (doksorubisin)

Adriyamisin (ADR) , kanser kemoterapi alanında çok yaygın kullanılan kinoid antrasiklin grubu antitümör ilaçlarıdır.⁵⁶



	<u>ADR (Doksorubisin)</u>	<u>Daunomisin</u>	<u>Epirubisin</u>	<u>Idarubisin</u>
R ₁ =	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H
R ₂ =	H	H	OH	H
R ₃ =	OH	OH	H	OH
R ₄ =	OH	H	OH	H

Şekil 1.8. Klinik kullanımda geçerli olan dört antrasiklinin yapısı .⁵⁷

ADR, *Streptomyces Peuceitius*' tan izole edilmiştir ve antineoplastik etkilidir. Akut ve kronik lösemi, lenfoma, yumuşak doku sarkomu, nöroblastoma ile akciğer ve göğüs kanserinde etkilidir.⁵⁸

Antrasiklinlerin tümör ve organ toksisiteleri için üç büyük etkisi vardır. Bunlar:

- 1) DNA ve RNA sentezinin interkelyasyonla bloklanmasında DNA'ya bağlanmada yüksek bir ilgi gösterirler ve DNA iplikçığının bölünmesi topoizomeraz II üzerine etki eder.
- 2) Membranlara bağlanarak akıcılığı ve iyon transferini değiştirir.
- 3) Enzim aracılığı ile indirgenme işlemi boyunca oksijen ve semikinon serbest radikallerini oluşturabilir.

Oksijen radikalleri ile membranlarda meydana gelen zarar kardiyak toksisitesine yol açar.⁵⁹

ADR molekülleri DNA çift heliksinde birbirine komşu baz çiftleri arasına enine yerleşmek suretiyle (intercalation) DNA zincirlerini uzatır ve de stabilize eder. Böylece DNA'nın replikasyonunu ve transkripsiyonunu bozar. Transkripsiyonun bozulması RNA ların sentezinin durmasına sebep olur.⁶⁰

İlacın "aglycone" kısmı DNA ve RNA ile interkelyat oluşturur. Molekülün iyonik şeker kısmı interkelyatı kararlı kılmak için iyonik olarak bağlanır. Sonuç olarak DNA ve RNA'nın sentez boyunca yapısı bozulur. Bu davranış faz spesifiktir. Doku stotoksitesinde önemli bir rol oynayan bazı serbest radikal ürünleri oluşabilir. ADR beyinde bulunan bazı hücreler tarafından hızlıca tutulur. Plazma yarı ömürlerinden sorumlu hücresel bileşenlere bağlanır. ADR özellikle hidrosillenmiş ve konjüge olmuş türlere metabolize olur.⁶¹

ADR mide – barsak kanalından absorbe edilmez, sadece intravenöz infüzyon yoluyla verilir.⁶²

ADR özellikle katı tümörlere karşı insan neoplasmlarının geniş bir spektrumunda aktivite sergilemiştir. Ne yazık ki klinik kullanımı potansiyel toksik etkilerinden dolayı sınırlanmıştır.⁵⁶ Diğer antineoplastik ilaçlar gibi önemli toksik etkilerinden biri kalp üzerinedir. Miyokard hücrelerinin DNA molekülleri ile interkelasyon yoluyla bağlandığı için kalpte patolojik ve fonksiyonel bozukluklar yapar.⁶⁰ Kardiyotoksisite, doksorubisin ve daunorubisin kullanımının sınırlanmasında temel faktör olmuştur.⁶³

Hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarda ADR' nin sıçan merkezi sinir sistemi lipid peroksidasyonunu uyardığı kanıtlanmıştır. ADR' nin neural hücrelere ulaştığında sıçanlarda "sensory neuropathy" e neden olduğu gösterilmiştir. İzotop etiketleme ve florometrik teknikler kullanılarak ADR' nin beyinde uzun süren bir etkisi olduğu görülmüştür. Çoğu hayvanlar (örneğin sıçanlar) ADR uygulandıktan sonra 2.5 saat içinde titreme nöbetine ya da komaya girmektedirler. Histopatolojik incelemeler sonucunda bu hayvanların beyinlerinde nekros ve hemoraja uğramış alanların bulunduğu görülmüştür. Sıçanlarda periferel ganglion hücrelerinde yüksek doz ADR verildikten sonra nekroz görülmektedir. Düşük doz ADR verilirse nekroz 2 gün sonra ortaya çıkmaktadır. ADR bir kinon halkasına sahip olduğundan ilaç biyolojik sistemlerde redoks döngüsüne uğrayabilir. Bu reaksiyon ajanının bir semikinon radikaline indirgenmesini içerir ki bu da daha sonra O_2 , süperoksit anyonunun (O_2^-) bu esnada oluşumu ve ondan türeyen aktif türler H_2O_2 ve HO^{\cdot} ile ana ilaca (ADR) yeniden yükseltgenir.

Oksijenin bu reaktif formları normal olarak hücresel defans sistemiyle detoksifiye edilir.

Bazı şartlar altında bu reaktif oksijen türlerinin üretimini artırılması defans sistemlerini

bozar ve DNA yapısı, proteinler ve karbohidratların hasar görmesiyle hatta lipid peroksidasyonuna neden olmasıyla hücrel hasar oluşur ki bu da giderek membran bütünlüğünü sonuçta değiştirir. Bu tip reaksiyonlar ADR kemoterapisi sırasında beyinin rejenere olmayan hücreleri üzerinde dramatik sonuçlara neden olabilir. Çünkü, rejenere olmayan hücrelerde lipid miktarı, oksijen tüketimi yüksektir ve antioksidan konsantrasyonu düşüktür.⁵⁶

1977' de Lown ve arkadaşları ADR toksisitesinin serbest radikal gibi etkisi olup olmadığı konusunda çalışan ilk kişilerdir. Etidyum bromür floransans yöntemi kullanarak işaretlenmiş DNA' ya ADR' nin kovalent olarak bağlandığını bulmuşlardır.

1977' de Thayer ve arkadaşları submitokondrial kısım içeren bir sistemde ADR çalışmışlardır. ADR kemoterapisinde O_2^- ve H_2O_2 oluşmasının ve kalp dokusunun düşük katalaz içermesinin kardiyotoksikite artışına neden olduğunu belirtmişlerdir.

Yine 1977' de Goodman ve Hochstein ADR ile serbest radikal oluşumunu incelemişlerdir. ADR kardiyotoksik etkisinin temelini lipid peroksidasyonu ile açığa çıkan oksijen radikallerinin oluşturduğunu öne sürmüşlerdir.

1978' de Handerson ve arkadaşları ise eritrositler üzerinde ADR' nin etkilerini çalışmışlardır. ADR' nin insan eritrosit süspansiyonlarına katılması hekzoz monofosfat aktivitesinin uyarılmasına neden olduğu gözlenmiştir. ADR ile H_2O_2 oluşmasına ilişkin deliller redükte glutatyonun yükseltgenmesi, ^{14}C - format oksidasyonu ve katalaz-aminotriazol tuzaklama tekniği ile elde edilmiştir.

1979'da Someya ve arkadaşları ADR ile uyarılan DNA iplikçığının bölünmesini çalışmışlardır. ADR' nin PM2 DNA' sına bağlanması ve sonra DNA'nın bölünmesi

agaroz jel elektroforezi ve etidyum bromür yöntemi kullanılarak açıklanmıştır. DNA degradesiyonuna ADR' nin neden olduğunu savunmuşlardır.

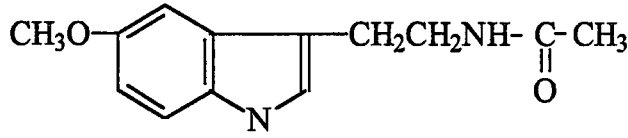
1980' de Kalyanaraman ve arkadaşları ADR içeren mikrozomal inkübasyonla üretilen serbest radikallerle ilgili çalışmada elektronsipin rezonansı kullanmışlardır. Oksijen konsantrasyonunun yüksek olduğu zaman $O_2^{\cdot -}$ radikali ölçülmüş ve bu da SOD ile inhibe edilmiştir. Oksijen konsantrasyonu düşük olduğu zaman semikinon radikallerini incelemişlerdir. Semikinonun hava oksidasyonunun $O_2^{\cdot -}$ oluşumuna neden olduğunu belirtmişlerdir.⁶⁴

Bertelli ve arkadaşları tarafından 1991' de kültür hücrelerinde rat glomerular epitel hücrelerinin ADR' ne direnci ve belirlenen toksisitede serbest radikallerin rolü incelenmiştir. Bu metod ile ratlardaki ADR deneysel nefroz için sorumlu mekanizmaların analizinde iyi bir model sağlanmıştır. Böbrekleri kapsayan araştırmalarda, ADR toksisitesinin potansiyel mediatörleri üzerinde ve ADR bağlanmış makroporos yataklarda çalışılmıştır.⁶⁵

ADR' nin hücre toksisitesini önleme çalışmaları serbest radikal hasarını indükleyen ADR' ni azaltan bileşiklerin oluşturulmasını içermektedir. Serbest radikal reaksiyonlarını bloklayan serbest radikal süpürücüler ADR' nin hücre toksisitesini azaltır. *Eugenia Jumbolana* ve *Ocimum Sanctum*' dan izole edilen Oleanolik asit (OA) ve Ursolik asit (UA) 'in serbest radikal hasarı üzerine potansiyel bir inhibisyon sergilediği 1991'de S. Balanehru ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir. Yine serbest radikal hasarını indükleyen ADR' ne karşı bu iki bileşiğin koruyucu etkisi S. Balanehru ve B. Nagarajan tarafından 1992' de rapor edilmiştir.^{66,67}

1.14. Melatonin

1958'de Amerikalı dermatolog Aaron B. Lerner binlerce sığırın pineal bezinden amfibian denilen, aydınlatıcı faktör olarak da bilinen potent bir madde tanımlamıştır. Bu N-asetil-5-metoksitriptamin (şekil 1.9) yapısındaki maddeye, amfibian pigmentindeki melanoforları kontrakte ettiği için melatonin adını vermiştir.



Şekil 1.9. N-asetil-5-metoksitriptamin (Melatonin)

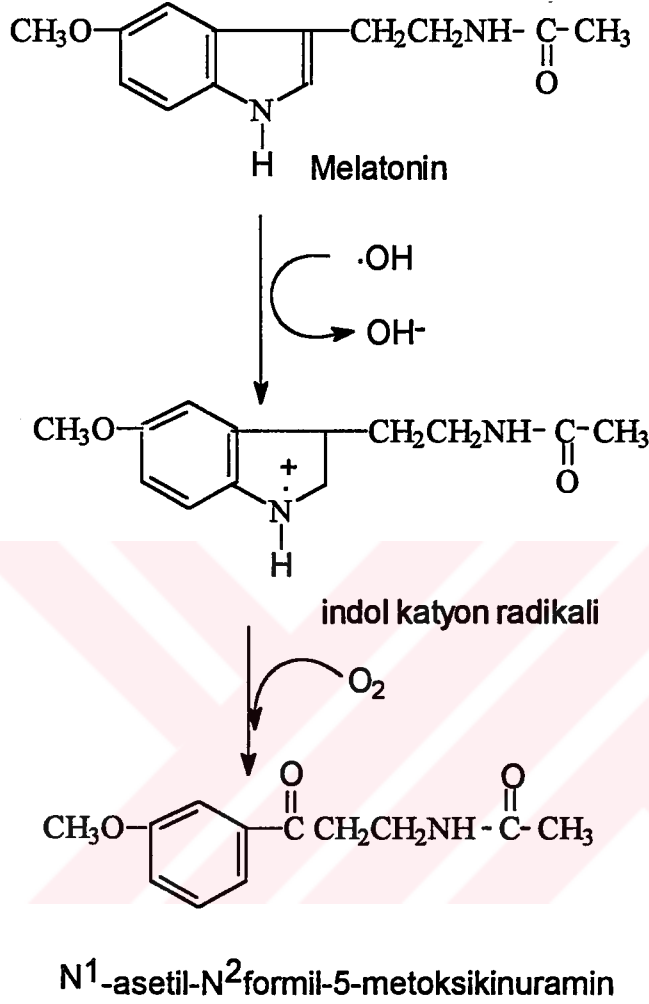
Melatoninin ilk dikkat çeken özelliği nöroendokrin-reproduktif aksis üzerine olan etkisidir.⁶⁸ Melatonin nöroendokrin sistem üzerinde pinal bezin etkilerine aracılık eden çok önemli bir hormondur.⁶⁹ Daha sonra immün sistem üzerine olan etkileri fark edilmiştir. 80'li yılların sonunda ise onkostatik ve yaşlanmayı geciktirici özelliği ortaya konan melatoninin son 5 yıldır serbest radikal yakalama özelliği üzerinde durulmaktadır. Aslında melatoninin tüm bu özellikleri, serbest radikal yakalayıcı bir özelliğinin sonucudur. Melatonin, iyi bilinen bir diğer serbest radikal tutucu olan glutatyondan 5 kez, mannitolden ise 14 kez daha efektifir.

70,71

1.14.1.Melatonin metabolizması

Melatoninin başlangıç prekürsörü olan triptofan bir indol aminoasiti olup, pineal bez tarafından plazmadan konsantrasyon gradientine karşı aktif transport mekanizması ile alınır. Triptofan pinealosit içinde triptofan hidroksilaz enzimi ile hidroksile edilip, 5-

hidroksitriptofan oluşur. 5-hidroksitriptofanaromatik L-aminoasit dekarboksilaz ile dekarboksile edilerek 5-hidroksitriptamin (= seretonin) haline gelir.⁶⁸



Şekil 1.10. Melatonin tarafından serbest radikal tutuklanmasının tahmin edilen mekanizması⁷⁶

Melatonin, memelilerin reproduksiyon olaylarını koordine eden bir sinyal görevi de yapar. Melatonin iki enzim etkisi ile seretoninden sentezlenir. Enzimlerden birisi N-asetil transferazdır, ve seretoninin asetile edilmesini sağlar. Diğeri hidroksiindol-o-metiltransferazdır ve indol halkasının metile edilmesi ile görevlidir.⁷² Melatonin intravenöz enjeksiyonu takiben kandan, intrasisternal enjeksiyonu takiben

beyinden süratle kaybolur. Başlangıçta yarı ömrü birkaç dakika iken, bu atılım daha uzun bir süreç alır. Melatoninin çoğu karaciğerde 6-hidroksimelatoninne konjüge olur ve sonradan idrarla atılır. Ancak sıçanda melatonin, N-asetilserotonine de metabolize olabilir. Beyinde metabolik yol periferden farklıdır. İnsanda da melatoninin verilmesini takiben plazma melatonin düzeyi hızla azalır.

Melatonin için efektif bir kan-beyin bariyeri yoktur ve dolaşımdaki melatonin tüm organlar tarafından alınır. Melatoninin % 70'i albümine bağlıdır. Gerek bağlı, gerek serbest melatonin kan ile beyin omurilik sıvısı (BOS) arasında çapraz geçiş halindedir.⁶⁸ Melatonin salgılanması büyük bir olasılıkla birçok fizyolojik fonksiyonlar için önemli olan bir gece-gündüz ritmini izler. Ayrıca mevsimsel bir ritmi de saptanmıştır.⁷³ Melatonin yapımı karanlıkta artar, ışıktaki inhiye edilir. Kısaca, memeli pinal bezi ışığın devamına, evresine ve şiddetine göre günlük melatonin salınımı meydana getirmektedir.⁷² Melatonin sentezi ve salınımı gece en yüksek düzeydedir.⁶⁸

1.14.2. Melatoninin etkileri

1958'de tanımlanan melatoninin yaşlanma karşıtı etkisi, immün düzenleyici, onkostatik ve nöroendokrin etkileri gibi pekçok fizyolojik fonksiyonları vardır. Son yıllarda melatoninin potent bir serbest hidroksil ve peroksil radikal tutucusu olduğu bildirilmektedir.⁷⁴

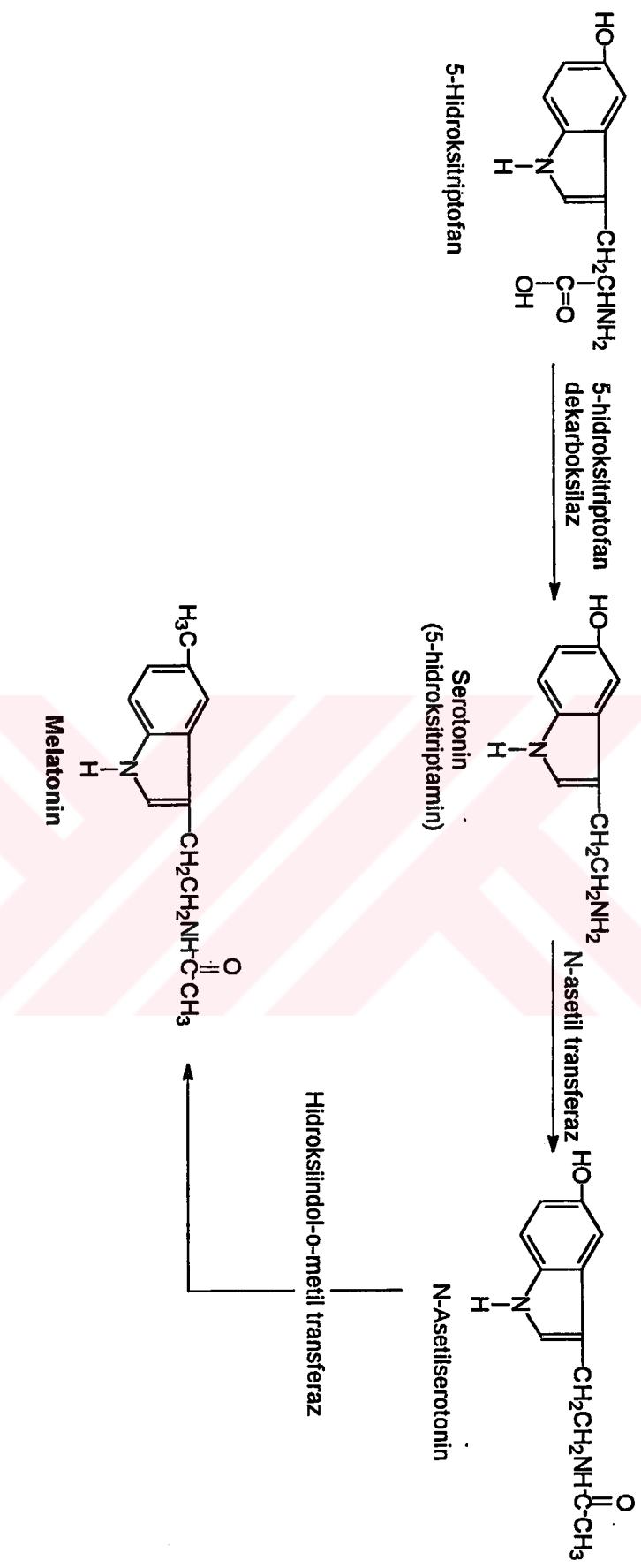
Melatonin immün yetmezlik durumlarında uygulandığında belirgin immün aktivasyona yol açmaktadır. Kanserin, azalmış melatonin salınımı ve azalmış immün reaktivite ile birlikte seyretmesi kanser immünoterapisinde melatoninin önemli bir terapötik ajan olabileceğini düşündürmektedir. Sıçanlarda pinealektomi sonucunda yumurtalık kanseri ve 7,12-dimetilbenzantrazen (DMBA) ile oluşan meme kanseri insidansında önemli derecede artma olduğu ve melatonin verilmesiyle dramatik olarak gerileme olduğu belirtilmiştir.⁶⁸ Porfirinlerin neden olduğu hücre hasarını önleyebilen bu hormonun antioksidan enzimler için

mRNA seviyelerini artırma ve porfirin sentezini azaltma yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir.⁷⁴

Melatonin en ilkelinden en gelişmişine bütün aerobik organizmalarda bulunan, evrim boyunca korunmuş bir moleküldür. Alg ve insanlar gibi farklı organizmalarda bulunur. Omurgalılarda, pineal bez bu indol aminin ana kaynağıdır ancak retinayı da içeren diğer çeşitli dokular tarafından da üretilebilir.⁷⁵

Melatonin çok yüksek derecede lipofilik bir ajandır. Buna karşın sanıldığı gibi hidrofobik değildir. Sudaki çözünürlüğü 5.10^{-3} M olarak tespit edilmiştir. Melatonin bu özelliği sayesinde kan-beyin bariyeri, kan-CSF bariyeri gibi bütün morfofizyolojik bariyerleri kolayca geçer ve tüm subselüler kompartmanlarda süratle difüze olur.⁶⁹

Reaksiyon mekanizması melatoninin önemli bir özelliğinin aydınlatılmasında kullanılır. Yani uç radikal reaksiyon zincirleri ile etkileşir ve askorbat, α -D-tokoferol ve glutatyon içeren diğer süpürücüler gibi redoks çeviriminde yer almaz.



Şekil 1.11. Melatonin sentezi 72

Zincir kıran antioksidanlar askorbat, trolox ve GSH etkin radikal süpürücü ve elektron donörleridir. Bu antioksidanların birlikte çalışabildiği bilinir. Keza, melatoninin serbest radikal süpürücü ve antioksidanların randıman oranını artırmada askorbat ve GSH ile birlikte çalışabildiği de gösterilmiştir.⁷⁷

Serbest radikal süpürücü aktiviteye sahip olduğu kabul edilmesine ilaveten melatoninin glutatyon sentaz aktivasyonu sayesinde glutatyon sentezini düzenleyebilirliği önerilmiştir. Diğer taraftan melatoninin ağız yoluyla verilmesinin rat beyinde GSH-Px aktivasyonunu iki kat arttırdığı rapor edilmiştir.⁷⁵

Yüksek konsantrasyonlarda melatoninin varlığı özellikle nöronal dokularda ve kısmen de hücre çekirdeğinde daha ileriki yaşların sağlığı ve uzun ömürlülüğü için önemli ön şart gösterir.⁷⁶

Princ ve arkadaşlarının 1998'de yaptıkları çalışmada δ -aminolevulinik asit (ALA) ile indüklenen oksidatif hasara karşı melatonin ile *in vivo* korunma incelenmiş ve melatoninin farmakolojik dozunun etkisiyle serebral korteks ve serebellumun herikisindeki lipid peroksidasyonunun ALA ile indüklenmesini önlediği veya azalttığı gözlenmiştir.⁷⁸

Çeşitli toksinlerin neden olduğu oksidatif hasara karşı melatoninin koruyucu etkisi *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gözlenmiştir.^{68,77}

1.15. Radyoaktiflik

Radyoaktiflik, Henri Becquerel tarafından 1896' da keşfedilmiştir. Radyoaktiflik, radyoaktif cisimlerin kendiliğinden bir parçalanma sonucu fotoğraf plaklarına etki edebilmeleri ve/veya gazları iyonlaştırıp elektrige iletken kılarak ve çeşitli olaylarla radyasyon yayabilme özelliğidir.⁷⁹

α Parçacıkları: Alfa (α) parçacıkları helyum-4 atomlarının çekirdeğidir. Alfa parçacıkları yayılmasını radyoaktif çekirdekten iki proton ve iki nötron atılması sonucu enerji bakımından daha kararlı yeni bir çekirdek meydana gelmesi süreci olarak düşünülür.

β Parçacıkları : Beta (β) parçacıkları, alfa parçacıklarından daha az iyonlaştırma etkisine rağmen daha fazla deliciliğe sahiptirler. Beta parçacıkları negatif olarak yüklenmişlerdir. Elektrik ve manyetik alanda alfa parçacıklarına göre zıt yönde ve kütleleri daha küçük olduğu için daha fazla saparlar. β ışınlarını primer ve sekonder olmak üzere iki gruba ayırmak mümkündür. Bir primer β ışını çekirdekte bir nötronun bir protona dönüşmesi sırasında meydana gelir.



Çekirdek dışından gelen ışınlara ise sekonder ışınlar denir.

γ Işınları : Gama ışınları (γ), α ve β parçacıkları oluşturan bazı radyoaktif bozunma tepkimeleri sonunda çekirdeğin enerjili halde kalmasıdır. Çekirdek daha sonra elektromanyetik ışına şeklinde enerji kaybeder yani gama (γ) ışını yayınlanır. Gama ışınlarının etki gücü çok yüksektir.^{80,81,82}

1.15.1 Radyoaktif ışının doz birimleri

Bir radyoaktif numunenin radyoaktifliğini göstermek için birim zamanda parçalanmış atom sayısı alınır. Herhangi bir radyoaktif cisim saniyede $3,7 \cdot 10^{10}$ parçalanma verirse bu cismin radyoaktifliğine *1 Curie (Ci)* denir. Bu, 1 gram Radyum'un 1 saniyede verdiği α taneciği sayısıdır. 1 kg. madde başına $1 \cdot 10^2$ J. Enerji depolayabilen ışın dozu *Rad* olarak verilir. *Rem* ise Rad ile ilgili bir birimdir. Fakat aynı enerjili farklı tipteki ışınların biyolojik maddeler üzerine etkisini göz önüne alır. Rad, ışın türüne göre bir faktör ile çarpılarak Rem'e çevrilir. SI birimler sisteminde radyoaktiflik birimi *Becquerel (Bq)* olup, saniyede 1 dezentasyona karşılıktır.

1 Becquerel, saniyede bir bozunmaya eşit olan radyoaktivite olup $3,7 \cdot 10^{10}$ becquerel = 1 Curie ve $1 \text{ Bq} = 2,70 \cdot 10^{-11} \text{ Ci}$ dir.^{81,82}

1.15.2. Radyoaktif diziler

Bugün doğada rastlanan 56 kadar radyoelementin, atom numarası $Z= 8$ ile $Z= 92$ arasındadır. Bütün radyoelementler dört radyoaktif değişim dizisi oluştururlar. Bunlar:

- Thoryum Dizisi
- Uranyum dizisi
- Aktinyum dizisi
- Neptinyum dizisi

Bu dizilerden hiçbirine girmeyen başka radyoelementler de bulunmuştur. Bunların çoğunun yarılanma süresi çok uzun ve izotop sayısı çok düşüktür.

1.15.3. Radyoizotopların kullanılması

Tıp ve biyolojide radyoizotopların şu iki niteliğinden yararlanılır:

- Kolayca izlenerek, yerlerinin kolay tayin edilebilmesi,
- Fazla miktarda verildiklerinde dokuyu tahrip ve hatta imha edebilme nitelikleri.

Birinci niteliğinden teşhiste, ikincisinden ise tedavide yararlanılır.

Kimyasal araştırmalarda radyoizotopların kullanılması řu varsayıma dayanır: Aynı bir elementin radyoaktif olmayan izotoplarının, izotopik etki dışında, kimyasal özelliği aynıdır. Radyoaktif cisimler verdikleri radyasyonlarla izlenirler ve çok az miktarda dahi olsalar tayin edilmeye elverişlidirler. Genellikle řu hususlara dikkat edilir:

- a) Uygun radyoizotopun eldesi ve karakterizasyonu
- b) Radyoizotopun ayrılması
- c) Radyosentez
- e) Örneklerin uygun bir sayıcıda incelenmesi.⁸²

Radyoizotoplar tarafından salınan ışınlar Geiger-Müller sayıcısı ve Sintilasyon sayıcısı gibi özel olarak geliştirilmiş aygıtlar kullanılarak saptanmaktadır.⁸³

1.15.4. Sintilasyon sayıcıları (sintillation counters)

Son yıllarda radyasyon ölçülmesinde en hızlı bir gelişme gösteren alet sintilasyon sayıcılarıdır. Sintilasyon sayıcılar, yüksek enerjili taneciklerin ya da gama ışınlarının flor veya fosfor üzerine gönderilmeleri suretiyle meydana gelen radyasyonları önce bir fotokatot üzerine gönderip burada meydana gelen fotoelektronları fotomultiplikatörden geçirmek suretiyle sayılarını artırarak ve sonunda bunları bir kaydedici cihazda tespit ederek sayım yaparlar. Bir sintilasyon sayıcı sistemi Kristal-fotokatod-fotomultiplikatör sistemi, yüksek voltaj redresörü, amplifikatör, diskriminatör ve sayıcı devre denilen cihaz parçalarından kuruludur.⁸⁴

2. DENEYSEL BÖLÜM

2.1. Materyal ve Yöntem

2.1.1. Deneyleerde kullanılan kimyasal malzemeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan NADPH (β - Nikotinamid adenin dinükleotid), DTT (Dithiothreitol), Antipain, Pepstatin A, Leupeptin, EGTA (Etilenglikol-bis (β - aminoetileter)-N, N,N¹, N¹- tetraasetik asit), L- sitrulin, NaCl, NaN₃, BSA (Bovine serum albumin), Sintilasyon kokteyli, Melatonin, Folin –fenol belirteci, Hapes (N- (2- hidroksietil) piperazin-N¹- (2- etansülfonik asit)), Pipes (piperazin – N, N¹- bis (2- etan sülfonik asit)) Sigma'dan alınmıştır. NADP-Na₂ (nikotinamid), CaCl₂, EDTA (Etilen diamin tetraasetik asit), PMSF (Fenil metan sülfonid florid), Tris (hidroksimetil aminometan), NaOH, HCl, Na₂CO₃, CuSO₄, Na, K – tartarat Merck'ten, L- arjinin Fluka'dan, N^G - nitro -L – arjinin (Narg) Indofine'dan, L – (2, 3, 4, 5 – ³H)- arjinin Amersham'dan, Dowex AG 50 W – X8 reçine Bio–Rad'dan, NOS (Rekombinat Rat Nöral NOS) Stratagen' den, Doksorubisin Hidroklorür (ADR) Carlo Erba'dan temin edilmiştir.

2.1.2. Materyal

Bu çalışmada deney materyali olarak Ankara Hıfzısıhha Enstitüsü Hayvan laboratuvarından temin edilen 62 adet erkek Albino Wistar türü sıçan kullanılarak 10 ayrı deney grubu oluşturulmuştur.

Gruplar; Kontrol, Plasebo, Adriyaminin 1. gün, Adriyaminin 6. Gün (yüksek doz), Adriyaminin 6.Gün (düşük doz) Melatonin 1. gün, Melatonin 6. gün, Melatonin + Adriyaminin 1. gün, Melatonin + Adriyaminin 6. gün (düşük doz), Melatonin + Adriyaminin 6. gün (yüksek doz) olarak belirlenmiştir.

2.1.3. Metod

Kontrol grubu olarak belirlenen sıçanlara hiçbir işlem uygulanmadı ve hayvanlar 7. günde sakrifiye edildi. Plasebo grubundaki sıçanlara ise altı gün boyunca hergün tek doz intraperitoneal olarak serum fizyolojik verildi ve hayvanlar 7.günde sakrifiye edildi. Adriyamisin 1. gün grubundaki sıçanlara ise bir gün tek doz Adriyamisin yüksek doz olarak (15 mg / kg) intraperitoneal olarak verildi ve hayvanlar 7.günde sakrifiye edildi.⁸⁵ Adriyamisin 6.gün yüksek doz grubundaki sıçanlara ise altı gün boyunca hergün tek doz (15 mg / kg) intraperitoneal olarak Adriyamisin verildi. Bu gruptaki hayvanlar beşinci ve altıncı günlerde öldüler. Adriyamisin 6. gün düşük doz grubundaki sıçanlara ise altı gün boyunca hergün tek doz (5 mg / kg) intraperitoneal olarak Adriyamisin verildi ve hayvanlar 7. günde sakrifiye edildi. Melatonin 1. gün grubundaki sıçanlara ise bir gün tek doz (5 mg / kg) intraperitoneal olarak Melatonin verildi ve hayvanlar 7. günde sakrifiye edildi.^{86,87,88} Melatonin 6. gün grubundaki sıçanlara ise altı gün boyunca hergün tek doz (5 mg / kg) intraperitoneal olarak Melatonin verildi ve hayvanlar 7.günde sakrifiye edildi. Melatonin + Adriyamisin 1. gün grubundaki sıçanlara Melatonin bir gün tek doz (5mg / kg) ve Adriyamisin bir gün tek doz (15 mg / kg) şeklinde aynı anda intraperitoneal olarak verildi ve hayvanlar 7. günde sakrifiye edildi. . Melatonin + Adriyamisin 6. gün (düşük doz) grubundaki sıçanlara Melatonin altı gün boyunca hergün tek doz (5mg / kg) ve Adriyamisin altı gün boyunca hergün tek doz (5 mg / kg) şeklinde aynı anda intraperitoneal olarak verildi ve hayvanlar 7. günde sakrifiye edildi. Melatonin + Adriyamisin 6. gün (yüksek doz) grubundaki sıçanlara Melatonin altı gün boyunca hergün tek doz (5mg / kg) ve Adriyamisin altı gün boyunca hergün tek doz (15 mg / kg) şeklinde aynı anda intraperitoneal olarak verildi ve hayvanlar 7. günde sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen ratlarda organlar PBS (fosfat tamponu pH 7.4) ile perfüze edildi. Elde edilen beyin dokuları sıvı nitrojende donduruldu. Beyin dokularının homojenizasyon işlemi aşağıda belirtildiği sıra ile yapıldı.

Homojenizasyonda kullanılan çözeltiler:

- 1) 100 mL 50 mM Tris- HCl içinde 1mM EDTA ve 1 mM DTT
- 2) 0.1 mM PMSF içinde 10 µg / mL Antipain, Leupeptin ve Pepstatin A

Rat beyin dokusu bu iki çözelti karışımında % 10' luk (W / V) şeklinde PVC, Kinematica, Status homojenizatörü ile tüm doku parçalanana kadar homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar, VWR Branson Scientific sonifikatörde 30 sn' lik aralıklarla üç defa 30 sn süreli sonifiye edildi. Homojenizasyon ve sonifikasyon işlemlerinin ardından 1 saat süre ile 10.000 g. 'de + 5 °C de Ole Dish 157 MP mikrosantrifüj aleti ile santrifüj edildi. Beş beyin dokusundan elde edilen süpernatantlar birleştirildi.

Süpernatantlarda Lowry yöntemine göre protein tayini yapıldı. Daha sonra Dowex AG- 50 WX-8 Na⁺ formundaki kolondan geçirilen süpernatantlar arjininden arındırıldı. Tekrar protein tayini ve radyometrik NOS enzimi aktivitesi ölçümleri yapılmak üzere süpernatantlar -80°C de donduruldu.

2.2. Protein Tayini

Beyin dokusundan elde edilen süpernatantlara kolon kromatografisi öncesi ve sonrasında olmak üzere Lowry yöntemi uygulandı.⁸⁹

Lowry yöntemi için hazırlanan çözeltiler şunlardır:

A Çözeltisi

% 2' lik Na₂CO₃ ' ın 0.1 N NaOH deki çözeltisi: 100 hacim

% 2' lik Na, K- Tartarat çözeltisi: 1 hacim

% 1' lik CuSO₄ çözeltisi: 1 hacim

A çözeltisi yukarıda belirtilen hacim oranlarında günlük olarak hazırlandı.

B Çözeltisi

Folin – Fenol belirteci: 1 hacim

Bidistile su: 1 hacim

BSA Çözeltisi

1 mg / mL konsantrasyonundaki stok standart protein çözeltisinden (BSA) çalışma aralığına göre 10, 20, 30, 40, 50, 60,..... , 100 µg / mL' lik çözeltiler hazırlandı. Protein tayini ise aşağıdaki sıra ile yapıldı:

- 1) Kör, değişik konsantrasyonlarda hazırlanan BSA'lar ve numuneler için ayrı tüpler kullanılarak, her tüpe 2.5 mL A çözeltisinden eklendi.
- 2) BSA tüplerine belirtilen hacimlerde BSA çözeltisinden, numune tüplerine ise deney şartlarına bağlı olarak 2 veya 4 µL'lik örnek çözeltileri eklendi.
- 3) Tüpler vortekste karıştırılarak 10 dk. bekletildi.
- 4) Hazırlanan folin belirtecinden tüm tüplere 250 µL eklendi. Tüpler vortekste tekrar karıştırılarak, renk oluşumunun sonuçlanması için 45 dk. karanlıkta bekletildi.
- 5) Karanlık ortamdan çıkarılan çözeltilerdeki protein tayinleri Shimadzu UV-1601 UV-Visible Spektrometresi kullanılarak 695 nm'deki absorpsiyon değişimi kullanılarak hesaplandı.
- 6) Standart BSA çözeltileri kullanılarak hazırlanan kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak her tüpteki süpernatanın 1 mL' sindeki protein miktarı hesaplandı.

2.3. Kolon Hazırlanışı

A- 50 Tamponu ve Dowex AG 50 W-X8 reçinesi kullanılarak kolon dolgu maddesi hazırlandı.

A- 50 Tamponunun Hazırlanışı:

-Trizma baz 50 mM

-NaCl 500 mM

-EDTA 1mM

-NaN₃ 1 M

- Der. HCl ile pH ayarlanarak distile su ile litreye tamamlandı.

Protokol:

- 1) Her bir gradient tüp için bir kolona Dowex AG 50 W-X8 reçinesinin yaklaşık 1.5 mL'si kullanıldı.
- 2) Reçine hacimce 2.3 mL fazlası kadar A- 50 tamponuna eklendi ve kolona bir defada dolduruldu.
- 3) Kolon 20 mL A- 50 tamponu ile yıkandı.
- 4) Örnekler A-50 tamponuyla eşit hacimde seyreltilerek kolona alındı ve akış hızı ayarlandı
- 5) 1.5 mL A- 50 tamponu kolona ilave edilerek kolon yıkandı.⁹⁰

Her bir numune için ayrı ayrı kolon hazırlandı. Süpernatantlar kolona tatbik edildikten sonra tekrar Lowry yöntemi uygulanarak bağlanan protein miktarı belirlendi.

2.4. Standart NOS Ölçümü

2.4.1. Reaksiyon karışımlarının hazırlanışı

A Reaksiyon Karışımı:

- 100 mM Pipes NaOH
- 100 µM Arjinin
- 15 µM NADPH
- 1.25 mM CaCl₂
- 1 µg. Kalmodulin / mL
- 1 mM DTT

- 1 mM EDTA
- 3.0 mM Nikotinamid
- 10 µg. / mL Antipain, Pepstatin A ve Leupeptin
- 0.1 mM PMSF içerecek şekilde hazırlandı.

B Reaksiyon Karışımı:

A reaksiyon karışımına ilaveten 500 µM N^G- nitro-L- arjinin (NArg) içerecek şekilde hazırlandı.

A ve B reaksiyon karışımı arasındaki fark NOS aktivitesini temsil eder.^{91,92}

2.4.2. NOS' ın radyometrik ölçümü

2.4.2.1. A Reaksiyon karışımının ölçümü

Radyometrik ölçümde kullanılan reaksiyon karışımı A reaksiyon karışımına ilaveten L- (2, 3, 4, 5- ³H) arjinin (92.5 kBq / mL) içerir. A reaksiyon karışımından 100 µL disposable payrex tüpe eklenerek 25 ° C de 5 dk. inkübe edildi. Reaksiyonu başlatmak için 2 µL süpernatant reaksiyon karışımına ilave edildi ve 25 ° C de 30 dk. inkübe edildi

- 100 mM HEPES- NaOH
- 2 mM EDTA
- 2 mM EGTA
- 1 mM Sitrulin oranında hazırlanan reaksiyonu durdurma çözeltisinden 4 mL ilave edilerek 38 ° C de 90 dk. inkübasyona bırakıldı. Örnekler, Dowex AG- 50 WX 8 kolonundan geçirildi. Kolon iki kez ikişer mililitre distile su ile yıkandı.

2 mL akışta radyoaktivite sıvı sintilasyon sayacı (Beckman LS 5000 TD / TA) ile ölçüldü.

Sadece sintilasyon kokteyli kullanılarak ölçülen kör değerden çıkarıldı.^{91,92}

2.4.2.2. B Reaksiyon karışımının ölçümü

2.4.2.1' de olduğu gibi A reaksiyon karışımı L- (2, 3, 4, 5- ³H) arjinin içermektedir. Bu reaksiyon karışımına 500 µM N^G- nitro- L arjinin (Narg) ilave edilerek B reaksiyon karışımı hazırlandı ve 2.4.2.1' de uygulanan işlemler sırasıyla tekrarlanarak, 2 mL akıştaki radyoaktivite sıvı sintilasyon sayacı ile ölçüldü ve kör değerinden çıkarıldı. A ve B reaksiyon karışımı arasındaki farktan NOS aktivitesi hesaplandı.^{91,92}

$k = \text{cmp} - \text{background}$

$\text{dpm} = k / \text{efficient}$

$F = 1 / (2.22 \times \text{spesifik aktivite})$

$\text{Pikomol} = F \times \text{dpm}$

IU; 1 mikromol substratı 1 dakikada ürüne çeviren enzim miktarı olduğuna göre,

Spesifik aktivite; 1 mg. proteindeki enzim ünite sayısı olduğundan deneylerimizde kullandığımız L -(2,3,4,5- ³H) Arjinin monohidrokloritin spesifik aktivitesinden yola çıkarak yukarıdaki formüllere göre değerlerimiz IU olarak hesaplanmıştır.

2.5. İstatistik Hesaplamalar

Yapılan tüm enzim aktivite ve protein tayini deneylerinden elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve Mann Withney-U testi uygulanarak sonuçlar arasındaki farklar önem derecesiyle kıyaslanmıştır.

3. SONUÇ VE TARTIŞMA

Adriyamisin kullanılarak sıçan beyinde ortaya çıkarılan nöral oksidatif hasara melatoninin etkisini incelemek üzere oluşturduğumuz kontrol ve plasebo gruplarında, ölçülen NOS aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0.05$). Bu nedenle gruplar istatistiksel olarak sadece kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Kontrol grubu (0.06 ± 0.1 IU) ile diğer bütün gruplar arasında yapılan bu karşılaştırmanın sonucunda istatistiksel olarak önemli farklar bulundu ($p < 0.05$). Melatonin + ADR 1. Gün (yüksek doz) grubu (69.92 ± 4.25 IU) ile Melatonin + ADR 6. Gün (yüksek doz) grubu (672 ± 10.9 IU) arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p < 0.05$). Melatonin + ADR 6. Gün (düşük doz) grubu (975.8 ± 8.6 IU) ile Melatonin + ADR 1. Gün (yüksek doz) grubu (69.92 ± 4.25 IU) arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada, bu iki grup arasında anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$). Melatonin 1. gün (348 ± 4.4 IU) ile Melatonin 6.gün (1412.4 ± 14.4 IU) grupları arasındaki istatistiksel karşılaştırmada da gruplar arasında yine anlamlı fark elde edildi ($p < 0.05$) (Tablo 3.1-3.3).

Tablo 3.1. Sıçan beyin dokusunda NOS enzim aktivitesinin ADR 1. Gün (yüksek doz), ADR 6 gün (düşük doz), kontrol ve plasebo grupları arasındaki istatistiksel değerler.

	Adr 1. Gün (yüksek doz)	ADR 6 Gün (düşük doz)	Kontrol	Plasebo
	2220 ± 14 IU	545.4 ± 9.5 IU	0.06 ± 0.1 IU	0.07 ± 0.1 IU
ADR 1. Gün	-	-	-	-
ADR 6. Gün	-	-	-	-
Kontrol	P < 0.05	P < 0.05	-	P > 0.05
Plasebo	-	-	P > 0.05	-

Tablo 3.2. Sıçan beyin dokusunda NOS enzim aktivitesinin Melatonin 1. Gün, Melatonin 6. Gün, kontrol ve plasebo grupları arasındaki istatistiksel değerler.

	Melatonin 1. Gün	Melatonin 6. Gün	Kontrol	Plasebo
	348 ± 4.4 IU	1412.4 ± 14.4 IU	0.06 ± 0.1IU	0.07 ± 0.1IU
Melatonin 1. Gün	-	-	-	-
Melatonin 6. Gün	P < 0.05	-	-	-
Kontrol	P < 0.05	P < 0.05	-	P > 0.05

Tablo 3.3. Sıçan beyin dokusunda NOS enzim aktivitesinin ADR + Melatonin 1. Gün (yüksek doz), ADR + Melatonin 6. Gün (yüksek doz), ADR + Melatonin 6.gün düşük doz, kontrol ve plasebo grupları arasındaki istatistiksel değerler.

	ADR + Melatonin 1. Gün (yüksek doz)	ADR + Melatonin 6. Gün (yüksek doz)	ADR + Melatonin 6. Gün (düşük doz)	Kontrol	Plasebo
	69.92 ± 4.25 IU	672 ± 10.9 IU	975.8 ± 8.6 IU	0.06 ± 0.1IU	0.07 ± 0.1IU
ADR + Melatonin 1. Gün (yüksek doz)	-	P < 0.05	P < 0.05	-	-
ADR + Melatonin 6. Gün (yüksek doz)	-	-	P < 0.05	-	-
ADR + Melatonin 6. Gün (düşük doz)	-	-	-	-	-
Kontrol	P < 0.05	P < 0.05	P < 0.05	-	P > 0.05
Plasebo	-	-	-	P > 0.05	-

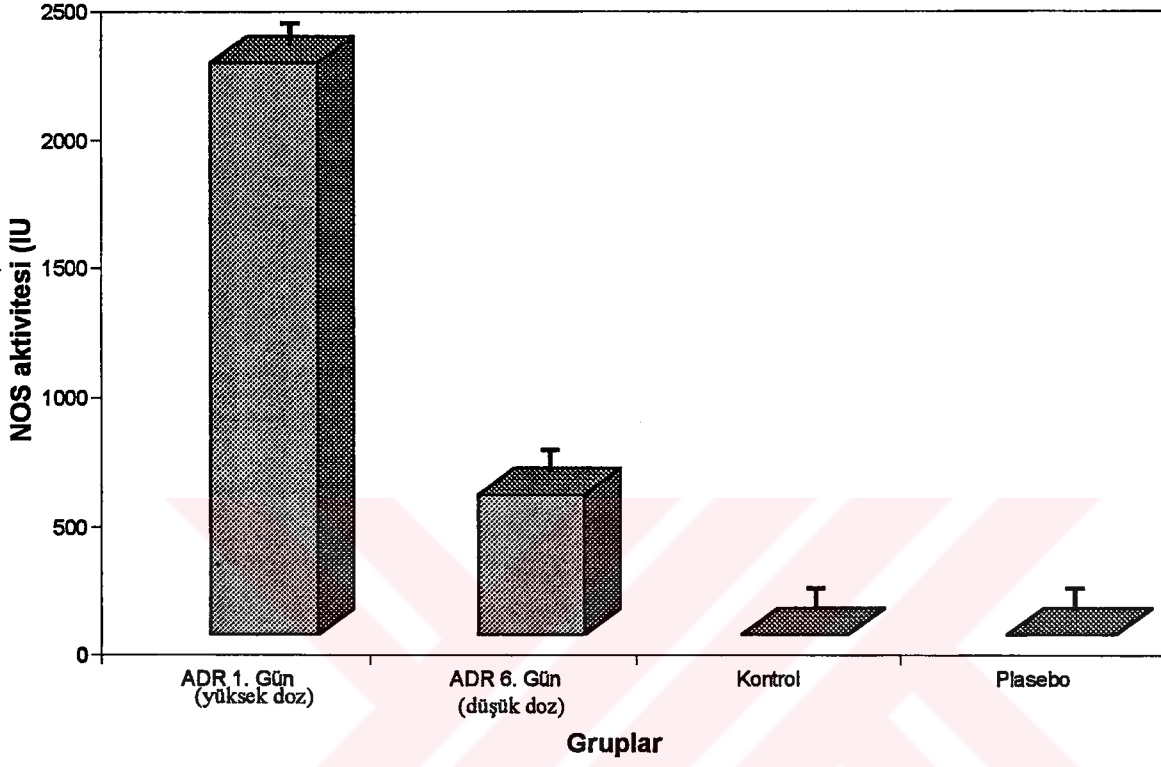
Çalışmamızda, literatürde belirtildiği gibi sıçan total beyin dokusu homojenatlarında kontrol (0.06 ± 0.1 IU) ve plasebo (0.07 ± 0.1 IU) gruplarında NOS aktivitesi düşük bulundu (tablo 3.4).⁹¹

Tablo 3.4. Sitrulin oluşum aktivitesinin nonspesifik NADP⁺ oluşum (NArg) aktivitesinden çıkarıldıktan sonra IU olarak bulunan NOS değerleri.

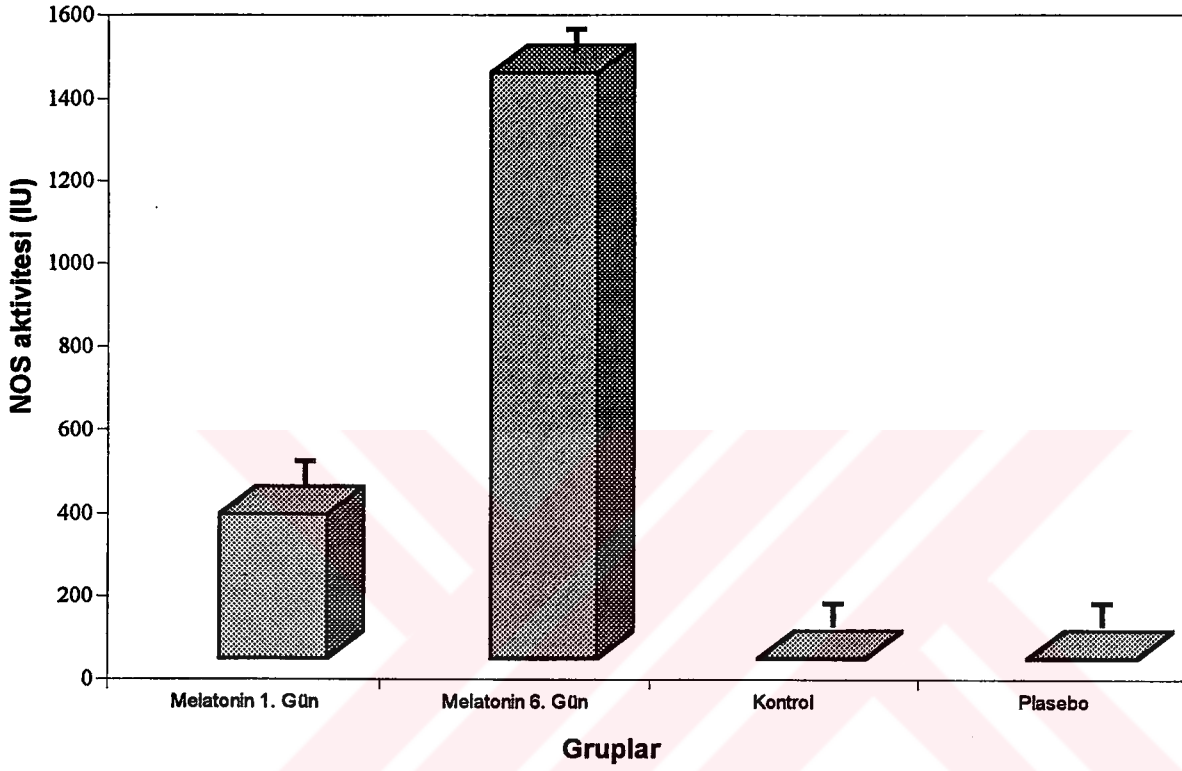
Gruplar	NOS Aktivitesi (IU)
ADR 1. Gün (yüksek doz)	2220 ± 14
ADR 6. Gün (düşük doz)	545.4 ± 9.5
Melatonin 1. Gün	348 ± 4.4
Melatonin 6. Gün	1412.4 ± 14.4
Melatonin + ADR 1. Gün (yüksek doz)	69.92 ± 4.25
Melatonin + ADR 6. Gün (yüksek doz)	672 ± 10.9
Melatonin + ADR 6. Gün (düşük doz)	975.8 ± 8.6
Kontrol	0.06 ± 0.1
Plasebo	0.07 ± 0.1

Çalışma gruplarımızda, ADR bir gün yüksek dozda verildiğinde hücrede çok çabuk hasara sebep olduğundan NOS mRNA transkripsiyonu ve NOS sentezi artmaktadır. ADR bir gün yüksek dozda verildiğinde hayvanın buna tahammül edebildiği gözlemlendi (2220 ± 14 IU) . Ancak, ADR 6 gün boyunca yüksek dozda verildiğinde 5. ve 6. günlerde sıçanlar öldü. Otopsi sonuçları ve histopatoloji sonuçlarına göre kalpte spazm

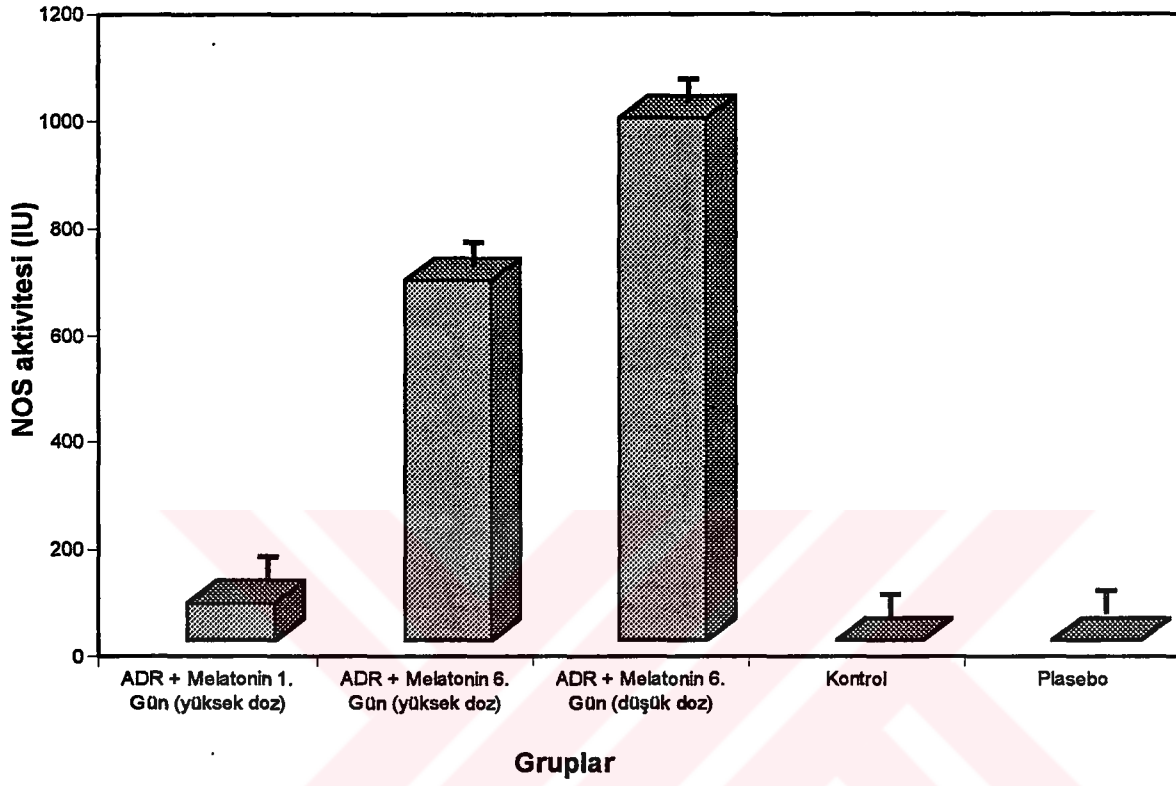
ve bunu takiben karaciğer ve böbrek dokularında hücre membranı tahribiyeti görüldü. Yüksek dozda uzun süreli ADR uygulamasının kilo kaybına yol açtığı ve ölüme sebebiyet verdiği tesbit edildi. ADR 6 gün düşük dozda verildiğinde, dozun düşük olmasına rağmen uzun süreli verilmesi nedeniyle hayvanın etkilendiği gözlemlendi. ADR 6 gün süreyle düşük dozda verildiğinde hücre hasarı, yüksek dozlu bir günlük ADR'nin dörtte biri kadardır (545.4 ± 9.5 IU). ADR 6 gün boyunca düşük dozda verildiğinde yüksek dozdan daha az da olsa hücrede toksik etki göstermektedir. Melatonin 1. gün (348 ± 4.4 IU) ve 6. günde (1412.4 ± 14.4 IU) NOS' u sinerjik ve zamana bağlı olarak aktive ettiği düşünülmektedir. Melatonin bir gün bir doz verildiğinde ADR' nin hücre toksik etkisini giderebilmektedir. Melatonin 6. gündeki NOS aktivitesi stimülasyonu 6 gün yüksek doz ADR verildiğinde yarı yarıya düşmektedir. Hücre hasarının olmadığı yerlerde normal NOS aktivitesi azdır (Şekil 3.1-3.3). Melatonin + Adriyamisin 1. gün yüksek doz grubu (69.92 ± 4.25 IU) ile Melatonin + Adriyamisin 6. gün yüksek doz grubu (672 ± 10.9 IU) karşılaştırıldığında; 6. gündeki aktivitenin daha yüksek olduğu görülmektedir. Yüksek dozda melatonin hergün verildiğinden kümülatif etki göstermektedir ve koruyucu etkisi daha fazladır. Melatonin + Adriyamisin 6. gün yüksek doz grubu (672 ± 10.9 IU) ile Melatonin + Adriyamisin 6. gün düşük doz grubu (975.8 ± 8.6 IU) karşılaştırıldığında ise yüksek doz grubunda melatoninin koruyucu etkisinin daha az olduğu görülmektedir. Bu nedenle adriyamisin düşük dozdaki etkisine karşı melatoninin tam koruyucu etkisi ile oksidatif hasar önlenebilmektedir.



Şekil 3.1. Adriyaminin (ADR), kontrol ve plasebo grupları arasındaki NOS aktivitesinin karşılaştırılması.



Şekil 3.2. Melatonin, kontrol ve plasebo grupları arasındaki NOS aktivitesinin karşılaştırılması.



Şekil 3.3. Adriyamisin (ADR) + Melatonin, kontrol ve plasebo grupları arasındaki NOS aktivitesinin karşılaştırılması.

ADR 6. gün (düşük doz) grubu ile ADR 6. gün (yüksek doz) grupları otopsi yapılarak makroskopik olarak karşılaştırıldığında düşük doz grubunda makroskopik olarak dokularda hasar (yapışıklık, nekroz) gözlenmedi. Ayrıca, Melatonin + ADR 6. gün (yüksek doz) grubu (672 ± 10.9 IU) ile Melatonin + ADR 6. gün (düşük doz) grubu (975.8 ± 8.6 IU) makroskopik olarak karşılaştırıldığında yine düşük doz Melatonin + ADR 6. gün grubunda, yüksek doz grubuna göre dokularda belirgin bir hasar gözlenmedi.

Son yıllarda insanlarda yol açtığı tahribatla çeşitli hastalıklara neden olan oksidatif stres birçok araştırmaya konu olmuştur. Oksidatif stres reaktif oksijen türlerinin artması ve/veya antioksidan savunma sisteminin tam etkili çalışmaması sonucu ortaya çıkabilir. Antioksidan savunma ayrıca antioksidan alımındaki azalma neticesinde (örneğin, vitamin C ve E) veya antioksidanların fazla kullanımı sonucu gelişebilir. Santral nevroz sistemde NO nörotoksik ve nöromodülatör etkilerin herikisine de sahip bir nöronal mesajcıdır.³⁷ Fazla aktif nöronlar aşırı miktarda NO meydana getirir ve bu da beyin hastalıkları ile NO arasında ilişki kurulmasına neden olur.³⁷ NO üretildiği dokuya spesifik olarak farklı etki gösterir. Nöral NOS (nc-NOS)' dan üretilen NO merkezi ve periferal nevroz sistemlerde nörotransmisyona karışır, nörodejenerasyonda anahtar rol oynar.⁵⁶ Literatürde granüler ve moleküler tabakaların dondurulmuş kuru örneklerinin düşük NOS aktivitesi gösterdiği, beyaz maddenin ise çok düşük NOS aktivitesi içerdiği belirtilmiştir. Ayrıca belirtilen yöntemle göre analiz edilen sıçan organları arasında serebellumun en yüksek NOS aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Serebrum ve beyin gövdesi diğer organlara göre daha yüksek aktivite gösterir. Adrenal bez, kalp ve dalak beyinden daha yüksek aktivite gösterir. Dişi seks organlarında (uterus, ovidak, overi) hiçbir aktivite ölçülememiştir. Testis ve prostat gibi erkek seks organlarında ise çok düşük aktivite tespit edilmiştir. Benzer sonuçlar aynı dokulardan immünohistokimyasal olarak da elde edilmiştir.⁹¹

Normalde beyindeki NOS aktiviteleri düşük olmasına rağmen radyometrik ölçüm yöntemi ile NOS aktivitesi daha duyarlı olarak ölçülebilmektedir. Bu çalışmada NOS aktivitesini radyometrik yöntem ile belirleyerek, sıçan beyin dokusunda ADR ile indüklenen nöral oksidatif hasara karşı melatoninin koruyucu etkisini gözledik. Çeşitli toksinlerin neden olduğu oksidatif hasara karşı melatoninin koruyucu etkisi *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda gözlenmiştir.^{69,78}

NO bütün memeli hücreleri tarafından üretilen reaktif radikal bir gazdır. Hücreye toksik etkisi ve de serokontrol etkisi vardır. NO biyosentezi kompleks bir yapıya sahiptir. Şöyle ki L-arjinin , O₂ ve NADPH kosubstrat; FMN, FAD, hem ve tetrahidrobiopterin kofaktör ve NO ile sitrulin ise ortak ürün olarak NOS (bir dioksigenaz) tarafından katalize edilen reaksiyon ürünü olarak ortaya çıkar. Beyinde Ca⁺² arttığı durumlarda kalmodulin NOS 'a bağlanır ve onu aktive eder, böylece özellikle serebellumda NOS' lar devamlı olarak sentezlenir. Ca⁺² az ise bazal seviye düşüktür.⁷⁵

ADR rat CNS lipid peroksidasyonunun artışına sebep olur. Bunu da tiobarbütirik asit reaktantlarının NADPH bağımlı artışına sebep olarak yaptığı gösterilmiştir.⁵⁶ ADR devamlı kullanımda kardiyak hücrelerde birikiminden oluşan toksik etkiye sahiptir. Bu da tedavide kullanılmasını kısıtlar. ADR'in bu etkisini azaltma çalışmaları arasındaki en önemli çalışma serbest radikal süpürücüleri ile serbest radikal reaksiyonunu bloke etmektir. Antioksidan enzimlerin (SOD, CAT, GPX), ADR' in sitotoksik etkisini azalttığı görülmüştür.⁵⁶ Bulgularımız literatürle uyumludur. Şöyle ki sıçanların ADR uygulandıktan sonra 2.5 saat içinde titreme nöbetine ya da komaya girdikleri belirtilmiştir. Sıçanlarda periferal ganglion hücrelerinde yüksek doz ADR verildikten sonra nekroz görüldüğü, düşük doz ADR verildiğinde ise nekrozun 2 gün sonra ortaya çıktığı belirtilmiştir.⁵⁷ Son yıllarda melatoninin potent bir serbest hidroksil ve peroksil radikal tutucusu olduğu bildirilmektedir.⁷⁴ Kanserin, azalmış melatonin salınımı ve azalmış immün reaktivite ile birlikte seyretmesi kanser immünoterapisinde melatoninin

önemli bir terapötik ajan olabileceğini düşündürmektedir.⁶⁸ Melatonin beyinde antioksidan etki gösterir.^{75,87,88} Daha önce yapmış olduğumuz “Deneysel Subaraknoid Kanama Modeline Kan Antioksidan Enzimlerinde Değişiklikler ve Melatoninin Etkisi” ve “Deneysel Subaraknoid Kanama Modeline Beyin Sapı Antioksidan Enzimlerinde Değişiklikler ve Melatoninin Etkisi” konulu çalışmalarımızda da yine melatoninin koruyucu etkisini gözlemiştik.^{87,88} Bu çalışmanın orjinalliği, ADR’ nin sitotoksitesi nedeniyle beyinde ortaya çıkan nörodejeneratif etkinin, oksidatif hasar süpürücüsü olarak kabul edilen melatonin tarafından azaltılabileceğinin gösterilmiş olmasıdır. Bu etki ADR’ nin dozu ile ters orantılıdır.

Melatoninin antioksidan olarak ADR ile birlikte verilışı deneylerimizden de görüldüğü gibi ADR’ in tedavideki kullanımından doğan serbest radikal artışını yavaşlatarak, ADR’ li terapide yeni bir gelişmeye yol açacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

- 1) H. Sies, *Klin Wochenschr*, 1991, **69**, 965.
- 2) H. Sies, *Angew. Chem. Int. Engl.*, 1986, **25**, 1058.
- 3) J. Delattre, D. Bennefont-Rousselot, *Biotech Lab. International*, 1998, March-April, 21.
- 4) J. P. Kehrer, *Critical Reviews in Toxicology*, 1993, **23** (1), 21.
- 5) K. Kılıç, *Biyokimya Dergisi*, 1985, **X** (2), 60.
- 6) C. Rice-Evans, R. Burdon, *Prog. Lipid Res.*, 1993, **32** (1), 71.
- 7) *Randox*, 1994, October, 1.
- 8) Bölüm Yazarı: E. Y. Sözmen, Yazarı: T. Onat, K. Emerk, *Temel Biyokimya*, 1997, **2**, 520.
- 9) R. Şekeroğlu, R. Aslan, *Klinik Lab.Araştırma Dergisi*, 1997, **1** (2).
- 10) Ç. Öztürk, E. M. Gözükara, *Journal of Turgut Özal Medical Center*, 1997, **4** (1), 33.
- 11) B. Halliwell, M. Grootveld, *Febs Letters*, 1987, **213** (1), 9.
- 12) J. A. Jesberger, J. S. Richardson, *Intern. J. Neuroscience*, 1991, **57**, 1.
- 13) R. K. Murray, P. A. Mayes, D. K. Granner, *Harper'ın Biyokimyası*, 1993, 181.
- 14) K. H. Cheeseman, *Molec. Aspects Med.*, 1993, **14**, 191.
- 15) A. Seven, G. Candan, *Biyokimya Dergisi*, 1995, **XX** (4), 43.
- 16) W. Wasowicz, J. Neve, A. Peretz, *Clin. Chem.*, 1993, **39** (12), 2522.
- 17) M. Yamaguchi, S. Kishi, T. Hoshi, *Biol. Pharm. Bull.*, 1993, **16** (11), 1179.
- 18) V. Nair, C. S. Cooper, D. E. Vietti, G. A. Turner, *Lipids*, 1986, **21** (1), 6.
- 19) P. A Ward, G. O. Till, J. R. Hatherill, *J. Clin. Invest.*, 1985, **76**, 517.
- 20) E. B. Hoving, C. Laing, H. M. Rutgers, M. Teggeler, J. J. Van Doormaal, F. A. J. Muskiet, *Clinica Chimica Acta*, 1992, **208**, 63.
- 21) A. H. Waterfall, G. Singh, J. R. Fry, C. A. Marsden, *Brain Research*, 1996, **712**, 102.
- 22) Y. Noda, P. L. McGeer, E. G. McGeer, *Journal of Neurochemistry*, 1983, **40** (5), 1329.

- 23) M. Comporti, *Laboratory Investigation*, 1985, **53** (6), 599.
- 24) Ü. Kısa, Ö. Çiklatekerlioğlu, *Biyokimya Dergisi*, 1997, **22** (3), 12.
- 25) C. E. Cross, B. Halliwell, E.T. Borish, W. A. Pryor, B. N. Ames, R. L. Saul, J. M. McCord, D. Harman, *Annals of Internal Medicine*, 1987, **107**, 526.
- 26) S. Habif, I. Mutaf, N. Turgan, O. Bayındır, *Biyokimya Dergisi*, 1995, **XX** (4), 7.
- 27) P. Gaentani, D. Lombardi, *Journal of Neurosurgical Sciences*, 1991, **39** (1), 1.
- 28) L. Guemouri, Y. Artur, B. Herbeth, C. Jeandel, G. Cundy, G. Siest, *Clin. Chem.* , **37** (11), 1932.
- 29) J. T. Coyle, P. Puttfarcken, *Science*, 1993, **262**, 689.
- 30) A. Telefoncu, *Tıp ve Fen Bilimciler İçin Biyokimya*, 1988, 346.
- 31) B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *The Lancet* , 1984,1397.
- 32) H. Ak, N. T. Dingiloğlu, S. Habif, H. Kültürsay, O. Bayındır, T. Onat, *Türk J. Med. Sci.*,1996, **26**, 11.
- 33) Bölüm Yazarı: N. Özer, Yazarı: T. Onat, K. Emerk, *Temel Biyokimya*, 1997, 808.
- 34) *Randox*, İlaç Tanıtım Broşürü,1995, April, 1.
- 35) A. Noyan, *Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji* ,1993, 285.
- 36) B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *HNS*, 1983, 22.
- 37) T. Özben, *Free Radicals, Oxidative Stress and Antioxidants*, 1998, 163.
- 38) E. W. Ainscough, A. M. Brodie, *Journal of Chemical Education*, 1995, **72** (8), 686.
- 39) C. Nathan, *The FASEB Journal*, 1992, **6**, 3051.
- 40) R. J. P. Williams, *Chemical Society Reviews*, 1996, 77.
- 41) S. P. Fricker, *Platinum Metals Rev.*, 1995, **39** (4), 150.
- 42) N. Vural, *Toksikoloji*, 1984.
- 43) L. J. Ignarro, G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns, G. Chaudhuri, *Medical Sciences*, 1987, **84**, 9265.

- 44) V. Yermilov, J. Rubio, M. Becchi, M. D. Friesen, B. Pignatelli, H. Oshima, *Carcinogenesis*, 1995, **16** (9), 2045.
- 45) C. Szabo, H. Oshima, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, 1997, 1.
- 46) V. Yermilov, J. Rubio, H. Ohshima, *FEBS Letters*, 1995, **376**, 207.
- 47) Y. Yoshie, H. Ohshima, *Chem. Res. Toxicol.*, 1997, **10**, 1015.
- 48) Y. Yoshie, H. Ohshima, *Carcinogenesis*, 1997, **18** (7), 1359.
- 49) T. Tominaga, S. Sato, T. Ohnishi, S. T. Ohnishi, *Brain Research*, 1993, **614**, 342.
- 50) S. Moncada, R. M. J. Palmer, E. A. Higgs, *Pharmacological Reviews*, 1991, **43** (2), 109.
- 51) K. T. Turpaev, *Molecular Biology*, 1998, **32** (4), 475.
- 52) P. Klemm, M. Hecker, H. Stockhausen, C. Chen Wu, C. Thiemermann, *British Journal of Pharmacology*, 1995, **115**, 1175.
- 53) P. N. Bories, C. Bories, *Clin. Chem.*, 1995, **41** (6), 904.
- 54) G. A. Haywood, P. S. Tsao, H. E. Leyen, M. J. Mann, P. J. Keeling, P. T. Trindade, N. P. Lewis, C. D. Byrne, P. R. Rickenbacher, N. H. Bishopric, J. P. Cooke, W. J. McKenna, M. B. Fowler, *Circulation*, 1996, **93** (6), 1087.
- 55) G. R. S. Thatcher, H. Weldon, *Chemical Society Reviews*, 1998, **27**, 331.
- 56) D. Julka, R. Sandhir, K. D. Gill, *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1993, **29** (5), 807.
- 57) V. T. Devita, S. Hellman, *Cancer*, 1983, 376.
- 58) R. Ommaty, *Vademecum*, 1994, 217.
- 59) B. G. Katzung, *Basic & clinical Pharmacology*, 1995, 837.
- 60) Ş. Kaymakçalan, *Genel Farmakoloji*, 1976, 570.
- 61) L. S. Jacob, *Pharmacology*, 1996, 264.
- 62) S. O. Kayaalp, *Tıbbi farmakoloji*, 1984, 1, 930.
- 63) *Martındak*, İlaç Tanıtım Broşürü 1990, 567.

- 64) L. W. Oberley, *Süperoxide Dismutaz*, 1982, **2**, 147.
- 65) R. Bertelli, F. Ginevri, R. Gusmano, G. M. Ghiggeri, 1994, **27A**, 799.
- 66) S. Balanehru, B. Nagarajan, *Biochemistry International*, 1992, **28** (4), 735.
- 67) J. H. Doroshov, G. Y. Locker, C. E. Myers, *J. Clin. Invest*, 1980, **65**, 128.
- 68) A. Koçak, A. Çolak, *Journal of Turgut Özal Medical Center*, 1996, **3** (3), 237.
- 69) R. J. Reiter, *Life Sciences*, 1987, **40**, 2119.
- 70) R. J. Reiter, *BioEssays*, 1992, **14** (3), 169.
- 71) B. Poeggeler, R. J. Reiter, D-X Tan, L-D Chen, LC. Manchester, *J. Pineal Res*, 1993, **14**, 151.
- 72) A. Noyan, *Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji*, 1993, 1094.
- 73) A. Telefoncu, *Tıp ve Fen Bilimciler İçin Biyokimya*, 1988, 162.
- 74) I. Antolin, C. Rodriguez, R. M. Sainz, J. C. Mayo, H. Uria, M. L. Kotler, M. J. R. Colunga, D. Tolivia, A. M. Pelaez, *FASEB*, 1996, **10**, 884.
- 75) M. Kotler, C. Rodriguez, R. M. Sainz, I. Antolin, A. M. Pelaez, *J. Pineal Res.*, 1998, **24**, 83.
- 76) R. Hardeland, R. J. Reiter, B. Poeggeler, D-X. Tan, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 1993, **17** 347.
- 77) E. Sewerynek, R. J. Reiter, D. Melchiorri, G. G. Ortiz, A. Lewinski, *Hepato-Gastroenterology*, 1996, **43**, 88.
- 78) FG. Pric, AG. Maxit, C. Cardalda, A. Batlle, A. Juknat, *J. Pineal Res.*, 1998, **24**, 1.
- 79) A. Berkem, S. Baykut, *Fizikokimya*, 1984, 158.
- 80) Petrucci – Harwood, *Genel Kimya*, 1985, **2**, 906.
- 81) C. Şenvar, *Atom, Molekül, Çekirdek*, 1982, **5**, 471.
- 82) A. R. Berkem, S. Baykut, M. Berkem, *Fizikokimya*, 1994, **1**, 44.
- 83) Y. Sarıkaya, *Fizikokimya*, 1977, 1130.

- 84) A. R. Berkem, *Çekirdek Kimyası ve Radyoaktivite*, 1992, 74.
- 85) J.H. Doroshov, G. Y. Locker, C. E. Myers, *J. Clin. Invest.*, 19980, **65**, 128.
- 86) L. Chen, P. Kumar, R. J. Reiter, D. Tan, L. C. Manchester, J. P. Chambers, B. Poeggeler, S. Saarela, *Am. Physiological Soc.*, 1994, E57.
- 87) A. Koçak, B. Biliciler, İ. Özdemir, M. Vatansaver, S. Aydemir, B. S. Akbaşak, *Türk Nöroşirürji Derneği 12 Bilimsel Kongresi*, 1998, 212.
- 88) B. Biliciler, A. Koçak, İ. Özdemir, M. Vatansaver, S. Aydemir, B. S. Akbaşak, *Türk Nöroşirürji Derneği 12 Bilimsel Kongresi*, 1998, 211.
- 89) O. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 1956, **193**, 265.
- 90) Cation Exchange Resin Instruction Manual, Biorad.
- 91) W. Wang, N. Inoue, T. Nakayama, M. Ishii, T. Kato, *Anal. Biochem.*, 1995, **227**, 274.
- 92) D. S. Bredt, S. H. Snyder, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1990, **87**, 682.