

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**VİTAMİN E’NİN HİPOTERMİK KOBAYLARDA EKG, SERUM
LİPİT PEROKSİDASYONU VE ANTİOKSİDAN ENZİM
DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Veteriner Hekim Leyla ASLAN
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. İsmail MERAL

VAN - 2004

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**VİTAMİN E'NİN HİPOTERMİK KOBAYLARDA EKG, SERUM
LİPİT PEROKSİDASYONU VE ANTİOKSİDAN ENZİM
DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Veteriner Hekim Leyla ASLAN
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. İsmail MERAL

VAN-2004

Bu araştırma, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 2001-VF-010 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

VİTAMİN E'NİN HİPOTERMİK KOBAYLARDA EKG, SERUM LİPİT
PEROKSİDASYONU VE ANTİOKSİDAN ENZİM DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Veteriner Hekim Leyla ASLAN
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Nihat MERT

Doç. Dr. Ferda BELGE

Doç. Dr. İsmail MERAL

TEZ KABUL TARİHİ

27/02/2004

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimin süresince yoğun çalışmalarına rağmen benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. İsmail MERAL'e, katkılarından dolayı anabilim dalı başkanımız Doç. Dr. Ferda BELGE'ye, tezimin deney aşamasındaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Ali BELGE'ye, çalışmalarım sırasında benden hiçbir yardımı esirgemeyen Araş. Gör. İnci DOĞAN, Kimyager Semih YAŐAR ve anabilim dalımızda bulunan diğer değerli Öğretim Üyelerine teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim. Ayrıca hiçbir zaman sevgi ve desteklerini benden esirgemeyen anne ve babama özel saygı ve şükranlarımı sunuyorum.



İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	III
Teşekkür.....	IV
İçindekiler.....	V
Simgeler ve Kısaltmalar.....	VII
Şekiller Listesi.....	VIII
Tablolar Listesi.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Hipotermi.....	2
2.1.1. Hipoterminin çeşitleri.....	2
2.1.2. Hipoterminin patofizyolojisi.....	3
2.2. Elektrokardiyografi.....	5
2.3. Serbest Radikaller.....	6
2.4. Antioksidanlar.....	7
2.4.1. Enzimatik savunma sistemi.....	8
2.4.1.1. Glutasyon peroksidaz.....	8
2.4.1.2. Süperoksit dismutaz.....	10
2.4.2. Enzimatik olmayan savunma sistemi.....	11
2.4.2.1. Glutasyon.....	11
2.4.2.2. Vitamin E (α -Tokoferol).....	12
3. MATERYAL VE METOT.....	16
3.1. Materyal.....	16
3.1.1. Canlı materyal.....	16
3.1.2. Kullanılan alet ve malzemeler.....	16
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler.....	17
3.2. Metot.....	18
3.2.1. Grupların oluşturulması.....	18
3.2.2. EKG çekimi.....	18
3.2.3. Kan örneklerinin alınması ve analizler.....	19
3.2.3.1. GSH tayini.....	19

3.2.3.2. MDA tayini.....	20
3.2.3.3. SOD enzim tayini.....	21
3.2.3.4. GSH-Px enzim tayini.....	24
3.2.3.5. Vitamin E tayini.....	25
3.2.4. İstatistiksel Analiz.....	27
4. BULGULAR.....	28
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	36
ÖZET.....	40
SUMMARY.....	41
KAYNAKLAR.....	42
ÖZGEÇMİŞ.....	48

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADH	: Antidiüretik Hormon
BHT	: Bütillenmiş Hidroksi Toluen
dl	: Desilitre
EDTA	: Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EKG	: Elektrokardiyografi
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: Redükte Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GSSG	: Okside Glutasyon
G-6-PD	: Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz
H ⁺	: Hidrojen iyonu
IU	: İnternasyonal Ünite
MDA	: Malondialdehit
Mmol	: Milimol
µmol	: Mikromol
NADP	: Nikotinamid Dinükleotid Fosfat
NADPH	: Redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
nm	: Nanometre
OH ⁻	: Hidroksil
O ₂ ⁻	: Süperoksit
ppm	: Per Percent Milion
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TBA	: Tiyobarbütirik Asit
TCA	: Triklorasetik Asit
U	: Ünite

ŞEKİLLER

Şekil 1. α -Tokoferol (5,7,8- trimetil tokol)	12
Şekil 2. K, H ve Vit E+H kobayların tipik II. derivasyon bulguları	28
Şekil 3. K, H ve Vit E+H gruplarının MDA (nmol/ml) değerleri.....	30
Şekil 4. K, H ve Vit E+H gruplarının GSH (mg/dl) değerleri.....	31
Şekil 5. K, H ve Vit E+H gruplarının SOD (U/ml) değerleri.....	32
Şekil 6. K, H ve Vit E+H gruplarının GSH-Px (U/ml) değerleri.....	33
Şekil 7. K, H ve Vit E+H gruplarının vitamin E (mg/dl) değerleri	34



TABLÖLAR

Tablo 1. K, H ve Vit E+H gruplarından elde edilen II. derivasyonlara ait tüm dalgaların amplitüd ve süreleri	27
Tablo 2. K, H, Vit E+H gruplarına ait MDA, GSH, SOD, GSH-Px ve vitamin E değerleri.....	29



1. GİRİŞ

Hipotermi, bazı fonksiyon bozuklukları veya soğuga maruz kalma sonucu oluşur. Meydana gelen hipotermi ve hücre içerisindeki enzimatik reaksiyonları etkileyerek tüm metabolik işlemleri yavaşlatır (1). Bu nedenle izole edilmiş organların korunmasında hipotermiden yararlanır (2). Ancak şiddetli hipotermi durumunda reaktif oksijen maddeleri ve hidroksil radikalleri oluşarak hücre membranında veya komponentlerinde bozukluğa yol açar. Oluşan bozukluk ise toksik aldehit oluşumuna ve hücre ölümüne neden olur. Bu maddelerden en önemlisi malondialdehit (MDA) dir (3).

Serbest radikallerin hücrede oluşturduğu hasarı önlemek için vücutta antioksidan savunma sistemi adı verilen savunma mekanizmaları gelişmiştir. Antioksidanlar peroksidasyon zincir reaksiyonlarını engelleyerek veya kısaca serbest radikalleri toplayarak lipid peroksidasyonunu engellerler (4). Antioksidan vitaminler (vitamin A, C ve E) iken süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon ve katalaz enzimleri de antioksidanlara örnek gösterilebilir.

Vitamin E, sellüler ve subsellüler membran fosfolipitlerinde bulunan poliansature yağ asitlerinin peroksidasyonuna karşı ilk savunma hattını oluşturur. Vitamin E ayrıca fenolik bir hidrojeni, peroksidasyona uğramış bir poliansature yağ asidindeki serbest peroksit radikale aktarabilir. Bunun sonucunda serbest radikal zincir reaksiyonlarını kırarak antioksidan aktivitesi gösterir (5).

Hipotermiden son yıllarda kalp operasyonlarında yararlanılmaktadır. Ayrıca vücudun dondurularak saklanması yönünde çalışmalar sürmektedir (6). Hipotermiye yönelik çalışmalar bu nedenle yoğunlaşmıştır. Hipoterminin oluşturduğu fonksiyonel zararlar ve meydana getirdiği hasarların en aza indirilmesi yönündeki çalışmalar da yeni gelişmeler sağlandığı takdirde hipotermiden daha çok yararlanılacaktır. Bu nedenle, bu tez çalışmasında vitamin E uygulamasının deneysel olarak hipotermi oluşturulan kobaylarda elektrokardiyogram (EKG) bulguları, serum lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim düzeyleri üzerine etkileri araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hipotermi

Hipotermi vücut ısısının 35 °C nin altına düşmesi durumudur. Metabolik bozukluklar, hipotalamik ve merkezi sinir sistemi fonksiyon bozuklukları, sepsis, bazı ilaçlar ve soğuğa maruz kalma hipotermiyi oluşturan sebepler olarak gösterilebilir (7). Hipotermi primer veya sekonder olarak ortaya çıkar. Primer hipotermi; uygun olmayan korunma koşullarında soğuk ortamla direkt temas durumunda oluşur. Sağlıklı bireylerde sıklıkla görülen bir durumdur. Sekonder hipotermi ise vücudun termoregülatör mekanizmalarının bozulması sonucu oluşur. Bu tür hipotermi bazı sistemik hastalıkları bulunan kişilerde ortaya çıkar (8).

Hipotermimin risk faktörleri olarak ısı kaybının fazla olduğu durumlar (aşırı soğuk ortam, yetersiz giysi, ilerlemiş yaş), ısı üretiminin azalması (ileri yaş, bazı ilaçlar ve hastalıklar), termoregülasyonun bozulması ve diğer bazı faktörler (alkol, ırk) gösterilebilir (8).

2.1.1. Hipotermimin çeşitleri

Hipotermimin şiddetli, orta dereceli ve hafif olmak üzere üç çeşidi vardır (8).

Şiddetli hipotermi

Vücut ısısı 24 °C'nin altında olduğu durumlarda ortaya çıkar. Bu tür hipotermide ısıyı vücutta dengeleyen tüm koruyucu endokrin ve sinir sistemi mekanizmaları etkilerini kaybederler. Yoğun tıbbi tedaviye rağmen hastanın iyileşmesi ve hayatta kalması nadir olarak görülür (8).

Orta dereceli hipotermi

Vücut ısısı 24 ila 32 °C arasında olduğu durumlarda ortaya çıkar. Bu tür hipotermiye bağlı olarak oluşan vazokonstriksiyonla vücuttaki ısı kaybı en aza

indirilmeye çalışılır. Ayrıca vücutta oluşturulan titremelerle (kas gruplarının ısı üretimi için senkronize kasılması) ısı üretimi artırılmaya çalışılır (8).

Hafif hipotermi

Vücut ısısı 32 °C'nin üzerindedir. Titreme, bazal ve endokrinolojik ısı üretimi vücut ısını artırılmaya yardımcı olur (8).

2.1.2. Hipoterminin patofizyolojisi

Hipotermik hastada ortaya çıkan patofizyolojik değişiklikler ısı düşmesinin şiddetine, hipotermimin nedenlerine ve kişinin önceki sağlık durumuna göre değişir. Vücut ısısındaki 1 °C'lik oynamalar normaldir. Bunun dışındaki sapmalar tüm organ sistemlerini etkiler. Hipotermiye karşı vücudun değişik sistemleri tarafından oluşturulan yanıtlar şu şekilde özetlenebilir(8).

Kardiyovasküler yanıt

Vücut ısısı 30 °C'nin altına indiği durumlarda önce taşikardi ardından pacemaker hücrelerinin spontan depolarizasyonundaki baskılanmadan dolayı bradikardi görülür. Sistemik vasküler direnç önce artar, vücut ısısı 24 °C ve altına düştüğünde ise azalır. Orta derecede veya ciddi hipotermisi olan bireylerde birçok atrial ve ventriküler aritmiler görülür. Kalp siklusunda uzama ortaya çıkar ve QT aralığı uzar. Vücut ısısı 32 °C'nin altında olduğu durumlarda sıklıkla atrial fibrilasyon oluşur. Oluşan bu atrial fibrilasyon vücut ısısı normale döndürüldüğünde genellikle kendiliğinden düzelir. Vücut ısısı 25 °C'nin altına indiğinde ise spontan olarak ventriküler fibrilasyon ve asistol ortaya çıkar. Vücut ısısı 30 °C'nin üzerine çıkarılmadığı takdirde ventriküler fibrilasyonu düzeltme girişimleri başarılı olmaz (8).

Respiratorik yanıt

Hipotermiye karşı oluşan ilk yanıt solunum hızının artmasıdır. Vücut ısısı düştüğünde medullada bulunan solunum merkezi deprese olmaya başlar. Buna bağlı olarak dakika hacmi düşer ve orantılı olarak metabolik hız azalır. Karbondioksit üretimindeki azalmaya bağlı olarak hafif derecede solunumsal alkaloz gelişir. Solunum

yolunu koruyucu reflekslerin baskılanması sonucu atelektazi, bronkopönomoni, aspirasyon pönomonisi ve akciğer ödemi oluşur (8).

Merkezi sinir sisteminin yanıtı

Merkezi sinir sistemi fonksiyonları gittikçe ilerleyen oranda azalır. 33.5 °C'nin altında belirgin olarak beyin fonksiyonları yavaşlamaya başlar ve 20 °C'nin altında beyin aktivitesi tamamen kaybolur. Mental durumdaki değişikliğe kişide yanlış adaptasyon davranışları eşlik ederek durumun kötüleşmesine neden olabilir. Ancak hipotermili hastalar ısıtılıp beyin fonksiyonları yeniden değerlendirilmeden beyin ölümü kabul edilmemelidir. Hipotermi durumunda vücuttaki refleksler azalır. Patella refleksi en son kaybolur (8).

Renal yanıt

Soğukla temas renal kan akımı ve glomerüler filtrasyon hızını azaltmasına rağmen diürezi artırır. Fazla miktarda idrar üretimi Antidiüretik hormon (ADH) yanıtının azalması ve vazokonstriksiyon sonucunda oluşur. Hipotermik hasta ısıtıldığında rölatif hipovolemi ortaya çıkar ve yeniden ısıtma şoku olarak adlandırılır (8).

Hematolojik yanıt

Hipotermi koagülasyonu bozar. Ancak hasta ısıtıldığında bozulmuş koagülasyon genellikle geriler. Koagülasyonun bozulmasında hipotermiye bağlı olarak oluşan vazokonstriksiyon ve soğuk iskemik dokudan salınan doku tromboplastini gibi faktörler etkilidir. Soğğun presipite ettiği fibrinojen koroner ve serebral tromboz riskini de arttırabilir (8). Hipotermi kemik iliği üzerinde baskılamaya neden olarak lökosit ve trombosit sayısını azaltır. Isıtma ile lökosit ve trombosit sayısı normale döner. Vücut ısısının her 1 °C düşmesi ile kan viskozitesi % 2 oranında artar. Oksi-hemoglobin eğrisi sola kayar ve dokulara oksijen salımı azalır (8).

Gastrointestinal yanıt

Hipotermi'nin gastrointestinal sistemde oluşturduğu komplikasyonlar ileus, pankreatit ve gastrik stres ülserleridir. Hepatik fonksiyon azaldığı için laktat, ilaçlar ve toksinlerin kandaki düzeyleri artar (8).

2.2. Elektrokardiyografi

Kalbin çalışması sırasında oluşan aksiyon akımların kaydedilmesi ve yorumlanması ile uğraşan bilim elektrokardiyografi adı verilir (9). Bu amaçla kullanılan aygıt elektrokardiyograf, kağıt üzerine çizilen eğri ise elektrokardiyogram (EKG) adını alır. Elektrokardiyografi kalp ve damar hastalıklarının tanı ve incelenmesinin yanısıra, kalp ilaçlarının ya da diğer ilaçların kalbe olan etkilerinin araştırılmasında da kullanılır (9).

EKG'de her kalp atımı sonucu meydana gelen P, Q, R, S, T ve U dalgalarından oluşmuş kompleks görülür. Dalgalardaki değişiklikler, düzenli dalgalardan farklı dalgaların görülmesi veya dalgalar arasındaki sürelerde meydana gelen değişimler olası bir kalp hastalığı hakkında bazı ipuçları verir (10).

Hafif hipotermi durumunda sempatik sinir sisteminin uyarılması sonucu taşikardi oluşur. Ancak vücut ısısının 32 °C'nin altına düştüğü orta şiddetli hipotermi durumlarında sinüs bradikardisi, P-R ve Q-T aralıklarında uzama, idioventriküler ritim, T dalgasında değişiklikler ve J dalgası adı verilen Osborn dalgasının oluşumu EKG'de oluşan yaygın değişiklikler olarak göze çarpar (11). J dalgası çok belirgin bir nokta olmayıp QRS kompleksini izleyen S-T parçasında bir yükselme şeklinde göze çarpar. Genellikle sıcaklık ve Osborn dalgasının genişliği birbiri ile tersine ilişkilidir (12). Orta dereceli hipotermilerde ikinci derece atrioventriküler blok ve atrial fibrilasyon da görülebilir (13).

Vücut sıcaklığı 25 °C'nin altına düştüğü ciddi hipotermilerde fetal kardiyak asistol ya da ventriküler fibrilasyon oluşabilir. Geniş J dalgası, Q-T aralığının uzaması ve bradikardi ile ilişkili olarak klinik semptomlarını gösterir (14). J dalgası hipotermi ile

ilişkili olmasına rağmen hiperkalsemi, serebral yaralanmalar ve otonom fonksiyon bozukluklarında da görülür (15).

Köpek, kirpi, kurbağa ve balıklarda ısı ve dolayısıyla kalp atımının artması ile P ve T dalgası, P-Q aralığı, QRS kompleksi ve özellikle Q-T aralığı süreleri kısalır. Aksine düşük ısıda uzar. Kış uykusu sırasında hayvanlarda sol dal bloğu ve düşük ısılı olanlarda sağ dal bloğu oluşur. Kirpilerde doğal ve yapay kış uykusunun çeşitli dönemlerinde çoğunlukla EKG'nin dalga ve aralık süreleri uzar, fakat voltaj değişmez (9).

2.3. Serbest Radikaller

Stabil moleküllerin çoğunun dış yörüngesinde biri diğerine zıt yönde dönen elektron çiftleri vardır. Bu elektron çiftleri molekülü sabitleştirir. Dış yörüngesinde en az bir adet çift olmayan elektron içeren atom veya moleküle serbest radikal denir. Bir başka deyişle en dış yörüngesinde ortaklanmamış elektron içeren kimyasal maddeler olarak da tanımlanırlar. Serbest radikaller oldukça reaktif maddelerdirler. Normal metabolizma ürünleri olarak *in vivo* üretilebildiği gibi, endüstriyel işlemler sırasında da oluşabilirler. Normal şartlarda hücrelerde en büyük serbest radikal kaynağı elektron sızıntısıdır (16, 17).

Serbest radikaller, genelde çeşitli iç ve dış etkenlere bağlı olarak üretimlerindeki artışı takiben, başta membran fosfolipitleri olmak üzere hücresel bileşiklerin tümüne (karbonhidrat, lipit, protein, DNA v.b.) zarar vererek, membranda depolarizasyon oluşturmakta, parçalatıcı enzimlerin aktivitesini artırmakta, hücre zarının geçirgenliğini ve elektrik yük dengesini değiştirmektedirler. Hücrede lokalize oldukları en önemli organeller, başta mitokondri olmak üzere, hücre membranı, lizozomlar, çekirdek ve endoplazmik retikulumdur (18). Serbest radikaller 3 şekilde meydana gelir (19). Bunlar;

1. Kovalent bağlı normal bir molekülün hemolitik bölünmesi.
2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya molekülün heterolitik bölünmesi.

3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi.

Biyomoleküllerden en fazla etkilenen bileşik lipitlerdir. Membranlarda bulunan fosfolipitlerdeki doymamış bağlar ve kolesterol serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini meydana getirir. Doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipit peroksidasyonu olarak isimlendirilir ve oldukça zararlıdır. Kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonları şeklinde oluşur. Lipit peroksidasyonu organizmada oluşan bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan doymamış yağ asiti zincirlerinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılmasıyla başlar. Bunun sonucunda yağ asiti zinciri bir lipit radikali niteliği kazanır. Oluşan lipit radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. En önemli peroksidasyon ürünü MDA'dır. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle diğer konjugantları (bir alkilin iki çift bağı arasında bir tane tekli bağ varsa buna konjuge dien adı verilir), daha sonra lipit radikallerinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipit peroksil radikali meydana gelir. Lipit peroksil radikalleri membran yapısındaki diğer doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksitlere dönüşürler ve olay kendi kendine katalizlenerek devam eder (18, 19, 20, 21).

Lipit peroksidasyonunun en önemli peroksidasyon ürünleri MDA, lipit peroksil radikali, lipit peroksil radikali, alkil radikali, lipit aldehitdir. Oluşan MDA hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar. İyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliklerinden dolayı, DNA'nın azot bazları ile de reaksiyona girebilir. Bundan dolayı MDA mutajenik kültür hücreleri için genotoksik ve karsinojeniktir (20, 22, 23).

2.4. Antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin düzeylerini ve bunların meydana getirdiği hasarı sınırlandırmak için vücutta birçok savunma mekanizması gelişmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri olarak bilinirler. Antioksidanlar peroksidasyon zincir

reaksiyonunu engelleyerek veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipit peroksidasyonunu inhibe ederler (24). Antioksidan savunma sistemleri enzimatik ve enzimatik olmayan olmak üzere iki grupta toplanabilir (25, 26).

2.4.1. Enzimatik savunma sistemi

Antioksidan enzimlere örnek olarak SOD, katalaz, ve glutatyon siklusu enzimleri olan GSH-Px, glutatyon redüktaz (GR) ve glukoz 6 fosfat dehidrogenaz (G-6-PD) gösterilebilir.

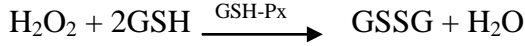
2.4.1.1. Glutatyon peroksidaz

GSH-Px enzimi ilk olarak 1957 yılında Mills tarafından memeli eritrositlerinde gösterilmiştir (27). GSH-Px hidroperoksidlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Birçok dokuda bulunan 4 selenyum atomu içeren sitozolik bir enzimdir. Molekül ağırlığı 84.000 dalton'dur (28). Enzimin 4 prostetik grubu protohemdir. Peroksidaz tarafından katalizlenen reaksiyonlarda hidrojen peroksit, askorbat, kinonlar ve sitokrom C gibi elektron akseptörleri olarak hareket eden birçok maddenin zararına olacak şekilde indirgenir (29).

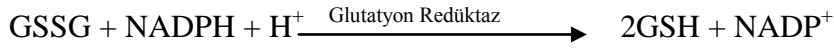
GSH-Px, çoğu hücrede sitozolde bulunur ve bir fosfolipaz tarafından membran fosfolipitlerinden ayrılan yağ asidi hidroperoksidleri ve hidrojen peroksidin her ikisi üzerine etkilidir (30). Bu enzim sayesinde eritrositlerin membran yapıları korunarak hemolize karşı dayanıklılığı artar ve methemoglobin oluşumu engellenir Hücre membran lipitlerinin yapısında bulunan doymamış yağ asitleri oksitlenmeden korunarak membran dayanıklılığı sağlanır. Böylece hücre fonksiyonlarını tam olarak sürdürür. GSH-Px enzim aktivitesinin yeterli olması halinde hücrelerin onkojenik maddelere karşı direnci artar (31).

GSH-Px, tamamlayıcı bir komponenti olan selenyumla birlikte, E vitamininden sonra ikinci bir savunma hattı olarak peroksitleri membrana zarar vermeden yok eder (32). Bu enzimin aktivitesinde görülen yetersizlikler sonucunda iskelet ve kalp kaslarında dejenerasyonlar şekillenir (31).

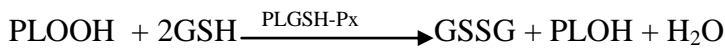
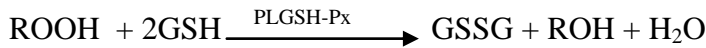
GSH-Px'in katalizlediği reaksiyonlar (33)



Hidroperoksitlerin redükte olması ile meydana gelen GSSG glutatyon redüktazın katalizlediği reaksiyon ile tekrar GSH'a dönüşür.



Fosfolipit hidroperoksitlerinin GSH-Px'e etki etmeden önce, fosfolipaz A₂ ile hidrolize edilmiş olmaları gerektiği yolunda bulgular vardır. Fosfolipaz A₂'ye ihtiyaç duymadan membran fosfolipitlerini indirgeyebilen fosfolipit, hidroperoksid glutatyon peroksidaz (PLGSH-Px) diye bilinen ikinci bir seleno-enzimin etkileri araştırılmaya başlanmıştır. PLGSH-Px monomerik selenyum atomu ihtiva eden, molekül ağırlığı 20.000 dalton olan sitozolik bir enzimdir. Membrana bağlı bir antioksidan olan vitamin E sınırlı olduğu zaman, PLGSH-Px membranın peroksidasyona karşı korunmasını sağlar. Membran fosfolipit hidroperoksitlerini alkollere indirger (33).



GSH-Px'in selenat formu (E-Se⁻) peroksid substratını alkole indirgerken, kendisi okside selenik aside dönüşür (E-Se-OH). GSH, bu evrede reaksiyona katılarak seleno-sülfit'i (E-Se-S-G) oluşturur. İkinci bir glutatyon selenolat forma dönerken, glutatyon okside hale dönüşür. Eritrositlerde GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar (33).

2.4.1.2. Süperoksit dismutaz

SOD ilk olarak 1968 yılında McCord ve Fridovich tarafından bulunmuş olup, metalloenzim ailesine dahil bir enzimdir. Bu enzim süperoksidin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Selüler bölmelerdeki süperoksit düzeylerini kontrol etmede önemli rol oynar (34).

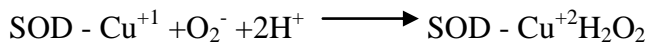
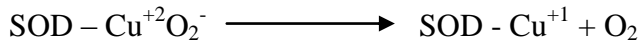
SOD'un fizyolojik fonksiyonu, aerobik organizmaları süperoksitin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder (34). SOD'un singlet oksijeni bastırma yeteneğine de sahip olduğu kaydedilmiştir (35). SOD, fizyolojik pH 'da süperoksit radikalinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene mutasyonunu, spontan dismutasyondan 10.000 kez daha hızlı oranda katalizler (36).

SOD aktivitesi yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır. SOD'un ekstraselüler aktivitesi çok düşüktür. Doku oksijen basıncı artışı ile aktivitesi artarken, hipoksi esnasında azalır. Normal ve respiratuvar distresli neonatlarda, eritrosit SOD'unun bu özelliği, akciğerde oksijen toksisitesini önler (35).

SOD, kollajeni süperoksit radikalinin zararlı etkilerinden korur. Ekstraselüler sıvılar çok az miktarda SOD içerdiğinden, serbest radikalleri eser miktarları bile burada büyük hasarlara yol açabilir (37). Son yıllarda sürdürülen çalışmalarda SOD'un akut hipertansiyonda gelişebilecek beyin hasarını önlemek amacıyla ilaç olarak kullanılabileceği yolunda veriler elde edilmiştir (36).

SOD'un süperoksit anyonuna olan etkisi şöyledir;

Süperoksit anyonu, Cu^{+2} ve bir arginin rezidüsünün guanido grubuna bağlanır. Bu bağlanma sonucunda süperoksitten bir elektron Cu^{+2} 'ya transfer olurken Cu^{+1} ve moleküler oksijen meydana gelir. İkinci bir süperoksit anyonu Cu^{+1} 'dan bir elektron, bağlanma ortağından ise 2 proton alarak hidrojen peroksidi oluşturur ve enzim tekrar Cu^{+2} formuna dönmüş olur (38).



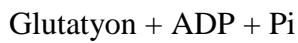
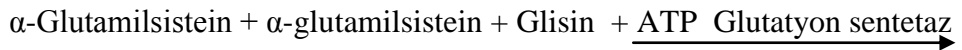
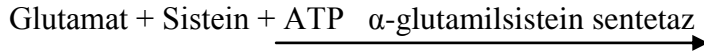
2.4.2. Enzimatik olmayan savunma sistemi

Bunlara örnek olarak vitaminler (A, C ve E), glutatyon, seruloplazmin, ürat, sistein, transferrin, laktoferrin, miyogloblin, ferritin, albümin ve bilirubin gösterilebilir.

2.4.2.1. Glutatyon

Glutatyon ilk olarak 1929 yılında kimyasal formülü açıklanmış olan bir tripeptiddir. Glutatyon; glutamik asit, sistein ve glisinden sentezlenir (39). Oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarında, hücre zarında amino asitlerin taşınmasında rol oynar. Glutatyonun redükte hali GSH olarak kısaltılır; SH sisteinin sülfidril grubuna işaret eder ve molekülün alışveriş yapan kısmıdır (40).

Kandaki glutatyonun tamamına yakınının alyuvarların içinde bulunduğu ve indirgeyici özellikte olan glutatyonun alyuvarları oksidatif yıkıma karşı koruduğu bildirilmiştir (41, 42, 43). Glutatyon alyuvarlar içinde üç aşamada sentezlenir. Sentezlenme aşamalarındaki herhangi bir genetik bozukluk GSH yetersizliğine sebep olur. Glutatyon;



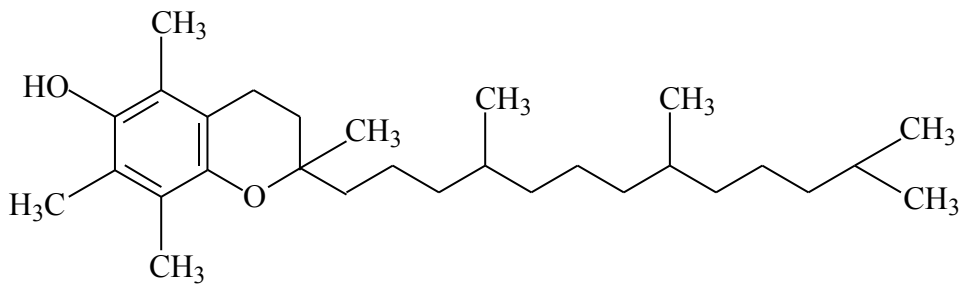
Çok önemli bir antioksidan olan glutatyon, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif zarara karşı korur. Proteinlerin –SH gruplarını redükte halde tutarak, protein ve enzimlerin inaktivasyonuna engel olur. Ayrıca yabancı bileşiklerin detoksifikasyonunu ve amino asitlerin membranlardan geçişini de sağlamaktadır (19, 44). Hücre membranında bulunan doymamış yağların peroksitler tarafından oksitlenmesiyle, patolojik değişiklikler meydana gelir. Kalp, akciğer, kas, savunma, sindirim sistemi ile ilişkili hastalıklar, yaşlanma, ateroskleroz, kanser, diabet, romatoid artrit gibi birçok patolojik oluşumlardan serbest radikaller sorumlu tutulmaktadır. Bu patolojik durumlar GSH-Px enzimi tarafından önlenirken hücre fonksiyonları tam olarak sürdürülür. GSH-Px aktivitesinin yeterli olması durumunda

hücrelerin onkojenik maddelere karşı direnci artar. GSH-Px; böbrek, karaciğer ve pankreası nekrotik dejenerasyonlardan korumaktadır. GSH bazı ilaçlar ve kanserojenler gibi çeşitli toksik bileşiklere karşı önemli bir savunma mekanizmasıdır (45, 46, 47, 48).

2.4.2.2. Vitamin E (α -Tokoferol)

Vitamin E ilk olarak 1921 yılında ratlarda büyüme faktörü olarak bulunmuş, besinlerle alınması şart olan, yağda eriyen antioksidan bir vitamindir. Bitkisel yağlardan ve buğday embriyosundan elde edilen vitamin E'ye Yunanca bir kelime olan tokoferol de denir (49).

Vitamin E etkisi gösteren ve bitkilerde sentezlenen 8 tane doğal tokoferol mevcuttur (α , β , γ , δ , ζ_1 , ζ_2 , ϵ , η). Bu tokoferoller tokol çekirdeğinden türerler. Tokoferollerdeki farklılık tokol çekirdeğinin değişik yerlerine metil grubunun bağlanmasından kaynaklanır (Şekil 1). Yan zincirlerinde doymamış bağlar bulunmaktadır. Doğada en fazla bulunanı α tokoferoldür. Bundan dolayı tokoferollerin etkileri de farklıdır. Bu vitamin çoğunlukla yağ dokusunda olmak üzere bütün dokularda depolanır. Vitamin E, ilk olarak karaciğerde depolanmaz ve taşınması için ayrıca özel bir proteine gerek yoktur. Tokoferoller, sarımsı renkte yağlar olup suda erimezler ve oksitlenmeye karşı duyarlıdırlar (49).



Şekil 1. α -Tokoferol (5,7,8- trimetil tokol) (49).

Oral alınan tokoferol genellikle iyi absorbe edilir. Yağlar ve safra tuzları diğer yağda eriyen vitaminlerde olduğu gibi vitamin E'nin absorpsiyonunu kolaylaştırır. Tokoferoller ince bağırsakta safranin yardımıyla emülsiyon haline gelir ve sonra absorbe olurlar. Maksimum absorpsiyon vitamin E sindirim sistemine alındıktan birkaç

saat sonra görülür. Bozulmuş yağlar vitamin E'yi oksidasyona uğratarak bozulmasına neden olur. Mineral yağlar ise bu vitaminin absorpsiyonunu engeller. Vitamin E plazmada β -lipoproteinlere bağlı olarak taşınır. Tokoferol safra ile nispeten küçük miktarlarda atılır. Yüksek dozda tokoferol verildikten sonra insan idrarında metabolitleri [2-(3-hidroksi-3-metil-5-karboksi pentil)-3.5.6-trimetil hidrokinon ve tokoferolün gamma laktonu] izole edilmiştir (50).

Vitamin E karaciğer ve yağ dokularında depo edilir. Depolama miktarı yaşa ve cinsiyete göre değişir. Yaş ile depolama kapasitesi artar. Ayrıca dişi hayvanların bir çok organlarının erkeklere göre daha yüksek miktarda vitamin içerdiği bulunmuştur. Bütün hayvanlarda vitamin E miktarının hipofizde, adrenal bezlerde ve uterusda yüksek olduğu görülmüştür. Vitamin E vitamin A'nın tersine plasentada da depo edilir. Ancak fötüse transferi çok sınırlı olup yeterli değildir. Hücre içerisinde ise tokoferol mitokondri, mikrozom ve lizozomlarda konsantre olur (50).

Vitamin E, biyolojik membranlarda fosfolipit molekülleri içinde bulunur ve her fosfolipit molekülüne başına 0.1 - 1 mol E vitamini vardır (51, 52). Bir molekül alfa tokoferol, 100 molekül poliansature yağ asidinin peroksidasyonunu engelleyebilir. Mitokondri fosfolipitleri, endoplazmik retikulum ve plazma membranları alfatokoferole karşı spesifik affiniteye sahiptirler (52, 53)

Vitamin E, çok önemli bir antioksidan olup, lipit peroksidasyonunun erken aşamalarında biomembranlardaki serbest radikal toplayıcı aktivitesi sonucu hücre membran fosfolipitlerinde bulunan poliansature yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyarak, lipit peroksidasyonuna karşı ilk savunma hattını oluşturur (54, 55).

Vitamin E, miyokardiyal hücrelerin membranlarında belirgin konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. *In vitro* çalışmalar E vitamininin serbest radikal toplayıcısı ve miyokart membranlarının serbest radikallerce lipit peroksidasyonuna uğratılmasında koruyucu olduğunu ortaya koymuştur (53). Vitamin E alınmasıyla koroner kalp hastalığı riskinin azaldığını gösteren epidemiyolojik çalışmalar da vardır (56).

Diğer vitaminlerden farklı olarak tokoferol görevini tamamladıktan sonra yeniden sisteme dahil olmadığından, hücredeki biyolojik rolünü sürdürmek için sürekli

olarak yenilenmelidir. Tokoferolün antioksidan etkisi özellikle yüksek oksijen konsantrasyonlarında etkilidir ve bundan dolayı yüksek oksijen basıncına maruz kalan lipit yapılarında, mesela eritrosit ve solunum sistemi membranlarında yoğunlaşmışlardır (57).

Vitamin E'nin öncelikle en önemli görevi antioksidan etkiye sahip olmasıdır. Membranlar içinde bulunan doymamış yağ asitlerinin oksitlenmesini önleyen vitamin E, membranlarda meydana gelebilecek yıkımlanmayı önlemektedir. Membranda bulunan fosfolipitlerin doymamış yağ asitleri bölümü, flavoprotein oksidaz tarafından oluşturulan hidrojen peroksit üretimiyle oksitlenir. Evcil veya deney hayvanlarında öncelikle ortaya çıkan bozukluklar, embriyo, böbrek, karaciğer, pankreas, yumuşak doku ve iskelet kaslarında görülür. Oksidasyon esnasında açığa çıkan süperoksit, diğer radikaller ve peroksit, membran enzimleri Sitokrom P₄₅₀ oksidaz ve ksantin oksidaz tarafından katalizlenir ve diğer proteinlerle serbest radikalleri oluştururlar. Bu serbest radikaller daha sonra mitokondriyal, mikrozomal ve hücre membranları fosfolipidlerinin doymamış yağ asitlerini okside ederek bozuklukların ortaya çıkmasına neden olur (49).

E vitamini, oksijene duyarlı bir vitamin olan A vitaminin parçalanmasını önleyerek vücudun A vitamin ihtiyacının daha yüksek bir düzeyde karşılanmasını sağlar (32, 50). Tokoferol, hem erkeklerde hem de dişilerde üreme için gereklidir. Aksi halde germinal epitellerde tedavisi olanaksız bir dejenerasyon ortaya çıkar. Dişiler gebe kalsa bile embriyo ölür ve rezorbe edilir (32, 50).

E vitamini bitkisel yağlarda bol miktarda bulunmaktadır. Karaciğer, yumurta, süt ve süt ürünleri vitamin E'nin bol bulunduğu besinlerdir. Bu besinlerin yetersiz alınması halinde noksanlık belirtileri ortaya çıkar. Doymamış yağ asitlerinin gıdalarla fazla alınması vitamin E ihtiyacını artırır. Yağda eriyen bir vitamin olduğu için lipit emilim bozukluklarında vitamin noksanlığı ortaya çıkabilir. Noksanlık durumunda eritrositlerin peroksidasyona duyarlılığı artmakta ve bu nedenle anormal hücre membranı oluşmaktadır (58).

Lipit sindiriminin, absorpsiyonunun veya transportunun etkilendiği herhangi bir durumda vitamin E yetersizliği oluşabilir. Kolestatik karaciğer hastalıkları ve kistik fibrosis vitamin E yetersizliği ile sonuçlanan en genel kronik malabsorpsiyon

sendromlarıdır. Serum vitamin E seviyesi şiddetli yağ malabsorbsiyonu nedeniyle abetalipoproteinemiye sahip hastalarda sık sık belirlenmemektedir (20). Uzun süreli vitamin E yetersizliğinde progresif nörolojik sendrom belirlenmiştir. Böylece vitamin E'nin sinir sisteminin ve iskelet kaslarının fonksiyonunu sürdürmesi ve optimal gelişiminde ne kadar önemli olduğu görülmektedir. Araştırmalar kuvvetli vitamin yetersizliği olan hastalarda vitamin E gereksinimin diğer endojen ve ekzojen antioksidanlar tarafından karşılanamadığını göstermiştir. Vitamin E yetersizliği sonucu oluşan nörolojik disfonksiyon çocukluk döneminde tedavi edilebilir. Vitamin E yetersizliği aynı zamanda prematüre doğumlara neden olabilir. Ancak uygun serum vitamin E seviyesini, vitamin E takviyesi ile yeniden düzeltmek mümkündür (59).



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Canlı materyal

Araştırmada canlı hayvan olarak 500-800 gr ağırlığında 30 adet sağlıklı erkek kobay (guinea pig) kullanıldı. Kobaylar deney süresince her bir kafeste 10 adet olacak şekilde 60x90x45 ebatlarında olan 3 adet ızgaralı, metal köşebentli, tel örgülü kafeslerde barındırıldı. Biyolojik ritimlerinin düzenli olması için 21 ± 1 °C ısı, 12 saat ışık, 12 saat karanlık ortamda ve hijyenik şartlarda tutuldu. Kobaylar standart pelet rat yemi ve suyla *ad libitum* beslendi.

3.1.2. Kullanılan alet ve malzemeler

Boeco S-22 UV/Vis, Spektrofotometre
Derin dondurucu (-20 °C) (Uğur),
Sıcak su banyosu BM 101 Nüve,
Bosch S 2000 Hassas Terazisi,
Heraeus Sepatech Minifuge RF Soğutmalı Santrifuj,
MS2 Minishaker Vorteks,
Biohit otomatik pipet,
Whatman süzgeç kağıdı No. 42,
Ependorf tüp,
Kanül,
Termometre,
Enjektör 5 cc lik,
Deney tüpü,
EDTA'lı tüp,
EKG cihazı (Cardiofax 6851),
EKG trase kağıdı,

Mikro küvet,
Cam huni,
Balon joje,
Cam baget.

3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

SOD enzim kiti, Randox,
GSH-Px enzim kiti, Randox,
GSH, Boehringer-Mannheim,
Metafosforik asit, Merck,
Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), Sigma,
Tiyobarbitürik asit (TBA), Sigma,
1.1.3.3.tetraethoksiopropan (MDA), Sigma,
5-5'-Dithiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB), Sigma,
Triklor asetik asit (TCA), Merck,
Sodyum klorür (NaCl), Merck,
Sodyum hidroksit (NaOH), Merck,
Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), Merck,
Metanol, Merck,
Triklor asetik asit (TCA), Merck,
Hidroklorik asit (HCl) (%37), Merck,
Absolut etanol (C₂H₅OH), Delta,
Vitamin E, Roche,
EKG jeli, Konix,
Sodyum sitrat, Merck,
Disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄), Merck,
Sodyum dihidrojen fosfat (NaH₂PO₄), Merck,
Demir III klorür (FeCl₃), Merck,
 α - tokoferol, Sigma,
2,4,6-Tripyridyl-s-triazine (TPTZ), Sigma.

3.2. Metot

3.2.1. Grupların oluşturulması

Kobaylar ortama adaptasyon sağlayabilmesi için bir hafta çalışma ortamında bekletildi. Daha sonra, kobaylar her bir grupta 10 adet olacak şekilde kontrol (K), hipotermik (H) ve vitamin E uygulanan hipotermik (Vit E+H) olmak üzere 3 deneme grubuna ayrıldı. Analizler yapılmadan önce Vit E+H grubundaki kobaylara oral olarak 4 gün boyunca 460 mg/kg vitamin E (Roche) verildi (60). Diğer iki gruba (K ve H) vitamin E verilmedi. Son vitamin E uygulamasından 24 saat sonra H ve Vit E+H gruplarında yer alan kobaylar herhangi bir anesteziik veya trankilizan madde verilmeden boyunlarının üst kısmına kadar soğuk su (10-12 °C) içerisinde sokuldu ve 5 dakika soğuk su içerisinde tutuldular. K grubundaki kobaylar ise aynı yöntemle vücut ısısındaki (37 °C) su içerisinde 5 dakika tutuldular. Su içerisinde çıkarılan kobayların hemen rektal vücut ısıları termometre ile ölçüldü, EKG'leri çekildi ve daha sonra kanları alındı.

3.2.2. EKG çekimi

Vücut ısısı ölçülen kobay vakit kaybedilmeden EKG çekimi için hazırlandı. Bu amaçla EKG cihazında bulunan elektrotlar ön bacaklarda triceps brachii kasının (coput longum ve coput laterale) üzerindeki deriye, arka bacaklarda ise biceps femoris kasının üzerindeki deriye tutturuldu. Elektrotların tutturulduğu bölgelere deride direnci azaltmak ve net kayıt alabilmek için elektrot jeli sürüldü. Kayıt süresince hayvanlara anestezi uygulanmadı ve tüm kayıtlar aynı gün elde edildi.

Kobaylardan EKG çekimi direkt yazıcı bir elektrokardiyograf (Cardiofax 6851) yolu ile yapıldı. Tüm EKG'ler 1mV = 10 mm ve kağıt hızı 50 mm/sn olacak şekilde standardize edildi. Birinci, II, III, aVR, aVL ve aVF derivasyonların çekimleri yapıldı. Ancak dalgaların sürelerinin ve amplitüdlerinin ölçümü II. derivasyon kullanılarak yapıldı.

3.2.3. Kan örneklerinin alınması ve analizler

EKG çekimini takiben eter ile anestezi edilen hayvanların kalbinden biri EDTA'lı olmak üzere iki plastik tüpe kan örnekleri alındı. EDTA'lı tüplerdeki kanlar tüm kan analizi ve eritrosit paketi hazırlanmasında kullanıldı. Diğer tüplerdeki kanlar ise serum vitamin E değerinin tayini için kullanıldı. Alınan kanlar 1 saat, +4 °C'de bekletildikten sonra 3.000 rpm'de +4 °C'de Heraeus Sepatech Minifuge RF soğutmalı santrifüjde 15 dk santrifüj edildi. Oluşan plazma atıldı. Altta kalan hacme eşit oranda serum fizyolojik (% 0.9 NaCl) eklenerek eritrositlerin yıkanması gerçekleştirildi. Serum fizyolojik eklenen tüpler +4 °C'de 3.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildiler: Eritrosit yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. Tüm kanda MDA ve GSH ölçümleri gerçekleştirildikten sonra SOD ve GSH-Px enzim aktiviteleri tayinine kadar eritrosit paketleri derin dondurucuda -20 °C'de muhafaza edildi (61, 62).

3.2.3.1. GSH tayini

Prensip

EDTA'lı kanın distile su ile hazırlanan hemolizinde, sülfidril (SH) taşımayan tüm proteinler çöktürücü (presipitasyon) çözelti ile çöktürüldü. GSH, elde edilen berrak sıvıda sülfidril gruplarının DTNB (5',5'-(2-dithiobis nitrobenzoik asit) ile reaksiyonu sonucu sarı rengin oluşumu ile ölçüldü. EDTA'lı kanlarda indirgenmiş GSH düzeyleri ölçümü, 24 saat içinde, spektrofotometrede 412 nm'de gerçekleştirildi (62, 63).

Ayrıçlar

1. Çöktürücü Çözelti: 1.67 g metafosforik asit, 0.2 g EDTA (etilen diamin tetraasetik asit), 30 g NaCl 100 ml'ye distile suda eritilerek tamamlandı.

2. Fosfat çözeltisi: 0.3 M disodyum fosfat distile su ile hazırlandı.

3. DTNB (Ellman's ayrıracı): 40 mg DTNB (5,5'dithiobis -(2-nitrobenzoik asit)), %1 sodyum sitrat, 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.

Deneyin yapılışı

EDTA'lı tüm kandan 200 µl alındı. Üzerine 1.8 ml distile su eklendi ve hemoliz gerçekleştirildi. Çöktürücü çözeltinin 3 ml'si ile hemolizat karıştırıldı. Beş dakika bekleme sonrası, karışım Whatman süzgeç kağıdından (No: 4) süzüldü. Örnek numuneden elde edilen süpernatantın 2 ml'si başka tüpe aktarıldı. Üzerine 8 ml fosfat çözeltisi, 1 ml DTNB ayırıcı eklendi. Blank için 2 ml çöktürücü çözelti (3 kısım çöktürücü çözelti + 2 kısım distile su), 8 ml fosfat çözeltisi ve 1 ml DTNB ayırıcı tüpe alınarak hazırlandı. Standart için, 40 mg GSH çözeltisi taze olarak hazırlandı. Spektrofotometrede 412 nm'de blanka karşı standart numunelerin optik dansiteleri okundu. Sonuçlar mg/dl tüm kan olarak hesaplandı. Eritrositte GSH miktarı için hematokrit değeri ölçüldü ve tüm kandaki GSH miktarı, hematokrit değere bölünerek bulundu (62, 63).

3.2.3.2. MDA tayini

Prensip

Yağ asitlerinin, serbest radikallerle reaksiyonu sonucu oluşan peroksidasyon ürünlerinden MDA, tiobarbutirik asit ile renkli forma girmesi ile ölçüldü (64, 65).

Lipit peroksidasyon ürünü MDA seviyesi, TBA reaktifi ile renk reaksiyonu sonucu spektrofotometrede maksimum 532 ve 600 nm'de absorbanların ölçümü ile tesbit edildi. 600 nm'de ölçüm yapılan ve hemoglobinden ileri gelen absorban miktarı, 532 nm'deki absorban miktarından çıkartıldı.

Ayıraçlar

1. EDTA çözeltisi (0.1 M): 37.224 gr EDTA-Na₂H₂O 1 litre distile suda eritildi.
2. BHT çözeltisi (% 88): 0.220 gr BHT 25 ml saf alkolde çözüldü.
3. NaOH çözeltisi (0.05 N): 2 gr NaOH 1 lt distile suda eritildi.
4. TBA çözeltisi (% 1): 1 gr TBA 100 ml'ye 0.05 N NaOH ile tamamlandı.
5. TCA (% 30) : 30 gr TCA 100 ml distile suda eritildi.

6. Fosfat Tamponu: 8.1 gr NaCl, 2.302 gr Na₂HPO₄, 0.194 gr NaH₂PO₄ distile suda eritilerek 1 lt'ye tamamlandı pH'sı 4.7'ye ayarlandı.

Deneyin Yapılışı

Bir tüpe tüm kandan 200 µl alındı. Üzerine 800 µl fosfat tamponu ve 25 µl BHT konulup süspanse edildi. 500 µl % 30'luk TCA eklendi. Tüpler vortekste karıştırılarak 2 saat süreyle -20 °C'de buzda tutuldu. Sonra 15 dk 2.000 rpm'de santrifüj edildi. Supernatantın 1 ml'si alınarak başka tüplere aktarıldı. Bunların üzerine 75 µl EDTA - Na₂H₂O ve 250 µl TBA eklendi. Tüpler vortekste karıştırıldı ve 15 dk sıcak su banyosunda (+90 °C'de) tutuldu. Sonra oda ısısına getirilerek 532 ve 600 nm'de optik dansiteleri okundu. Eritrositte gerçekleşen çalışmada 600 nm'deki optik dansiteler 532 nm'de okunanlardan çıkartılarak hemoglobindeki MDA miktarı ortadan kaldırıldı. Eritrosit MDA miktarları, MDA-TBA karışımının ekstinksiyon katsayısından (64.7636) yararlanılarak hesaplandı (64, 65).

Hesaplanması

$$A = E \times C \times L$$

A = Absorbans, E = Ekstinksiyon katsayısı,

L = Işık yolu, C = Konsantrasyon

$$1. \text{ Sulandırma : } 0.2 + 0.8 + 0.025 + 0.5 = 1.525 / 0.2 = 7.625$$

$$2. \text{ Sulandırma : } 1 + 0.075 + 0.25 = 1.325 / 1 = 1.325$$

$$\text{Sonuç} = 7.625 \times 1.325 = 10.103125 = F$$

$$c = A/a \times b = (A/\text{mol} \times \text{cm}) / 1.56 \times 10^5 \times \text{lt}) \times (1/\text{cm}) \times (10^9 \text{ nM/mol}) \times (\text{lt}/10^3 \times \text{ml})$$

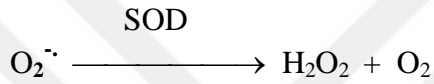
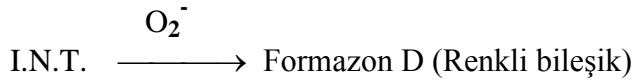
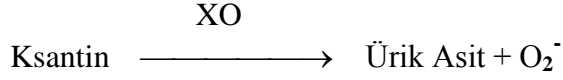
$$c = A \times 1 \times F \times 10 / 1.56 = \text{nmol} / \text{ml eritrosit}$$

3.2.3.3. SOD enzim tayini

Prensip

SOD'un rolü, oksidatif enerji basamağında üretilen toksik süperoksit radikalının (O₂⁻) hidrojen peroksite (H₂O₂) ve moleküler oksijene (O₂) dismutasyonunu

hızlandırmaktır. Bu metotla aşağıdaki formülde görüldüğü gibi ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak süperoksit radikali, 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (I.N.T.) ile kırmızı boya formuna dönüşür. SOD aktivitesi, bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçüldü (66, 67).



Ayırıcılar

Konsantrasyonları

1. Miks Substrate

Ksantin	0.05 mmol/l
I.N.T.	0.025 mmol/l

2. Tampon

CAPS	50 mmol/l pH 10.2
EDTA	0.94 mmol/l

<u>3. Xanthine Oxidase</u>	80 U/l
----------------------------	--------

<u>4. Standart</u>	5.70/ml
--------------------	---------

Deneyin yapılışı

SOD enzim aktivitesi Randox -Ransod enzim kiti ile otoanalizörde 505 nm'de 37 °C'de ölçüldü (68, 69). Analiz materyali olarak daha önce hazırlanan ve analiz zamanına kadar -20°C'de derin dondurucuda muhafaza edilen eritrosit paketi kullanıldı.

Eritrosit paketinden 10 µl alınarak 2500 µl. 0.01 M fosfat tamponu (pH = 7.0) ilave edilerek 251 katı sulandırıldı (F = 251). İnhibisyonun % 30-60 arası olması sağlandı.

Küvete aşağıdaki ayıracılar pipetlendi.

	<u>Ayıraç köru</u>	<u>Standart</u>	<u>Sulandırılmış</u>
<u>örnek</u>			
Sulandırılmış Örnek	-----	-----	20 µl
Standart	-----	20 µl	-----
Fosfat Tamponu	20 µl	-----	-----
Karışık Substrat	680 µl	680 µl	680 µl

İçerik karıştırıldı ve ilk absorban A_1 , 30 saniye sonra okundu ve eş zamanlı olarak zaman başlatıldı. Son absorban A_2 , 3 dakika sonra saptandı.

Hesaplama

Otoanalizörden alınan optik dansite sonuçları aşağıdaki denklemde yerine konarak SOD enzimi % inhibisyonları hesaplandı.

$$100 - \frac{(\Delta A_{StdDk} \cdot X100)}{(\Delta A_{Blank Dk.})} = \% \text{ İnhibisyon}$$

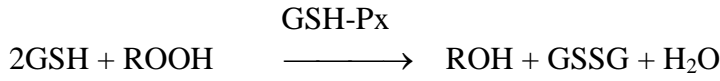
$$100 - \frac{(\Delta A_{ÖrnekDk} \cdot X100)}{(\Delta A_{Blank Dk.})} = \% \text{ İnhibisyon}$$

SOD enzim aktivitesinin hesaplanması için, standart grafiği elde edildi. Grafikten elde edilen $y = 0.0016x^2 + 0.298 - 0.05x$ ($y = U / ml$, $x = \% \text{ inhibisyon}$, $r = 0.88$, $r^2 = 0.93$, $p < 0.02$) formülü ile SOD aktivitesi U / ml tüm kanda hesaplanarak, sulandırma faktörü (251) ile çarpıldı.

3.2.3.4. GSH-Px enzim tayini

Prensip

GSH-Px, formülde görülen kumen hidroperoksit ile GSH'ı okside eden reaksiyonu katalizler. Ortamda GR ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat hidrojen (NADPH) var ise yükseltgenmiş glutatyon (GSSG), NADPH'ın NADP'ye oksidasyonu ile GSH'a indirgenir (69, 70).



Ayırıcılar

Konsantrasyonları

1. Ayırıcı :

Glutatyon	4.0 mmol/l
G.Reduktaz	≥ 0.5 U/l
NADPH	0.28 mmol/l

2. Tampon :

Fosfat	0.05 mol/l pH 7.2
EDTA	4.3 mmol/l

3. Kumen Hidroperoksit: 0.18 mmol/l

4. Sulandırma Ayıracı:

Deneyin yapılışı

GSH-Px enzim aktivitesi, Randox-Ransel enzim kitleri ile otoanalizörde 340 nm' de ultraviyole metotla 37° C' de ölçüldü (71). Analiz materyali olarak, derin

dondurucuda muhafaza edilen eritrosit paketi kullanıldı. Analiz için eritrosit paketinden 10 µl alındı. 2 ml sulandırma ayıracı ile sulandırıldı (F = 201).

Küvete aşağıdaki ayıraçlar pipetlendi.

	<u>Ayıraç körü</u>	<u>Sulandırılmış örnek</u>
Sulan. Örnek	-----	15 µl
Distile Su	15 µl	-----
Ayıraç	750 µl	750 µl
Küvet	30 µl	30 µl

Küvetler karıştırıldı, örnek ve körün absorbansları 1 dakika sonra okundu. Zaman başlatıldı, 1 ve 2 dakika sonra absorbanslar tekrar okundu. Dakika absorbans değişimi hesaplandı.

Hesaplama

$$U/l \text{ Hemolizat} = 8412 \times \Delta A_{340 \text{ nm}} / \text{dakika.}$$

Örnek ve körün U/l tüm kan sonuçları hesaplanarak, örnek değeri (U/l), kör değerden (U/l) çıkartıldı. Örnek sonuç değeri (U/l), sulandırma faktörü (F = 201) ile çarpıldı. Sonuçlar ml'ye çevrildi. Örnek GSH-Px aktivitesi, U/ml tüm kan biriminden hesaplandı.

3.2.3.5. Vitamin E tayini

Prensip

Demir III iyonları serbest α-tokoferol etkisiyle redüklenerek demir II iyonlarına dönüşürler. Bunların 2,4,6-tripiridil-s-triazinle oluşturdukları mavi-menekşe renkli kompleksin yoğunluğu spektrofotometrede 600 nm'de belirlenebilir (53).

Ayıraçlar

Ayıraçlar aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

1- Stok standart α -tokoferol (200 mg/100 ml): 500 mg α -tokoferol 250 ml'lik balonda absöüt etanol ile eritilerek 250 ml iřaretine kadar yine absöüt etanol ile dolduruldu.

2- α -tokoferol çalışma standardı (1 mg/100 ml): stok standardın 0.5 ml'si absöüt etanol ile 100 ml'ye tamamlandı.

3- TPTZ (0.12 % W/V): 2,4,6-tripiridil-s-triazinin 0.12 g'ı n-propanolde eritilip yine n-propanol ile 100 ml'ye tamamlandı.

4- Demir klorür (0.12 % W/V): $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 'nun 0.12 g'ı absöüt etanolde eritildi ve absöüt etanol ile 100 ml'ye tamamlandı.

Deneyin yapışı

Kapaklı cam test tüplerine 1 ml absöüt etanol konuldu. Test tüplerine 1 ml serum, blank tüpüne 1 ml distile su ve standart tüpüne ise 1 ml çalışma standardı ilave edildi. Bütün tüplere 1 ml xylene ilave edilerek 30 sn şiddetlice çalkalandı. Tüpler 2500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Üstteki xylene tabakasından (süpernatanttan) 0.5 ml alınarak hazırlanmış cam tüplere konuldu ve üzerine 0.5 ml TPTZ solüsyonundan ilave edildi. Karıştırıldıktan sonra 460 nm'de blank'a karşı ilk okuma yapıldı. Daha sonra tüplerimize 0.1 ml demir klorür çözeltisi eklenerek 600 nm'de blank'a karşı ikinci okuma yapıldı (53).

Hesaplama

Hesaplama Martinek (53) formölüne göre yapıldı.

$$\text{Vit E (mg/100 ml)} = \frac{\text{Testin (O.D.)}_{600} - \left[0.40 \times \text{Testin (O.D.)}_{460}\right]}{\text{Standartın (O.D.)}_{600}}$$

Testin (O.D.)₆₀₀: Testin 600 nm dalga boyunda okunan optik dansitesi.

Testin (O.D.)₄₆₀: Testin 460 nm dalga boyunda okunan optik dansitesi.

0.040: Düzeltme faktörü.

Standart (O.D.)₆₀₀: Standartın 600 nm'de okunan optik dansitesi (% 1 mg α -tokoferol içeren).

3.2.4. İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama \pm standart sapma şeklinde ifade edildi ve varyans analizi (ANOVA) kullanılarak analiz edildi. Ortalamalar arasındaki farklar Duncan testi kullanılarak tespit edildi ve $P \leq 0.05$ istatistiksel farklılığı gösterdi (72).



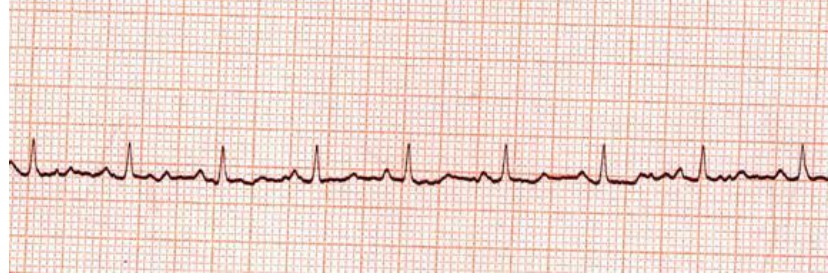
4. BULGULAR

Sudan çıkarıldıktan hemen sonra yapılan ölçümlerde kontrol, hipotermik ve vitamin E uygulanmış hipotermik gruplarda bulunan kobayların rektal vücut ısıları sırasıyla 38.11 ± 1.05 , 23.77 ± 2.68 ve 23.40 ± 1.83 olarak tespit edildi. Hipotermi oluşturulan gruplarda vücut ısısı önemli oranda azaldı ($P \leq 0.05$).

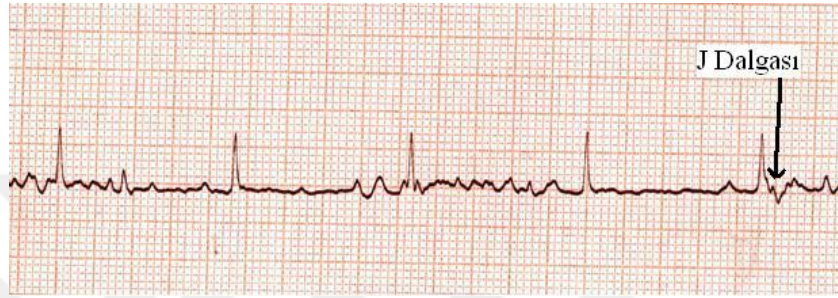
K ve Vit E+H gruplarının II. derivasyonlardan elde edilen tüm dalgaların boy ve sürelerine ait değerler tablo 1'de verilmiştir. Ayrıca K, H ve Vit E+H gruplarına ait EKG'de (II. derivasyon) oluşan tipik bulgular şekil 2'de gösterilmiştir. Kontrol grubunda yer alan kobayların II. derivasyonunda P dalgasının ortalama süresi 0.03 sn, ortalama amplitüdü ise 0.12 mV'du. QRS kompleksinin ortalama süresi 0.03 sn ve ortalama amplitüdü ise 0.50 mV'du. T dalgasının süresi 0.03, amplitüdü ise 0.10 mV'du. Hipotermik kobaylarda ise üçüncü derece atrioventriküler blok ve Osborn J dalgası (erken ventriküler repolarizasyon) EKG'de oluşan önemli bulgulardı. Vitamin E uygulanan hipotermik grupta ise bu değerlerden hiçbirinde kontrole göre farklılık olmadığı ($P > 0.05$) gözlemlendi.

Tablo 1. K ve Vit E+H gruplarından elde edilen II. derivasyonlara ait tüm dalgaların amplitüd ve süreleri. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=10).

Değerler	GURUPLAR	
	K	Vit E + H
P (sn)	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
P (mV)	0.12 ± 0.02	0.11 ± 0.02
QRS (sn)	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
QRS (mV)	0.50 ± 0.09	0.60 ± 0.12
T (sn)	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
T (mV)	0.10 ± 0.03	0.10 ± 0.03
P-R (sn)	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01
Q-T (sn)	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.02



(a)



(b)



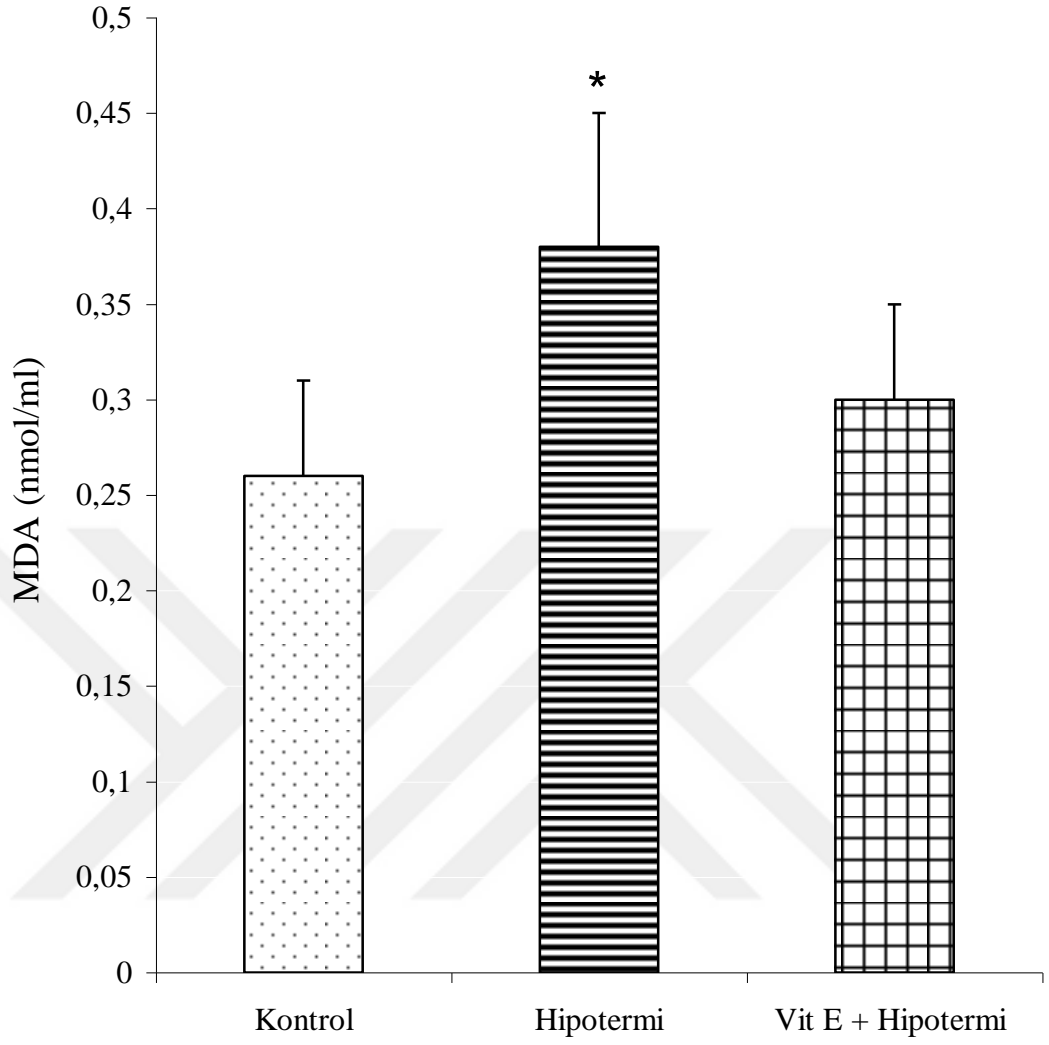
(c)

Şekil 2. K, H ve Vit E+H kobayların tipik II. derivasyon bulguları (Kağıt hızı; 50 mm/sn ve 1 mV = 10 mm). a) K, b) H, c) Vit E+H grup.

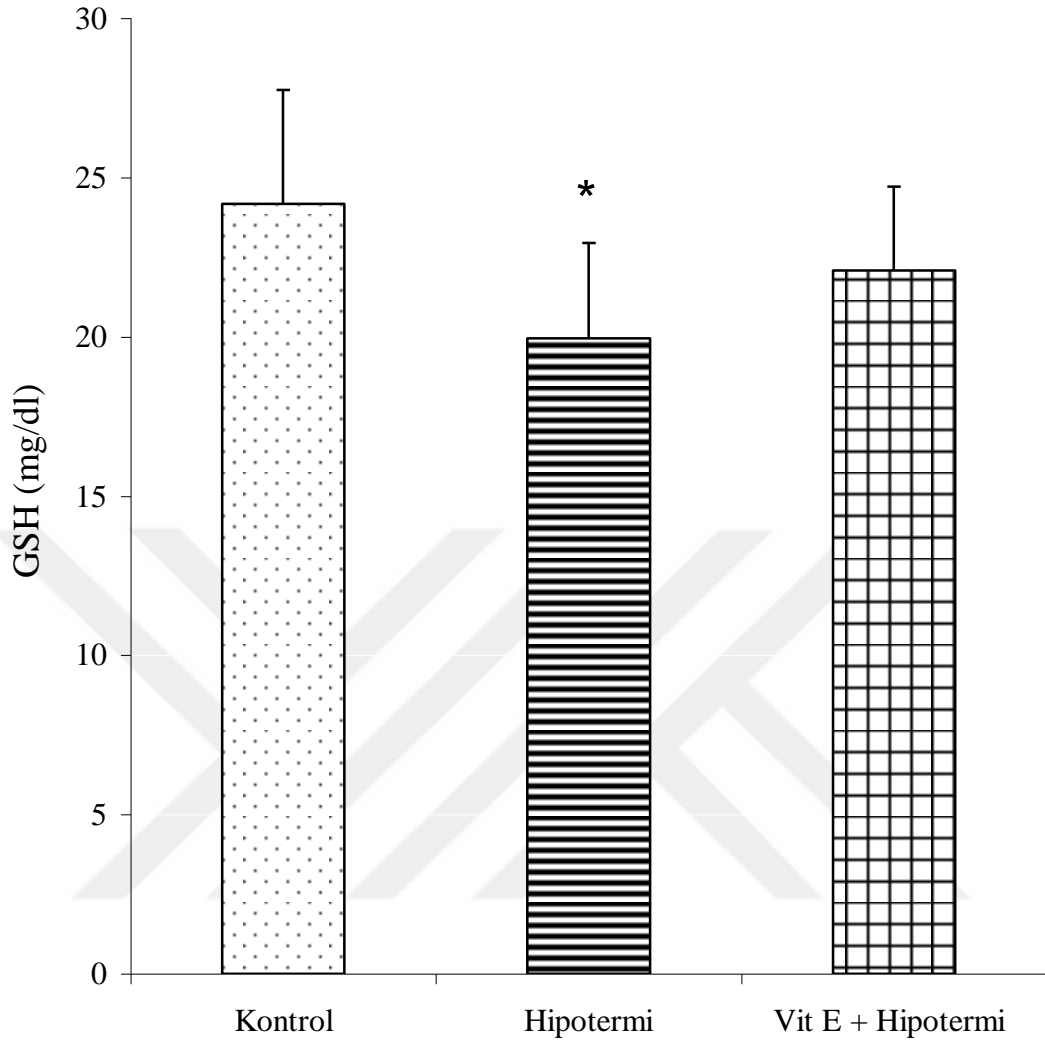
K, H, Vit E+H gruplarına ait MDA, GSH, SOD, GSH-Px ve vitamin E değerleri tablo 2’de verilmiş ve grafiksel olarak sırasıyla şekil 3, 4, 5, 6 ve 7’de gösterilmiştir. Hipotermi oluşturulan kobaylarda MDA düzeyinin önemli ölçüde arttığı ($P \leq 0.05$), SOD aktivitesinin değişmediği, GSH, GSH-Px ve Vitamin E değerlerinin ise önemli ölçüde azaldığı ($P \leq 0.05$) görüldü. Vitamin E uygulanmış hipotermik grupta bulunan kobaylarda ise bu bulgular tamamen normaldi.

Tablo 2. K, H, Vit E+H gruplarına ait MDA, GSH, SOD, GSH-Px ve vitamin E değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=10).

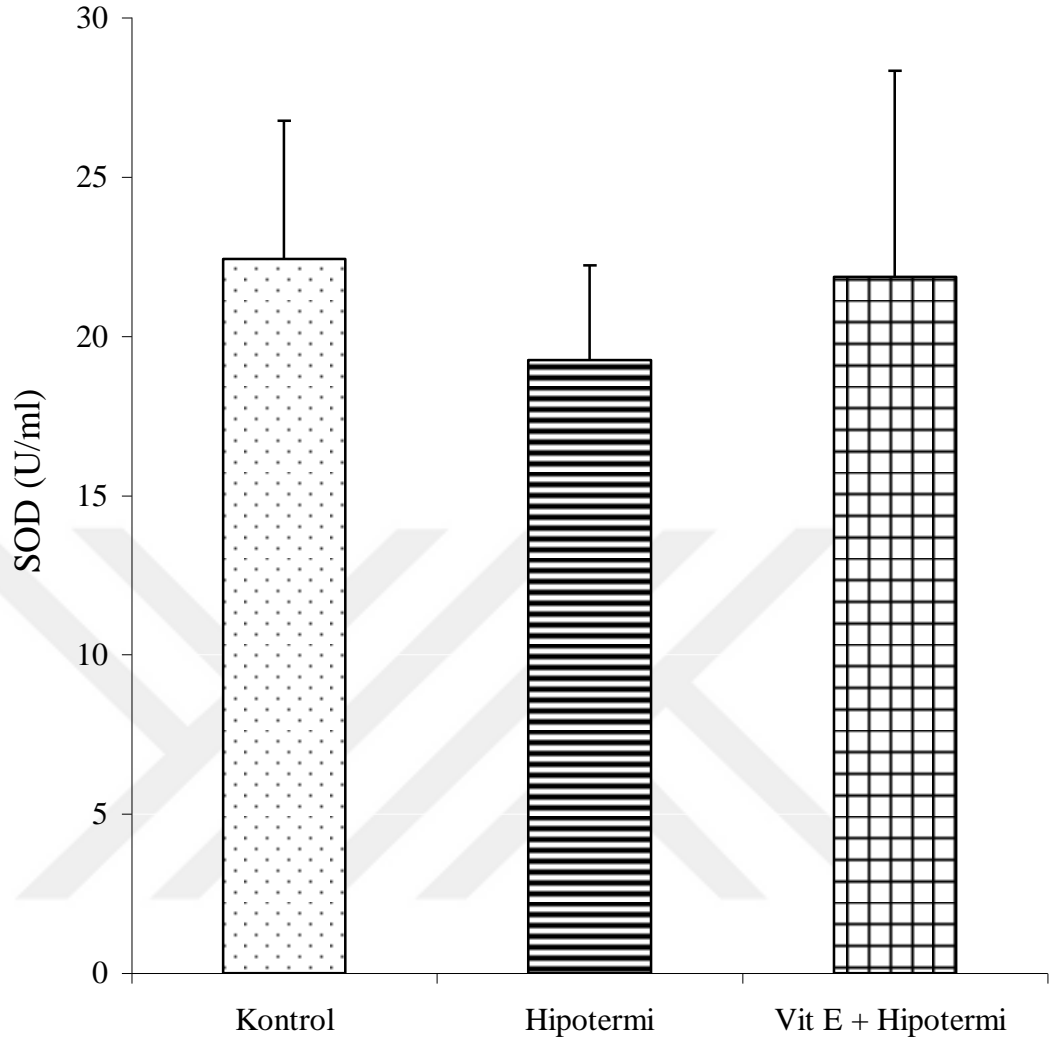
Değerler	GURUPLAR		
	K	H	Vit E + H
MDA (nmol/ml)	0.26 \pm 0.05	0.38 \pm 0.07	0.30 \pm 0.05
GSH (mg/dl)	24.2 \pm 3.57	19.9 \pm 2.99	22.1 \pm 2.63
SOD (U/ml)	22.4 \pm 4.33	19.2 \pm 2.94	21.8 \pm 6.47
GSH-Px (U/ml)	37.7 \pm 4.03	27.5 \pm 4.58	31.1 \pm 3.99
Vitamin E (mg/dl)	0.19 \pm 0.01	0.14 \pm 0.02	0.22 \pm 0.03



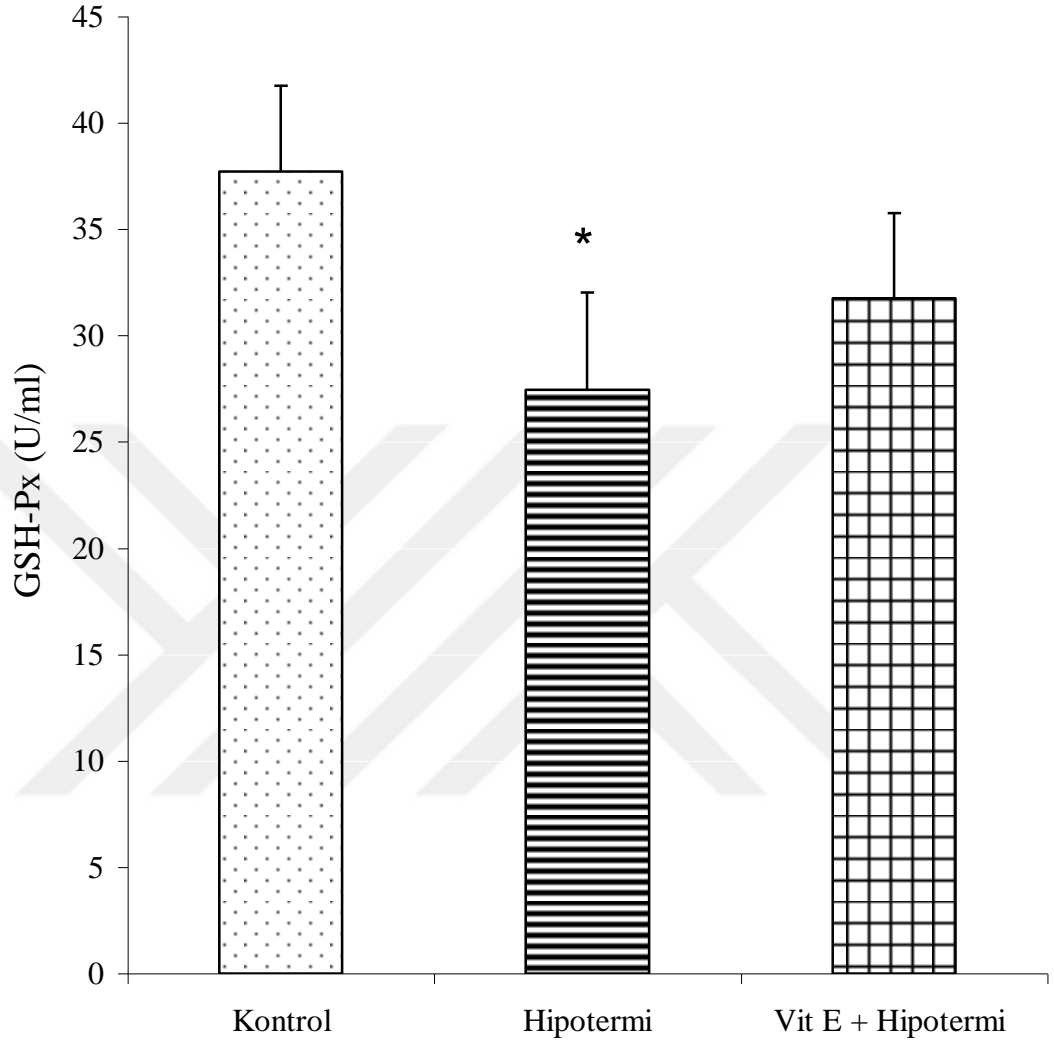
Şekil 3. K, H ve Vit E+H gruplarının MDA (nmol/ml) değerleri. Değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=10). * Kontrol grubu ile deneme grubu arasındaki farkı ($P \leq 0.05$) ifade etmektedir.



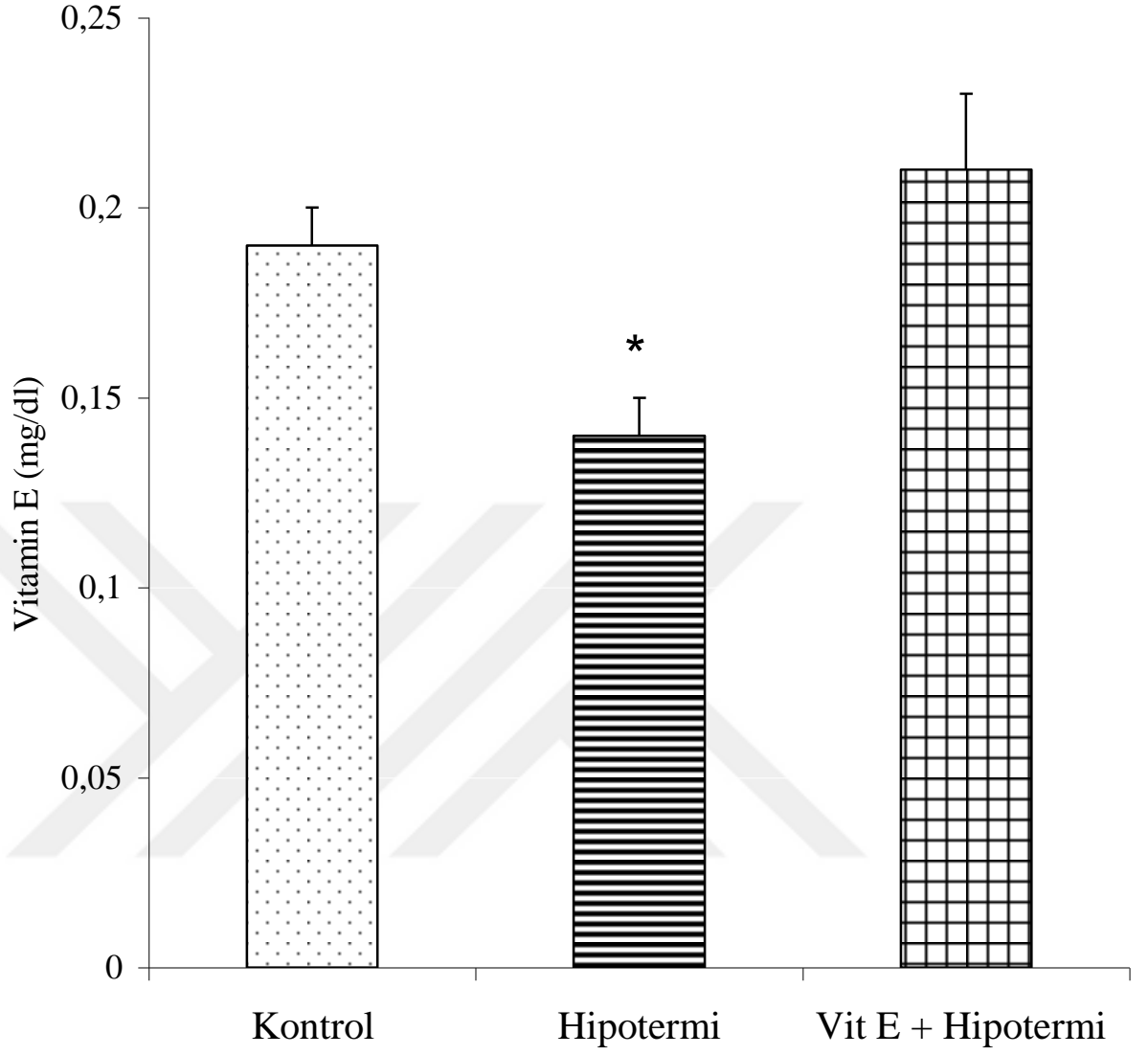
Şekil 4. K, H ve Vit E+H gruplarının GSH (mg/dl) değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=10). * Kontrol grubu ile deneme grubu arasındaki farkı ($P \leq 0.05$) ifade etmektedir.



Şekil 5. K, H ve Vit E+H gruplarının SOD (U/ml) değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=10).



Şekil 6. K, H ve Vit E+H gruplarının GSH-Px (U/ml) değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=10). * Kontrol grubu ile deneme grubu arasındaki farkı ($P \leq 0.05$) ifade etmektedir.



Şekil 7. K, H ve Vit E+H gruplarının vitamin E (mg/dl) değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=10). * Kontrol grubu ile deneme grubu arasındaki farkı ($P \leq 0,05$) ifade etmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada vitamin E uygulamasının deneysel olarak hipotermi oluşturulan kobaylarda EKG bulguları, kan lipit peroksidasyonu ve antioksidan enzim düzeyleri üzerine etkileri araştırıldı. Hipotermi vücut ısısının düşmesiyle ($< 35^{\circ}\text{C}$) ortaya çıkan bir durumdur (7). Çalışmada soğuk su içerisinde tutulan kobayların vücut ısılarının kontrol grubuna göre önemli derecede azalması ($< 24^{\circ}\text{C}$), hayvanlarda şiddetli bir hipotermi oluştuğunu gösterdi (8).

Vitamin E uygulanmayan hipotermik kobaylarda EKG bulguları olarak; üçüncü derece atrioventriküler blok ve Osborn J dalgası (erken ventriküler repolarizasyon) gözlemlendi. Bu sonuçlar daha önceki çalışmalarda elde edilen sonuçlara benzerlik göstermektedir. Alsafwah (11) 77 yaşındaki yaşlı bir bayanda hipotermi sonucu EKG’de görülen değişiklikleri; sinus bradikardisi, P-R ve Q-T aralığında uzama, idioventriküler ritim, T dalgasında değişiklikler ve J dalgası olarak belirtmiştir. Aynı şekilde Cheng (73) çalışmasında benzer bulguların yanı sıra kas titremesine bağlı olarak EKG’de oluşan anormalliklere de dikkat çekmiştir. Durakovic ve ark. (74) ise EKG’de oluşan değişikliklere ilaveten hipotermi durumunda; periferel vazokonstriksiyon, hipoperfüzyon, hipoksi, kalbin dakika hacminde azalma ve sistemik kan basıncı düşme olduğunu belirtmiştir. Benzer şekilde Cheng (73) hipotermi ile ilgili yaptığı çalışmada 37°C ’de nabız basıncında artma, 35°C ’de periferel vasokonstriksiyon, 32°C ’de supraventriküler aritmi, 28°C ’de ventriculer aritmi, 22°C ’de ventriküler fibrilasyon, 18°C ’de ise asistol durumlarının oluştuğunu ifade etmiştir.

Hafif hipotermi durumlarında sistemik uyarının artmasına bağlı olarak taşikardi oluşur. Ancak vücut ısısı 32°C nin altına düşerse sinüs bradikardisi şekillenir (11). Şiddetli hipotermi sonucu oluşan sinüs bradikardisinin nedeni olarak sodyum/potasyum pompasının aktivitesinin ve buna bağlı olarak sino atrial düğümde oluşturulan uyarı sayısının azalması gösterilmiştir (11).

Hipotermi sonucu oluşan elektrokardiyografik değişikliklerden birisi olan J dalgası QRS kompleksinin terminalinde bir çıkıntı gibi durduğundan “deve hörgücü” olarak da isimlendirilir. Bu dalganın amplitüdü ve süresi vücut ısısının düşmesine paralel olarak artar. J dalgası vücut ısısının 35°C ’nin altına indiği durumların % 80’inde

intraventricüler uyarının gecikmesine bağılı olarak görülür. Bu dalganın oluşum mekanizması kalp epikardiyal hücrelerinde bulunan potasyum kanallarının hipoksiye bağılı olarak normalden daha uzun süre açık kalması ile açıklanmıştır. Bu hücrelerin aksiyon potansiyellerinin süre ve amplitüdü endokardiyum hücrelerinkinden daha fazla olmasına ve dolayısıyla J dalgasının oluşumuna yol açmaktadır. Hipotermiye maruz kalan hastalar yeniden ısıtıldıklarında, potasyum kanallarının kapanma süresi kısalır, epikardiyal hücrelerin aksiyon potansiyelinin süre ve amplitüdü azalır ve dolayısıyla J dalgası zamanla ortadan kalkar (11). Cheng (73) hipotermi durumunda kalp hücrelerinde kalsiyum miktarının aşırı oranda arttığını, artan bu kalsiyumunun hücrelerde toksik etki yaparak depolarizasyon oranı ve uyarı iletiminde bozukluğa neden olduğunu ve dolayısıyla QRS kompleksinin süresinin uzadığını belirtmiştir.

EKG'deki değişikliklere ilave olarak hipotermi oluşturulan kobaylarda MDA değerinin önemli ölçüde arttığı, SOD değerinin değişmediği, GSH ve GSH-Px değerlerinin ise önemli ölçüde azaldığı tesbit edildi. Yoğun literatür taraması yapılmış bu konuyla ilgili canlı hayvanlar üzerinde yapılmış sadece bir çalışmaya rastlanılmıştır. Dede ve ark. (75) ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada, sunulan çalışmaya benzer olarak hipotermi durumunda GSH değerinin azaldığını, MDA değerinin arttığını, SOD ve GSH-Px enzim düzeylerinin ise değişmediğini bildirmişlerdir. Hipotermi sonucu lipid peroksidasyonunda meydana gelen artmanın nedeni tam olarak ortaya konulamamıştır. Ancak hipoterminin reaktif oksijen türleri ve hidroksil radikallerini artırarak hücre membranı ve komponentlerinde hasar oluşturduğu ve dolayısıyla hücre ölümü ve serbest radikallerin oluşumuna neden olduğu ileri sürülmüştür (76).

Bu çalışma ile aynı zamanda GSH ve GSH-Px değerlerinin hipotermik kobaylarda önemli ölçüde azaldığını ortaya konulmuştur. Gradinski-Vrbanac ve ark. (77) hipoterminin glukoz ve pentoz fosfat yollarında etkili olan enzimlerin aktivitelerinde metabolik değişikliklere neden olduğunu ileri sürmüştür. G-6-PD enzimi pentoz fosfat yolundaki ilk basamağı katalize eder ve GSSG'nin GSH'a dönüşümünde gerekli olan NADPH'ın oluşumunu sağlar (78). Dede ve ark (75) hipotermi durumunda G-6-PD enzim aktivitesinin önemli ölçüde azaldığını ortaya koymuşlardır. Bu nedenle, düşük bulunan GSH seviyesi G-6-PD enzim aktivitesi ve dolayısıyla NADPH oluşumundaki azalmaya bağılı olarak oluşmuş olabilir. Ancak GSH seviyesindeki

azalma ayrıca şu faktörlere bağlı olarak da şekillenebilir, 1) oksidasyon oranındaki artma; ve 2) lipit ve diğer peroksitlerin uzaklaştırılması için GSH kullanımının artması (75).

GSH-Px enzimi GSH'nın GSSG'ye dönüşümünü sağlar. Bu nedenle bu enzim aktivitesinin artması GSH'nın GSSG'ye oksidasyonunu artırır. Bu çalışmada hipotermik (vücut ısısı < 24 °C) kobaylarda GSH-Px enzim aktivitesinin önemli derecede azaldığı tesbit edilmiştir. Ancak Dede ve ark (75), yaptıkları çalışmada orta şiddetli (vücut ısısı 28 °C) hipotermik ratların GSH-Px enzim aktivitesinin değişmediğini ileri sürmüşlerdir. Elde edilen farklı sonucun vücut ısısındaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir. GSH-Px enzim aktivitesinin hipotermik kobaylarda düşük bulunmasına rağmen GSH seviyesinin de düşük olması, hipotermi sırasında GSH kullanımının arttığı fikrini güçlendirmektedir.

SOD enzimi hücrenin sitoplazma ve mitokondrisinde lokalize olur (78). Dolayısıyla bu çalışmada SOD enzim aktivitesinde değişiklik görülmemesi, oluşturulan hipotermimin hücre membranında hasar meydana getirerek MDA seviyesini artırdığı, ancak mitokondri gibi hücre komponentlerine etki etmediğini göstermektedir.

Vücut ısısı aynen hipotermik kobaylarda olduğu gibi 24 °C'nin altında olmasına rağmen, hipotermik kobaylarda görülen ve yukarıda belirtilen değişikliklerin hiç biri vitamin E uygulanan kobaylarda görülmedi. Çok güçlü bir antioksidan olan vitamin E, hücre membran fosfolipidlerinde bulunan çok sayıda doymamış bağ içeren yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyarak vücudun ilk savunma hattını oluşturur. Vitamin E, süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksit ve radikallerini ve diğer radikal örneklerini indirger (19, 30, 79, 80). Vitamin E aynı zamanda önemli biyolojik membranların yapı maddesidir (81). Vitamin E konsantrasyonu ile lipit peroksidasyonu arasında tersine bir korelasyon vardır (82). Örneğin vücutta antioksidan vitamin konsantrasyonu azaldığı zaman hücre membranında hasara yol açan plazma lipit peroksidasyonu artar (81, 82, 83). Sunulan çalışmada da vitamin E uygulanan hipotermik kobaylarda MDA seviyesinde azalma görülmüştür.

GSH-Px enzimi ile vitamin E'nin serbest radikallere karşı etkileri birbirlerini tamamlayıcı yöndedir. GSH-Px oluşan peroksitleri ortadan kaldırırken vitamin E

peroksitlerin sentezini engeller (19) . Hidrojen peroksit (H_2O_2) ve organik peroksitler (R-O-OH) lipid peroksidasyonu ve dolayısıyla hücrenin yıkımı üzerine etkilidirler. Her iki peroksit de GSH-Px etkisi ile suya ve alkollere redüklenirken, membran lipidlerinin otooksidasyon yoluyla organik peroksitleri şekillendirmesi, vitamin E tarafından önlenir. Oksitlenmeye karşı çok duyarlı olan doymamış yağ asitleri enerji temininden ziyade hücre membranının yapısında bulunurlar (31) .

Bu çalışmada ayrıca hipotermik kobaylarda EKG’de görülen değişikliklerin hiç birinin vitamin E uygulanan kobaylarda görülmediği tesbit edildi. Vitamin E’nin kalp üzerindeki koruyucu etkisi birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Sethi ve ark (84) vitamin E’nin kalp aritmileri ve fonksiyon bozuklukları üzerine olan etkilerini araştırmışlar, vitamin E’nin oksidatif stresi azaltarak kalp üzerinde koruyucu etki yaptığını savunmuşlardır. Serbest radikaller iskemik miyokardiyal hasara ve buna bağlı olarak hücre membranlarının elektriksel özelliklerinde değişikliğe yol açarlar (85). Kalp kası hücre membranının elektriksel özelliğinin değişmesi membranda bulunan iyon kanalları ve pompalarının aktivitelerini etkileyerek EKG’de birtakım değişikliklere neden olur. Hipotermi durumunda artan serbest radikallerin EKG’de ne tür değişikliklere neden olduğu ve bu değişikliklerin sebeplerinden daha önce bahsedildi. Bu çalışmada elde edilen sonuca benzer olarak vitamin C ve E gibi antioksidan vitamin uygulamalarının akut miyokardiyal bozukluklarda EKG’de oluşan değişiklikleri tamamen düzelttiği belirtilmiştir (85). Vitamin E, bu etkisini büyük bir olasılıkla serbest radikallerin hücre membranının elektriksel özelliği üzerine yaptığı olumsuz etkiyi gidererek göstermektedir.

Sonuç olarak deneysel hipotermi oluşturulan kobaylarda EKG bulgularında üçüncü derece atriyoventriküler blok ve Osborn J dalgası (erken ventriküler repolarizasyon) olduğu, MDA değerinin önemli ölçüde arttığı, SOD değerinin değişmediği, GSH, GSH-Px ve vitamin E değerlerinin ise önemli ölçüde azaldığı görüldü. Deneysel hipotermi oluşturmadan önce uygulanan vitamin E’nin ise hipotermiminin oluşturduğu tüm bu değişiklikleri önlediği tespit edildi.

ÖZET

Aslan L, Vitamin E'nin Hipotermik Kobaylarda EKG, Serum Lipit Peroksidasyonu ve Antioksidan Enzim Düzeyleri Üzerine Etkisi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2004. Bu çalışmada vitamin E uygulamasının deneysel olarak hipotermi oluşturulan kobaylarda elektrokardiyogram (EKG) bulguları, serum lipit peroksidasyonu ve antioksidan enzim düzeyleri üzerine etkileri araştırıldı. Araştırmada 500-800 gr ağırlığında 30 adet sağlıklı erkek kobay (guinea pig) kullanıldı. Bir haftalık adaptasyon süresinden sonra, kobaylar her bir grupta 10 adet olacak şekilde kontrol (K), hipotermik (H) ve vitamin E uygulanan hipotermik (Vit E+H) olmak üzere 3 deneme grubuna ayrıldı. Analizler yapılmadan önce Vit E+H grubundaki kobaylara oral olarak 4 gün boyunca 460 mg/kg vitamin E verildi. Diğer iki gruba (K ve H) vitamin E verilmedi. Son vitamin E uygulamasından 24 saat sonra H ve Vit E+H gruplarında yer alan kobaylar herhangi bir anestezi veya tarankilizan madde verilmeden boyunlarının üst kısmına kadar soğuk su (10-12 °C) içerisine sokuldular ve 5 dakika soğuk su içerisinde tutuldular. Kontrol grubundaki kobaylar ise aynı yöntemle vücut ısısındaki (37 °C) su içerisinde 5 dakika tutuldular. Su içerisinden çıkarılan kobayların rektal vücut ısıları termometre ile ölçüldü ve EKG'leri çekildi. EKG çekimini takiben malondialdehit (MDA) süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve redükte glutatyon (GSH) tayini için eter ile anestezi edilen hayvanların kalbinden biri EDTA'lı olmak üzere iki plastik tüpe kan örnekleri alındı. Hipotermi oluşturulan grupta vücut ısısı önemli oranda azaldı. Üçüncü derece atriyoventriküler blok ve Osborn J dalgası (erken ventriküler repolarizasyon) şekillendi. Ayrıca bu kobaylarda MDA değerinin önemli ölçüde arttığı, SOD değerinin değişmediği, GSH ve GSH-Px değerlerinin ise önemli ölçüde azaldığı görüldü. Vitamin E uygulanmış hipotermik grupta bulunan kobaylarda vücut ısısı önemli derecede düşmesine rağmen, hipotermi grubunda gözlenen bulgulara bu grupta rastlanmadı. Böylece, vitamin E'nin hipotermi oluşturduğu lipit peroksidasyonunu ve EKG'deki değişiklikleri önlediği, ve ayrıca antioksidan savunma sistemini güçlendirdiği sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Antioksidanlar, EKG, hipotermi, lipit peroksidasyon, vitamin E.

SUMMARY

Aslan L, Effect of vitamin E on ECG, blood lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in experimentally-induced hypothermic guinea-pigs, University of Yuzuncu Yil, Health Sciences Institute, MSc Thesis in the Department of Physiology, Van, 2004. This study was carried out to determine the effects of vitamin E treatment on electrocardiogram (ECG), blood lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in experimentally-induced hypothermic guinea-pigs. Thirty healthy male guinea-pigs, weighing 500-800 g were used. After one week of adaptation period, guinea-pigs were randomly divided into three experimental groups: control (C), hypothermic (H) and vitamin E-treated hypothermic (Vit E+H), each containing 10 animals. Guinea-pigs in Vit E+H group were given orally 460 mg/kg vitamin E for four days before hypothermia induction. Twenty four hours after the last vitamin E treatment, guinea-pigs in H and Vit E+H groups were cooled by immersion into cold water (10-12 °C), and the control rats were immersed into water of body temperature (37 °C) up to the neck without using any anesthetic or tranquilizer for 5 minutes. Immediately after the cooling, rectal body temperatures were measured and ECG recordings were made. After the ECG recording, blood samples for the measurements of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels, and superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) enzyme activities were collected into heparinized and non-heparinized test tubes by cardiac puncture under an ether anesthesia. In hypothermic group, body temperature decreased significantly. Complete heart block and J wave were observed as ECG findings. In addition, MDA level was higher, SOD level was un-changed, and GSH level and GSH-Px enzyme activity were lower in hypothermic group. Although body temperature was significantly lower in vitamin E treated hypothermic guinea-pigs, findings observed in hypothermic group were not observed in this group. Thus, it was concluded that vitamin E treatment might prevent the hypothermia-induced lipid peroxidation and alterations in ECG, and increase the activity of antioxidant defense system.

Key Words: Antioxidants, ECG, hypothermia, lipid peroxidation, vitamin E.

KAYNAKLAR

1. Kirkpatrick AW, Chun R, Brown R and Simons RK (1999). Hypothermia and the trauma patient, *Can. J. Surg.*, 42, 333-343.
2. Zhang F, Salley R, Wu G and Chien S (1994). Effect of glutathione on hypothermic lung preservation, *Acta Biomed. Ateneo Parmense*, 65, 199-211.
3. Rauen U and Groot H (1998). Cold-induced release of reactive oxygen species as a decisive mediator of hypothermia injury to cultured liver cells, *Free Radic. Biol. Med.*, 24,1316-1323.
4. Erenel G, Erbaş D ve Arıcıoğlu A (1992). Serbest radikaller ve antioksidan sistemler, *Gazi Tıp Derg.*, 3, 243 - 250.
5. Murray RK, Mayes AA, Granner DK and Rodwell VW (1993). Harper's Biochemistry, Çevirim Mentеш G and Ersöz B, Barış Printing House, İstanbul, 183.
6. Yaman K (1999). Fizyoloji, Vipaş Yayıncılık, Bursa.
7. Mackenzia MA, Aengevaeren WRM, Hermus RMM, Werf T, Pieters FFM, Smals GH and Kloppenborg WC (1992). Electrocardiographic changes during steady mild hypothermia and normothermia in patients with poikilothermia. *Clinical Science*, 82, 39-45.
8. Anonim (2003). <http://mustafayildiz.8m.com>.
9. Yılmaz B (2000). Fizyoloji, Feryal Matbaacılık, Ankara.
10. Anonim (2004). <http://www.ato.org.tr/konuk/austun/KY/Ekg.html>.
11. Alsafwan S (2001). Electrocardiographic changes in hypothermia, *Heart Lung*, 30, 2, 161-163.
12. Patel A, Getsos JP, Moussa G and Damato AN (1994). The Osborn wave of hypothermia in normothermic patients, *Clin. Cardiol.*, 17, 273-276.
13. Bashour TT, Gualberto A and Ryan C (1989). Atrioventricular block in accidental hypothermia a case report, *Angiology*, 40, 63-66.
14. Yan G-X and Antzelevitch C (1996). Cellular basis for the electrocardiographic J wave, *Circulation*, 93, 372-379
15. Nakayama T and Fozzard H (1998). Adrenergic modulation of the transient outward current in isolated canine purkinje cells, *Circ. Res.*, 62, 162-172.
16. Özdemir G (1993). Reaktif Oksijen Partikülleri (ROP) oksidan molekülleri, serbest radikaller, Roche Bilimsel Eserleri Serisi.

17. Reilly PM, Schiller HJ and Bulkley GB (1991). Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites *Am. J. Surg.*, 161,488.
18. Kavas GÖ (1989). Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri, *Türkiye Klin. Derg.*, 9, 1, 1-8.
19. Aslan R, Şekeroğlu MR ve Bayıroğlu F (1995). Serbest radikal türlerinin membran lipid peroksidasyonuna etkileri ve hücrel antioksidan savunma, *Y.Y.Ü. Sağ. Bil. Derg.*, 2, 137-142.
20. Moslen MT (1994). Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis, Free radicals in diagnostic medicine, Ed: D. Armstrong, Plenum Press, New York, 1-15.
21. Slater TF (1984). Overview of methods for detecting lipid peroxidation, *Methods in Enzymology*, 105, 283-305.
22. Niki E (1987). Antioxidant in relation to lipid peroxidation, *Chem. Phy. Lipids* 44, 227-253.
23. Porter NA (1984). Chemistry of lipid peroxidation, *Methods in Enzymology*, 105, 273-283.
24. Thomas M (1995). The role of free radicals and antioxidants, how do we know that they are working, *Food Science and Nutrition*, 35, 1, 21-39.
25. İsbir T (1994). Antioksidan Sistemler In: Endotel, İzmir Tabip Odası, Tıpta Temel Bilimler Kolu, Sonbahar Okulu, İzmir Ekim, 92-98.
26. Freeman BA and Cropo JD (1982). Free radicals and tissue injury, *Lab. Invest.*, 47, 412-426.
27. Hopkins J and Tudhope GR (1973). Glutathione peroksidase in human red cell in health and disease, *British J. Hematol.*, 25, 563-566.
28. Wernes SW, Shea MJ and Lucchesi BR (1986). Free radicals and myocardial injury, Pharmacologic Implications, *Circulation*, 74, 1, 1-5.
29. Mayes PA (1993). Lipids of Physiologic Significance, In Harper's Biochemistry, Ed: RK Murray, DK Granner, AA Mayes and VW Radwell, Lange Medical Publication London, 23nd Ed., 142-153, 588-598.
30. Cheeseman KH and Slater TF (1993). An introduction to free radical biochemistry, *Br. Med. Bul.*, 49, 3, 479-493.
31. Nizamlioğlu M and Tiftik AM (1992). The relation of glutathione peroxidase (GSH-P_x) enzyme activity with vitamin E and selenium, *Türk Vet. Hek. Derg.*, 4, 1, 10-13.

32. Ersoy E ve Bayşu N (1986). Biyokimya, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Yayınları, Ankara.
33. Spallholz JE (1990). Selenium and glutathione peroxidase essential nutrient and antioxidant component of the immune system, *Antioxidant Nutrients and Immune Function*, 262, 145-158.
34. Tucker EM (1976). Some physiological aspects of genetic variation in the blood of sheep, *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.*, 7, 207-217.
35. Shan X, Aw TY and Jonei DO (1990). Glutathione-dependent protection against oxidative injury, *Pharmac. Ther.*, 47, 61-71.
36. Tucker EM (1981). Genetic variation in the sheep red blood cell, *Biol. Rev.*, 46, 341-386.
37. Kalaycıoğlu L (1984). Konya zootekni araştırma enstitüsü merinos koyunlarında eritrosit glutatyon değerleri üzerinde araştırmalar, *Selçuk Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 141-147.
38. Flethcer RH and Flethcer SW (1994). Glutathione and aging ideas and evidence, *The Lancet*, 8934, 1379.
39. Meister A and Anderson ME (1983). Glutathione, *Ann. Rev. Biochem.*, 52, 711-760.
40. Yagi K (1994). Lipid Peroxidase and Related Radicals in Clinical Medicine, Free Radicals in Diagnostic Medicine Ed: D Armstrong, Plenum Press, New York.
41. Sinclair AJ, Bennett AH and Junec J (1990). Free radicals and antioxidant systems in health and disease, *British J. Hosp. Med.*, 43, 334-344.
42. Janssen YMW, Houten BV, Borm PJA and Mossmon BT (1993). Biology of disease cell and tissue responses to oxidative damage, *Lab. Invest.*, 69, 3, 261-274.
43. Dormandy TL (1983). An approach to free radicals, *The Lancet*, 29, 1010-1014.
44. Akkuş İ (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya.
45. Aliakber S, Brown PR and Bidwell DE (1993). Human erythrocyte superoxide dismutase in adults neonates and normal, hypoxemic, anemic and chromosomally abnormal fetuses, *Clin. Biochem.*, 26, 109-113.
46. Zheng Xiu-Mer and Ellis EF (1990). Superoxide dismutase reduces permeability and Induced by hypertension in rats, *Am. J. Physiol* , 259, 479-503.
47. Erden M (1992). Serbeset radikaller, *T. Klin. Tıp Bilimleri Dergisi*, 12, 201-207.

48. Stryer L (1988). Biosynthesis of Amino Acids and Heme In Biochemistry, 3rd Ed., WH Freeman and company, New York, 575-600.
49. Kalaycıoğlu L, Serpek B, Nizamlıoğlu M, Başpınar N ve Tiftik AM (2000). Biyokimya, 2. Baskı, Nobel Yayınevi, Ankara.
50. Karagöl H, Altıntaş A, Fidancı UR ve Sel T (2000). Klinik Biyokimya, Medisan, Ankara.
51. Tıp S ve Top ř (1993). E vitamininin kanser ve kardiovasköler hastalıklarla ilişkisi, *T. Klinik Tıp Bilimleri Dergisi*, 13,288-289.
52. Lunce J and Blake D (1990). Oxygen Free Radicals, Their Relevance to Disease Processes In “The Metabolic and Molecular Basis of Acquired Disease” Ed: RD Cohen, B Lewis KG Albert MM, Balliere Tindall, London, 189-212.
53. Yařar S (2003). Florozisli koyunlarda vitamin ve mineral düzeylerinin incelenmesi, Y.Y.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Van.
54. Clarkson PM (1995). Antioxidants and physical performance, critical reviews, *Food Science and Nutrition*, 1-2, 35, 131-141.
55. Dündar Y ve Aslan R (2000). Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar, Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, Afyon.
56. Stompfer MJ, Hennekens CH and Manson JE (1993). Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women, *The New England Journal of Medicine*, 328, 20, 1444-1449.
57. Kesseb M and Hamliri A (1986). Experimental fluorosis in sheep alleviating effects of aluminum, *Vet. Hum. Toxicol*, 28, 4, 300-304.
58. Mert N, Bildik A, Ertekin A ve Dede S (1999). Biyokimya, Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Yayını, Van.
59. Packer L and Landvik S (1990). Vitamin E in Biological Systems as Antioxidants in Therapy and Preventive Medicine, Ed: I Emerit, L Packer and A Clair, Plenum Press, New York, 93-103.
60. Umegaki K, Sano M, Suzuki K, Tomita I and Esashi T, Increases in 4-hydroxynenal and hexanal in bone marrow of rats subject to total body X-ray irritation association with antioxidant vitamins, *Bone Marrow Transplantation*, 23, 173-178
61. Doğan İ, (2002). Florozisli koyunlarda antioksidan maddelerin incelenmesi, Yüzüncü Yıl Üniv., Sağlık Bilimleri Ens., Biyokimya Anabilim Dalı Y.Lisans Tezi.

62. Beutler E, Dubon O and Kelly BM (1963). Improved method for the determination of blood glutathione, *J. Lab. Clin. Med.*, 61, 882-888.
63. Rizzi R, Caroli A, Bolla P, Acciaioi A and Pagnacco G (1988). Variability of reduced glutathione levels in mauseuse ewes and its effect on daily milk production, *J. Dairy Research*, 55, 345-353.
64. Gutteridge JM (1994). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage, *Clin. Chem.*, 41, 12, 1819-1995.
65. Sushil JK, Mcuie R, Duett J and Herbest JJ (1989). Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes, *Diabetes*, 38, 1539-1543.
66. Xia E, Rao G, Remmen HV, Heydari AR and Richardson A (1994). Activities of antioxidant enzymes in various tissues of male fischer 344 rats are altered by food restriction, *J. Nutr.*, 125., 195-201.
67. Flohe L and Otting F (1984). Superoxide dismutase assays, *Methods in Enzymology*, 105, 93-104.
68. Anonymous (1996). Superoxide Dismutase Kit, Randox Lab. Ltd., U.K.
69. Paglia DE and Valentine WN (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *J. Lab. Clin. Med.*, 70, 1, 158-168.
70. Flohe L and Gunzler WA (1984). Assays of glutathione peroxidase, *Methods in Enzymology*, 105, 114-115.
71. Anonymous (1997). Glutathione Peroxidase Enzim Kiti, Randox Lab. Ltd., U.K.
72. Hayran M ve Özdemir O (1996). Bilgisayar İstatistik ve Tıp, Hekimler Yayın Birliği, Medikomat, Ankara.
73. Cheng MD (2002). The ECG of hypothermia, *Journal of Emergency Medicine*, 22, 87-91.
74. Durakovic Z, Durakovic MM and Corovic N (2001). Q-T and J-T dispersion in the elderly with urban hypothermia, *International Journal of Cardiology*, 80, 2-3.
75. Dede S, Değer Y and Meral I (2002). Effect of short-term hypothermia on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in rats, *J. Vet. Med. A*, 49, 286-288.
76. L'Vova SP, Garbunova TF and Abaeva EM (1993). The effect of hypothermia and dalargin on lipid peroxidation in rat tissues, *J. Vopr. Med. Khim.*, 39, 21-24.
77. Gradinski Vrbanac B, Millinkovic-Tur S, Emanovic D, Stojevic Z and Penavic V (1993). Glutathione and lipid peroxidation in blood and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in red blood cells of chickens during hypothermia and posthypothermia, *Vet. Arhiv*, 63, 155-160.

78. Fridovich I (1995). Superoxide dismutases, *Ann. Rev. Biochem.*, 64, 97-12.
79. Horwitt MK (1965). Role of vitamin E, selenium and polyunsaturated fatty acids in clinical and experimental muscle diseases, *Fed. Proc.*, 24, 68-72.
80. Frei B (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins, mechanism of action, *Am. J. Med.*, 97, 5-12.
81. Gallo-Torres DC (1980). Absorption Blood Transport and Metabolism of Vitamin E. Ed: Maclin L, A Comprehensive Treatise, J. Marcel Dekker, New York, 170-276.
82. Kornburst DJ and Mavis RD (1980). Relative susceptibility of microsomes from lung, heart, liver, kidney, brain and testes to lipid peroxidation, correlation with vitamin E content, *Lipids*, 15, 315-320.
83. McDowell LR (1989). Vitamins in animal nutrition – comparative aspects to human nutrition, vitamin A and E, LR McDowell, Ed, *Academic*, London, 10-52, 93-131.
84. Sethi R, Takeda N, Nagano M and Dhalla NS (2000). Beneficial effects of vitamin E treatment in acute myocardial infarction, *J. Cardiovascular Pharmacol. Ther.*, 5, 51-8.
85. Chamiec T, Herbaczynska- Cedro K and Ceremuzynski L (1996). Effects of antioxidant vitamins C and E on signal-averaged electrocardiogram in acute myocardial infarction, *Am. J. Cardiol*, 77, 4, 237-41.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Elazığ'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Elazığ'da tamamladı. 1995 yılında Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesini kazandı ve 2000 yılında mezun oldu. 2001 yılında Yüzüncüyıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsüne bağlı olan Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 25 Aralık 2003 tarihinde Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalında açılan Araştırma Görevlisi sınavını kazandı. Halen Fizyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak görevini sürdürmektedir.

