

T.C.
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi

**PC12 HÜCRELERİNDE RİSPERİDON VE BALIK YAĞININ
ANTIOKSİDAN DÜZEYLERİ VE SİTOZOLE KALSİYUM AKIŞI
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. Sevil ALTINKILIÇ

PSİKİYATRİ ANABİLİM DALI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

1. DANIŞMAN

Prof. Dr. Ramazan ÖZCANKAYA

2. DANIŞMAN

Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından
1856-TU-09 Proje numarası ile desteklenmiştir.**

2010-İSPARTA

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim sürecinde bilgilerinden ve klinik tecrübelerinden faydalandığım Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Ramazan ÖZCANKAYA 'ya,

Uzmanlık tezimin hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU'na ve A.Cihangir UĞUZ'a,

Asistanlık eğitimim boyunca klinik tecrübelerinden ve bilgilerinden yararlandığım, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Doç. Dr. İbrahim EREN'e,

Her zaman yanımda olan sevgili aileme,

Sonsuz teşekkürler...

Dr. Sevil ALTINKILIÇ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
GRAFİKLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. PC12 Hücreleri.....	4
2.2. Oksidatif Stres	4
2.2.1. Serbest Radikaller	4
2.2.1.1. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri	11
2.2.2. Antioksidanlar	13
2.2.2.1. Enzimatik Antioksidanlar.....	14
2.2.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	16
2.2.2.3. Antioksidanların Etki Mekanizmaları	17
2.2.3. Fizyolojik Süreçlerde Oksidatif Stres	17
2.2.4. Patolojik Süreçlerde Oksidatif Stres	23
2.3. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali.....	25
2.3.1. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali ve Önemi	25
2.3.2. Hücre içi Ca ⁺² Sinyalinin Oluşumu	25
2.4. Antipsikotikler.....	27
2.4.1. Tipik Antipsikotikler	30
2.4.2. Atipik Antipsikotikler	30
2.4.2.1. Risperidon	31
2.4.2.1.1. Yapısı ve Etki Mekanizması	31
2.4.2.1.2. Klinik Kullanımı	31
2.5. Balık Yağı	32
2.5.1. Yapısı ve Fonksiyonları	33
2.5.2. Balık Yağının İnsan Sağlığı Açısından Önemi	34

3. MATERYAL METOD	36
3.1. Materyaller	36
3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler	36
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	37
3.2. Metot	38
3.2.1. Hücre Kültürü ve Deneysel Tedavi	38
3.2.1.1. PC12 Hücre Kültürü	38
3.2.2. Antioksidan Enzim Aktivitesinin Ölçümü	39
3.2.2.1. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) ve Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Analizleri	39
3.2.3. İntrasellüler Kalsiyumun Ölçülmesi	40
3.2.4. Lipid Peroksidasyon Analizi	41
3.3. İstatistiksel Analiz	41
4. BULGULAR	42
4.1. PC12 Hücrelerinde LP Düzeyleri	42
4.2. PC12 Hücrelerinde GSH Düzeyleri	44
4.3. PC12 Hücrelerinde GSH-Px Düzeyleri	45
4.3. PC12 hücrelerinde Sitozole Kalsiyum İyonu [Ca^{+2}] _i Salınım Düzeyleri:	48
5. TARTIŞMA	51
ÖZET	59
ABSTRACT	60
KAYNAKLAR	61

SİMGELER ve KISALTMALAR

AA	: Araşidonik asit
AC_h	: Asetilkolin
ALA	: Alfa linoleik asit
ATP	: Adenozin trifosfat
BDNF	: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
Ca⁺²	: Kalsiyum iyonu
[Ca⁺²]_i	: Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu
[Ca⁺²]	: Kalsiyum iyonu
CCl₃·	: Triklormetil
CCl₄	: Karbon tetraklorür
cGMP	: Siklik guanozinmonofosfat
Cu⁺²	: Bakır iyonu
COX	: Siklooksijenaz
D₂	: Dopamin 2
DA	: Dopamin
DAG	: Diaçilgliserol
DM	: Diabetes Mellitus
DHA	: Dokozahegzaenoik asit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DHLA	: Dihidrolipoik asit
EC-SOD	: Ekstrasellüler Süperoksit dismutaz
EPS	: Ekstrapiramidal semptom
GPKR	: G Proteini Kenetli Reseptör
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Glutasyon (indirgenmiş glutasyon)
GSSG	: Okside (yükseltgenmiş) glutasyon
EPA	: Eikosapentaenoik asit
EPUFA	: Esansiyel poliansatüre yağ asitleri (Essential Polyunsaturated fatty acids)
ER	: Endoplazmik Retikulum
H₂O₂	: Hidrojen peroksit

HNA	: 4-hidroksinoneal
HPA	: Hipotalamik pituiter adrenal
IL	: İnterlökin
IP₃	: İnozitol trifosfat
KAT	: Katalaz
LA	: α -Lipoik Asit
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
LP	: Lipid peroksidasyon
LPS	: Lipopolisakkarit
MDA	: Malondialdehit
MPP⁺	: N-metil-4-fenilpridinyum
NAD(P)H	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NF-κB	: Nüklear Faktör kappa-B
NGF	: Nöronal büyüme faktörü
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
O₂	: Moleküler oksijen
¹O₂	: Singlet oksijen
O₂⁻	: Süperoksit anyonu
·OH	: Hidroksil radikali
PANNS	: Pozitif ve Negatif Sendrom Ölçeği
PC12	: Rat feokromasitoma hücreleri
ONOO⁻·	: Peroksinitrit
PON	: Paraoksonaz
PMNL	: Polimorfonükleer lökosit
PKC	: Protein kinaz C
PLC	: Fosfolipaz C
PtdIns 4,5P₂	: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfat
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asidi
RISP	: Risperidon
ROO·	: Peroksil
ROT	: Reaktif oksijen türleri

sGC	: Solubl guanilat siklaz
SOD	: Süperoksit dismutaz
SD	: Standart sapma
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TBARS	: Tiyobarbitürik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
TBARS	: Tiyobarbitürik asit reaktif türleri
TNF-α	: Tümör nekroz faktör- α
TRX	: Tiyoredoksin
VCAM-1	: Vasküler hücre adezyon molekülü
Zn	: Çinko

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Haber-Weiss reaksiyonu ve mekanizması	8
Şekil 2. ·OH radikalının biyolojik moleküllerle reaksiyonları	8
Şekil 3. Redoks homeostazının mekanizmaları	23
Şekil 4. Redoks dengesi	24
Şekil 5. GPKR (G Proteini Kenetli Reseptör) etkili Ca^{+2} sinyali	27
Şekil 6. Dopamin yolları	28
Şekil 7. Şizofrenide Nöroanatomik Model.....	29
Şekil 8. Risperidonun yapısı	31
Şekil 9. Eikozapentaenoik asit (EPA) ve Araşidonik Asidin (AA) sentezi ve fonksiyonları	34
Şekil 10. PC12 nöronal hücrelerde oksidatif stresin (H_2O_2) neden olduğu sitozole saniyede kalsiyum iyonu [Ca^{+2}] _i salınımı üzerinde balık yağı ve risperidonun koruyucu etkilerinin alan olarak gösterilişi.....	50

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. Balık Yağı ve Risperidon'un PC12 hücrelerindeki lipid peroksidasyon (LP) düzeylerine etkileri	42
Grafik 2. Balık Yağı ve Risperidon'un PC12 hücrelerindeki indirgenmiş glutatyon üzerine etkileri.....	44
Grafik 3. Balık Yağı ve Risperidon'un PC12 hücrelerindeki glutatyon peroksidaz enzimi üzerine etkileri.....	47
Grafik 4. PC12 nöronal hücrelerde oksidatif stresin (H ₂ O ₂) neden olduğu sitozole saniyede kalsiyum iyonu [Ca ⁺²] _i salınımı üzerinde balık yağı ve risperidonun koruyucu etkileri.	49

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. ROT, simgeleri ve elektron yapıları	6
Tablo 2. Serbest radikallerin oluşumu	11
Tablo 3. GSH-Px Deneyinin analiz şeması ve kullanılan kimyasallar	40
Tablo 4. Balık yağı ve Risperidon'un oksidatif stres (H ₂ O ₂) neden olduğu lipid peroksidasyon (LP), indirgenmiş glutatyon (GSH) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) düzeyleri üzerine etkileri.....	48

1. GİRİŞ ve AMAC

Risperidon, şizofreni tedavisinde kullanılan bir atipik antipsikotiktir (1). Antipsikotik ilaçların etkilerini, dopamin hipotezine dayanarak gösterdiği bilinmektedir. Dopamin hipotezi, şizofrenide dopamin yollarında anormallik olduğunu ileri sürer (2). Şizofrenide mezokortikal yolda azalmış dopamin aktivitesi, mezolimbik yolda ise artmış dopamin aktivitesi olduğu ileri sürülmüştür. Antipsikotik ilaçlar etkilerini mezolimbik ve mezokortikal yoldaki dopamin reseptörleri üzerinden göstermektedir (3).

Antipsikotik ilaçlar tipik ve atipik antipsikotikler olmak üzere ikiye ayrılır (4). Haloperidol gibi tipik antipsikotikler yalnızca D₂ reseptör blokajı yaparak şizofreninin pozitif semptomlarında anlamlı düzelme sağlarken, apati, konfüzyon, sosyal çekilme gibi negatif semptomları ve mental fonksiyonlardaki progresif kötüleşmeyi düzeltemez. Bu durumdan hareketle 1950'li yılların sonlarında şizofreninin hem pozitif hem negatif semptomlarına etki etmeyi hedefleyen, psikotik semptomlardaki kötüleşmeyi önlediği görünen atipik antipsikotikler piyasaya sürülmüştür (5).

Dopamin hipotezi, şizofrenideki psikiyatrik semptomlar ve dopamin kinetikleri arasındaki ilişkiyi açıklarken, etiolojisini tam olarak açıklayamaz (6).

Şizofreninin etyopatogenezini anlamaya yönelik yapılan nöroanatomik çalışmalarda, artmış ventriküler volüm, küçülmüş temporal loblar, talamus ve nukleus akumbenste hücre sayısında anlamlı düzeyde azalma olduğu gösterilmiştir. Şizofreni ve alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda uzun yıllar içinde gelişen nöronal atrofi ve hücre yıkımı olduğu gösterilmiştir. Şizofrenide nöronal atrofünün apoptozis kaynaklı olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (1). Aşırı serbest radikal üretimi ya da oksidatif stresin şizofrenili hastaların patofizyolojisinde rol oynayabileceğini gösteren artan sayıda kanıt vardır (7). Nöronal hücre ölümü birçok yolla olabilir: SSS'nin normal embriyolojik gelişimi sırasında görülen apoptozis, normal yaşlanma sürecinde ve nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde de rol oynuyor gibi görünmektedir. Apoptotik hücre ölüm yolu oksidatif stresle aktive olabilir.

PC12 hücreleri, nöroblastlar ve nöronlara benzer özelliklere sahiptir. Rat feokromasitoma hücre hattı (PC12), nöronların hücresel biyolojisi ile ilgili çalışmak için iyi tanımlanmış bir modeldir. PC12 hücreleri nöronal tamir, nöroprotektivite ve nörotoksisiteyi içeren mekanizmaları araştırmak için çok yaygın kullanılır (1, 5).

H₂O₂, enzimatik oksidaz aktivitesinin doğal bir yan ürünüdür, serbest radikallerin endojen kaynağıdır ve hücresel düzeyde oksidatif strese katkıda bulunur. Kortikal nöron hücre kültüründe ve PC12 hücre düzeyinde ekzojen H₂O₂'in, endojen antioksidan savunma sisteminin koruma kapasitesinin ötesine geçerek oksidatif stresi, apoptozis ve hücre nekrozunu arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (5). Atipik antipsikotiklerden klozapin, olanzapin, ketiapin ve risperidonun PC12 hücrelerini, H₂O₂ ve MPP⁺'in indüklediği hücre ölümünden koruduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Atipik antipsikotiklerin, PC12 hücrelerini de içeren değişik hücre dizilerinde sitoprotektif etkinliği olduğu da bildirilmiştir (1, 8). Fakat hangi mekanizma üzerinden etkinlik gösterdiği bilinmemektedir.

Birçok şizofreni hastasında olanzapin, risperidon ve ketiapin gibi atipik antipsikotiklerle yapılan erken müdahalenin, hastalığın ciddiyetini azalttığı ve hastayı yatağa bağımlı hale getiren şizofreni semptomlarının gelişmesini önlediği gösterilmiştir (5, 9).

Şizofreni etyopatogenezini açıklamaya yönelik bir diğer hipotez, membran fosfolipid hipotezidir. Şizofrenik hastaların eritrosit, trombosit membranlarında özellikle dokozahegzaenoik asit (DHA) ve araşidonik asit olmak üzere poliansatüre yağ asitlerinin seviyesinde azalma olduğu gösterilmiştir (6, 10, 11, 12). Bu bulgular, şizofrenide omega-3 yağ asitlerinin olası terapötik etkilerinin araştırılmasına yönelik ilgi artışına yol açmıştır. Yapılan plasebo kontrollü, çift-kör çalışmalarda, balık yağının (omega-3 yağ asitlerinden DHA ve EPA içerir) hastaların prodromal dönemden ilk epizoda geçmelerini önlediği ve ilk psikotik atak geçiren hastalarda daha düşük dozda antipsikotik tedavisi gerektirdiği bulunmuştur (12, 13, 14). Yine şizofreni hastalarına EPA (eikozapentaenoik asit) verilerek yapılan plasebo karşılaştırmalı, randomize kontrollü çift-kör çalışmalarda, total PANNS skorlarında azalma, azalmış antipsikotik doz gereksinimi ve daha az tardif diskinezi ortaya çıktığı gösterilmiştir (6, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20).

Şizofreni büyük oranda nörogelişimsel, yapısal ve davranışsal anormalliklerle ilişkilidir ve tedaviyle ya da tedavisiz sıklıkla progressif seyreder. Etyopatogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır. Etyopatogenezinde defektif genlerden kaynaklanan nörogelişimsel anormallikler ve prenatal-neonatal enfeksiyonlar, doğum komplikasyonları, açlık, maternal malnütrisyon, ilaç-alkol kötüye kullanımı, doğum mevsimi, cinsiyet, doğum sırası, yaşam stili v.b gibi genetik olmayan faktörlerin olduğunu gösteren kanıtlar vardır. Deneysel olarak, bu genetik olmayan faktörler, hücrel metabolik strese neden olur ve sıklıkla oksidatif stresle sonuçlanır (21). Beyin, oksidatif hasara daha duyarlıdır. Çünkü yüksek oksijen basıncı ve reaktif oksijen türlerine (H_2O_2 , süperoksit radikalleri, hidroksil radikalleri) duyarlı olan proteinler, lipidler içerir ve DNA tamiri zayıftır. Beyin yüksek oksijen tüketimiyle birlikte yüksek metabolik aktiviteye sahiptir. Diğer organlara göre serbest radikal oluşturmaya eğilimlidir ve antioksidan aktivitesi daha zayıftır. Antioksidan kapasitesini aşan hücrel reaktif oksijen türleri, oksidatif stres oluşumuna katkıda bulunur. Normal koşullarda Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi çeşitli antioksidan enzimler, hücreleri oksidatif hasardan koruyabilir (9, 22).

Bu çalışmada:

1- Şizofreni fizyopatolojisinde öne sürülen oksidatif stres artışı göz önüne alınarak; PC12 hücrelerine H_2O_2 vererek oksidatif stres oluşturmak hedeflendi.

2- Bir atipik antipsikotik olan risperidonun nöroprotektif etkinliğini hangi mekanizma üzerinden gösterdiğini bulabilmek amacıyla oksidatif stres göstergeleri olan GSH, GSH peroksidaz, Lipid Peroksidasyon ve sitozole kalsiyum akışı üzerine etkilerini ölçmek planlandı.

3- Yine şizofrenide sözü geçen membran fosfolipid hipotezine göre; PC12 hücrelerine H_2O_2 vererek membran poliansatüre yağ asitlerinde hasar oluşturup, balık yağı ve risperidonun koruyucu etkinliğinin olup olmadığını görmek, hücre GSH, GSH peroksidaz, LP ve sitozole kalsiyum akışı üzerine etkileri olup olmadığını görmek planlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. PC12 Hücreleri

Rat feokromasitoma hücreleri olan PC12 hücrelerinin 1976'da NGF'e yanıt olarak katekolamin (dopamin, noradrenalin) sentezlediği ve çok hızlı nöroblast/nöron fenotipine dönüştüğü gösterilmiştir (23, 24). Bu yüzden nöronların hücre sel biyolojisi ile ilgili çalışmak için iyi tanımlanmış bir modeldir.

PC12 hücreleri, nöronal tamir, nöroprotektivite ve nörotoksisiteyi içeren mekanizmaları araştırmak için çok yaygın kullanılır (5). Aynı zamanda bu hücreler nöron ömrünü uzatma kapasitesi olan ajanları diğerlerinden ayırmak için avantaj sağlar (1).

2.2. Oksidatif Stres

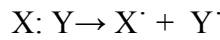
2.2.1. Serbest Radikaller

Dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla paylaşılmamış elektron taşıyan serbest radikaller, birçok fizyolojik ve patolojik süreçte üretilebilen oldukça aktif atom veya moleküllerdir. Oldukça kararsız olan bu moleküller, çevrelerindeki moleküllerle çabucak reaksiyona girme ve bu son yörünge elektronlarını paylaşma eğilimindedirler. Her tip kimyasal ve biyokimyasal tepkime her zaman atomların dış orbitallerindeki elektronlar sayesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması serbest radikallerin reaktivitesini olağanüstü arttırır, dolayısıyla serbest radikaller kimyasal aktifliği yüksek moleküllerdir (25). İnsan vücudunda bütün hücrelere hiçbir zorlukla karşılaşmadan giren ve en çok kullanılma özelliğine sahip olan O₂ yapısı gereği radikal olmaya çok uygun olduğu için serbest radikal denince aslında serbest oksijen radikalleri, daha genel bir anlatımla 'ROT' ifade edilmektedir. ROT ve serbest radikaller organizmada normal şartlar altında sürekli oluşmaktadır. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler ve biyolojik sistemlerde en sık elektron transferi ile oluşurlar. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir (26).

İnsan vücudunda serbest radikaller 3 yolla meydana gelir:

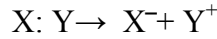
1. Kovalent bağlı normal bir molekülün her bir parçasında ortak elektronlardan birinin kalarak homolitik bölünmesi (Kovalent bağların homolitik kırılması):

Yüksek sıcaklık ve yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar, kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalır ise, her iki atom üzerinde paylaşılmamış elektron bulunur. Sonuç olarak, iki adet reaktivite düzeyi yüksek serbest radikal oluşur.



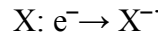
2. Normal bir molekülden bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi:

Radikal özelliği olmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşur. Askorbik asit, GSH ve tokoferoller gibi hücrel antioksidanlar radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formu oluşur.



3. Normal bir moleküle bir elektronun eklenmesi yoluyla:

Radikal özelliği olmayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna sebep olabilir. O₂'in tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksidin (O₂⁻·) oluşumuna neden olur.



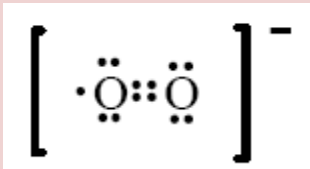
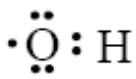

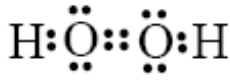
Radikal olmayan türler, bu tepkimelerden herhangi biri oluştuğunda, radikal haline gelir. Serbest radikaller ile radikal olmayanların tepkimeleri sonucu, tepkimeye giren moleküller sıra ile serbest radikallere dönüşür ve hasar zincirini ilerleterek yayarlar (27, 28).

Nitrojen molekülleri ve Oksijen (O₂) serbest radikal kaynaklarıdır. O₂'in kısmi indirgenmesinden, ROT olan hidroksil (·OH) radikali ve O₂⁻· oluşmaktadır. Ayrıca singlet oksijen (¹O₂) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) molekülleri, radikal olmayan

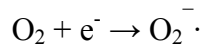
ROT olarak ifade edilirler. Oksijen kaynaklı olmayan diğer serbest radikaller ise nitrik oksit ($\text{NO}\cdot$), peroksinitrit (ONOO^-), LPO sırasında oluşan peroksil ($\text{ROO}\cdot$) ve karaciğerdeki karbon tetraklorür (CCl_4) metabolizması sırasında oluşan triklorometil ($\text{CCl}_3\cdot$) radikalidir (28, 29).

Organizmadaki serbest radikallerin en önemlisi ve büyük kısmı O_2 kaynaklı radikallerdir. O_2 'in toksik etkisi yoktur, ancak aerobik hücre metabolizması sırasında serbest oksijen radikallerine dönüşür. O_2 'in kısmi indirgenmesinden, ROT arasında yer alan $\cdot\text{OH}$ ve O_2^- oluşmaktadır. Ayrıca $^1\text{O}_2$ ve H_2O_2 molekülleri radikal olmayan reaktif oksijen türevleridir (30, 31) (Tablo 1).

Tablo 1. ROT, simgeleri ve elektron yapıları

ROT	Simgesi	Elektron Yapısı
Süperoksit radikali	O_2^-	
Hidroksil radikali	$\cdot\text{OH}$	
Singlet oksijen radikali	$^1\text{O}_2$	
Hidrojen peroksit	H_2O_2	

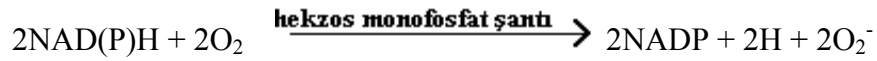
Süperoksit radikali (O_2^-), O_2 'in indirgenmesi ile oluşan ilk üründür. En önemli kaynağı, mitokondriyal elektron transport zinciridir.



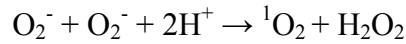
Uzun yarılanma süreli ve düşük tepkili bir radikaldir. O_2^- ; O_2 'in oksidatif fosforilasyon esnasında nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NAD(P)H)-oksidaz veya ksantin-oksidaz gibi enzimlerin katalizörlüğünde bir elektron indirgenmesi sonucunda meydana gelmektedir. O_2^- 'in yarılanma ömrü hücrelerin farklı yerlerinde bulunan süperoksit dismutaz (SOD) enziminin varlığına bağlıdır. Ayrıca, indirgeyici moleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken O_2^- oluşur.

Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler gibi yüzlerce molekül aerobik ortamda oksitlenirken $O_2^- \cdot$ yapımına neden olurlar. Başta çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında $O_2^- \cdot$ bir ürün olarak oluşabilmektedir (25, 36).

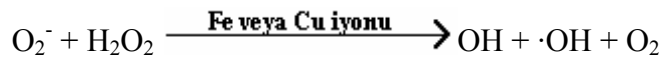
$O_2^- \cdot$ 'in dokulardaki en önemli kaynağı, polimorfonükleer lökosit (PMNL) fonksiyonları sırasında üretilendir. Daha az miktarda olmakla birlikte eozinofil ve lenfositler de antibakteriyel bir ajan olarak $O_2^- \cdot$ üretirler. PMNL'lerde $O_2^- \cdot$ üretimi membran bağlı azalmış NAD(P)H-oksidad şantı (veya heksoz monofosfat şantı) yolu ile gerçekleşir (25, 32).



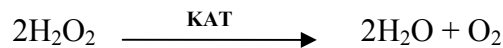
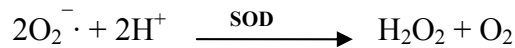
$O_2^- \cdot$, $\cdot\text{OH}$ radikalinden daha zayıf reaktif özelliği olan bir molekül olmakla birlikte biyolojik dokulara zarar verebilir. Hücre hasarına neden olarak, akuöz ortamda spontan bir biçimde H_2O_2 ve $^1\text{O}_2$ radikaline dönüşebilir. $O_2^- \cdot$ 'in, osteoklastların kemiğe yakın yüzeylerinde de bulunduğu ve kemik matriks yıkımında da görev aldığı gösterilmiştir (33, 34).



$O_2^- \cdot$, H_2O_2 radikali ile reaksiyona girerek daha etkili $\cdot\text{OH}$ radikaline de dönüşebilir. Bu reaksiyon için metal iyonlarına [demir (Fe^{+2}) ve bakır (Cu^{+2})] gereksinim vardır.

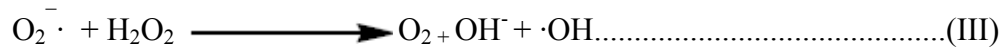
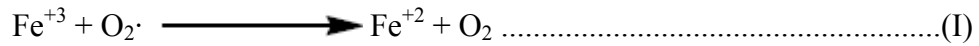


$O_2^- \cdot$ 'in dokulardan uzaklaştırılması, H_2O_2 'in spontan dismutasyonu yolu ile olur. Bu reaksiyon SOD enzimi tarafından da katalizlenir. H_2O_2 , ikinci bir enzimle [katalaz (KAT)] uzaklaştırılır (25, 32, 35).



Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$), bilinen en reaktif radikaldir. Bu radikal, DNA sarmallarında kırılmaya sebep olur, hidroksilasyon için temel oluşturur ve gen mutasyonlarına neden olarak malign transformasyonlara veya hücre ölümlerine yol açar. $\cdot\text{OH}$ aynı zamanda klasik serbest radikal reaksiyonunu (LPO) da stimüle etmek

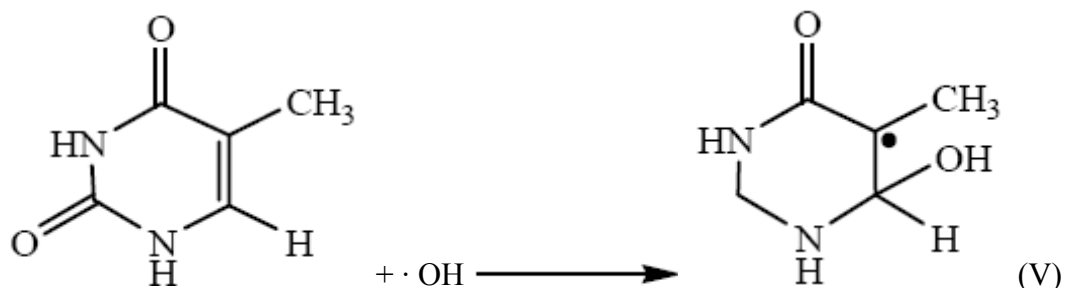
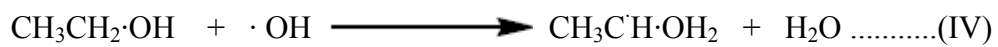
yoluyla doku yıkımında rol oynamaktadır. $\cdot\text{OH}$, membran fosfolipidlerine yakın bölgede oluşursa, lipid zincirlerini etkiler ve peroksil radikalleri, H_2O_2 ve lipid hidroperoksitleri gibi ara radikaller oluşur. Hidroksiperoksitlerin birikimi, membran fonksiyonlarını bozabilir veya hidroksiperoksitler ayrışarak sitotoksik aldehitlere dönüşebilir. $\cdot\text{OH}$, en aktif ve en toksik oksijen radikali olarak üretildiği her yerde birçok molekül ile reaksiyon verir. $\cdot\text{OH}$, iyonlaştırıcı radyasyonun (x-ışınları) etkisiyle su moleküllerinin homolitik kırılması sonucunda oluşabildiği gibi H_2O_2 molekülünün metaller ile reaksiyonu sonucunda eksik indirgenmesi ile de oluşabilmektedir. Fe^{+2} , Cu^{+2} gibi metal iyonları tarafından katalizlenen bu indirgenme reaksiyonu Haber-Weiss tepkimesi (şekil 1) olarak bilinmektedir.



Şekil 1. Haber-Weiss reaksiyonu ve mekanizması

IV ve V numaralı reaksiyonlar, III numaralı reaksiyonun ara basamaklarıdır (şekil 2) (37, 38).

Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan $\cdot\text{OH}$, su dahil ortamda rastladığı her molekül ile tepkimeye girer. Bütün bu tepkimeler, $\cdot\text{OH}$ 'in paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır (38, 39).



Şekil 2. $\cdot\text{OH}$ radikalinin biyolojik moleküllerle reaksiyonları

LPO olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonu, $\cdot\text{OH}$ radikalinin sebep olduğu en önemli hasardır. $\cdot\text{OH}$ radikalinin başlıca hedefi, hücre zarı su içermediğinden dolayı yağ asididir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozabilmekte ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilmektedir (25, 37, 38).

Singlet oksijen radikali ($^1\text{O}_2$), gerçek bir radikal değildir. Çünkü eşleşmemiş elektron taşımaz. O_2 'in yüksek enerji ile uyarılmış formu olup biyolojik sistemlerde fotosentez reaksiyonları sırasında, dış yörüngesindeki bir elektronun enerjisinin değişmesi ve stabilitenin bozulmasıyla oluşur. O_2 'in kinetik olarak uyarılan bu formu, membran lipidleri ile oldukça yüksek reaktivite gösterir ve hücre membranındaki çoklu doymamış yağ asitleriyle (PUFA) reaksiyona girmesiyle, lipid peroksitlerin oluşumuna yol açabilmektedir. $^1\text{O}_2$ 'in yarılanma ömrü 10^{-6} ile 10^{-5} saniye arasında olup karbon-karbon çift bağları ile tepkimeye girme eğilimi yüksektir fakat doku hasarındaki rolü ile ilgili net bir bilgi yoktur (25, 40).

Hidrojen peroksit radikali (H_2O_2), enzimatik olarak O_2 'in iki elektron alarak indirgenmesiyle ya da O_2^- radikallerinin enzimatik veya non-enzimatik dismutasyonu sonucu oluşur. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz, reaktif bir tür değildir. Güçsüz bir oksidan olmasına rağmen hücre membranlarından kolayca diffüze olabildiği için ve ayrıca geçiş metalleriyle Fenton reaksiyonuna girdiği için hasar oluşturmada yüksek potansiyele sahiptir. Esasen H_2O_2 'in oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin sebebi Fe^{+2} ve Cu^{+2} gibi metal iyonlarının varlığında $\cdot\text{OH}$ radikalinin öncülü olarak davranmasıdır. H_2O_2 , özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan Fe^{+2} ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif formlarını oluşturur. Bu formdaki demir molekülleri çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında LPO gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Ayrıca bu radikal birtakım intraselüler olayları da tetikler, örneğin birçok pro-enflamatuvar sitokinin transkripsiyonundan sorumlu nüklear faktör kappa-B (NF- κ B)' nin oksidasyonunda rol oynar. Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'in derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan KAT ve peroksidaz enzimleri yerine getirir (41-43).

LPO sırasında oluşan $ROO\cdot$, $NO\cdot$, $ONOO\cdot$ ve karaciğerdeki CCl_4 metabolizması sırasında oluşan $CCl_3\cdot$ oksijen kaynaklı olmayan diğer serbest radikallerdir ve oksijenli solunum metabolizması esnasında oluşan bu radikallerin yarılanma ömürleri birkaç milisaniye ile dakikalar hatta saatler arasında değişmektedir (25, 44).

Vücutta üretilen radikaller, vücut için gerekli birçok fonksiyonun gerçekleşmesinde önemli rol oynarlar, doğrudan tehlikeli ve zararlı maddeler olarak değerlendirilmemelidir. Bu moleküller O_2 'in biyokimyasal tepkimelerde kullanılabilmesi için reaktif formlara çevrilmesi zorunludur. Mitokondride aerobik solunumda kullanılan O_2 'in % 2–5'i bu tür tepkimelerde kullanılmak üzere serbest oksijen radikallerine dönüştürülür. Steroid yapıdaki çok sayıdaki bileşiğin üretimi, eikozanoidler gibi biyolojik aktif moleküllerin sentezi, ksénobiyotiklerin detoksifikasyonu, çok sayıda oksidaz ve hidroksilaz enzimlerinin etkileri ve sitotoksik etkilere sahip hücrelerin fonksiyonları için serbest radikal yapımı olmazsa olmaz bir koşuldur (25).

Serbest radikaller, normal insan fizyolojisinde endojen kaynaklı olarak indirgenme-yükseltgenme (redoks) tepkimelerinde; mitokondriyal, endoplazmik ve nükleer elektron iletim sistemlerinde (Sitokrom P–450), peroksizomlarda, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi metabolik olaylar sırasında bol miktarda üretilir. Ayrıca bu moleküller hücre içerisinde ultraviyole ışınları, x ışınları gibi radyant enerjinin emilimi, hava kirliliği, sigara dumanı, ilaç kullanımı (parasetamol, nitrofurantoin gibi), solventler gibi çevresel faktörlerin etkisiyle eksojen kaynaklı olarak da oluşabilirler (Tablo 2).

Malignite, diabetes mellitus (DM), ateroskleroz ve nörodejeneratif hastalık gibi birçok patolojik olayla ilişkili olan serbest radikallerin en zararlı biyolojik etkisi; hücre membranı yağ asitlerine ve lipoproteinlere saldırması ve LPO olarak bilinen bir reaksiyon zincirini başlatarak, membran proteinlerine hasar verip yapısal ve işlevsel bozukluklara neden olmasıdır (45).

Tablo 2. Serbest radikallerin oluşumu

Serbest Radikal	Oluşumu
Süperoksit ($O_2 \cdot^-$)	O_2 'in, enzimatik veya nonenzimatik yolla bir elektron redüksiyonu
Hidroksil radikali ($\cdot OH$)	Suyun radyolizi, H_2O_2 'in metal-katalizli parçalanması, NO ve $O_2 \cdot^-$ etkileşmesi
Alkoksil ($RO\cdot$) ve peroksil ($ROO\cdot$) radikalleri	Hidroperoksitlerin metal-katalizli parçalanması
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	O_2 'in dismutasyonu, şekerlerin oksidasyonu
Demir-oksijen kompleksi	Hemoglobin, Miyoglobin, vb.
Singlet oksijen (1O_2)	Fotosensitizasyon ile oksidasyon, $ROO\cdot$ radikalleri arasındaki biyomoleküler etkileşimler, hipoklorit ve H_2O_2 reaksiyonu
Lipid ve protein hidroperoksitler	Lipid ve proteinlerin oksidasyonu
Nitrojen dioksit (NO_2)	$ROO\cdot$ radikali ve NO reaksiyonu, hava kirliliği ve sigara
Nitrik oksit (NO)	NO sentaz, nitrozotiyol ve hava kirliliği
Tiyil radikalleri	Tiyollerden hidrojen atomu transferi
Protein radikalleri	Proteinlerden hidrojen atomu transferi

2.2.1.1. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri

Antioksidan savunma mekanizması ve serbest radikaller arasındaki denge oksidanlar lehine bozulduğunda serbest radikaller; lipid, protein, karbonhidrat ve DNA gibi biyomoleküller ile etkileşerek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olmaktadır (25, 46, 47):

1) Membran Lipidleri Üzerinde Etkileri: Serbest radikaller, hücre komponentleri ile etkileşim içine girebilmeleri için hücre membranını geçmek zorundadır. Hücre zarı, içerdiği PUFA nedeniyle oksidatif hasara oldukça duyarlıdır. Yağ asidi zincirinden, serbest radikallerin etkisi ile hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asidi zincirinin de radikal özelliği kazanmasına neden olur. LPO, PUFA'nın radikaller ile oksidasyonu sonucu başlar, zincir reaksiyonları şeklinde devam eder ve sonucunda MDA, 4-hidroksinoneal (HNA), alkoller, etan ve pentan oluşur. LPO sonucu membran bütünlüğü bozulması ile membran proteinleri, reseptörleri ve ayrıca bunlara bağlanan enzimler inaktive olurlar.

İkiden daha fazla çift bağ içeren linolenik ve araşidonik asit gibi PUFA'nın peroksidasyonu sırasında, tiyobarbütirik asitle ölçülebilen MDA oluşmaktadır. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik veya kantitatif bir belirleyicisi değildir, fakat LPO'nun derecesiyle iyi korelasyon göstermektedir. Yağ asitlerinin peroksidasyonunda oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur. Bu da iyon geçirgenliğinin, enzim aktivitesinin ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerinin değişimiyle sonuçlanır. MDA bu özelliği nedeniyle DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri üzerinde genotoksik ve karsinojen etkilidir. LPO ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür (45, 48).

2) Proteinler Üzerinde Etkileri: Serbest radikallerin etkilerine karşı proteinler, lipidlere göre daha az hassastırlar ve etkilenme dereceleri aminoasit içeriklerine bağlıdır. Serbest radikal atağı sonucu proteinlerde aminoasitlerin modifikasyonu, proteinlerin fragmentasyonu ve agregasyonu veya çapraz bağlanmaları gibi yapısal değişiklikler meydana gelmektedir. Ayrıca bu yapısal değişiklikler, proteinin proteolize daha duyarlı hale gelmesine neden olmaktadır. Serbest radikaller, membran proteinleri ile de reaksiyona girerek bu proteinlerde fragmentasyon ve çapraz bağlanmalara neden olabilirler. Böylece enzim, nörotransmitter ve reseptör proteinlerinin fonksiyonlarını bozabilir, immün sistemi uyarabilecek antijenik değişikliklere de yol açabilirler (45, 48, 49).

3) Karbonhidratlar Üzerinde Etkileri: Karbonhidratlar üzerine de ROT'nin etkileri vardır. Glukoz, mannoz ve deoksi şekerler otooksidasyona uğrayarak, O_2^- ve H_2O_2 radikallerini meydana getirirler. Monosakkaritlerin otooksidasyonu, çeşitli hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. DM ve komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, göz hastalıkları, kanser, hipertansiyon, romatoid artrit, psöriazis gibi pek çok hastalıkta ve yaşlılıkta serbest radikal üretiminin arttığı ve antioksidan mekanizmaların yetersiz olduğu gösterilmiştir (45, 50).

4) DNA Üzerinde Etkileri: DNA üzerinde serbest radikaller, nükleik asit-baz modifikasyonlarına, nokta mutasyonlara, DNA çift sarmalının açılmasına, depürinasyona, çapraz bağlanmalara neden olabilir. Bu etkilerin bir veya birden fazlasının meydana gelmesi, kromozomal mutasyonlar ve sitotoksisite ile sonuçlanır. $\cdot OH$ radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek değişikliklere yol açar; pürin ve pirimidin bazlarında mutasyonlara neden olur. 1O_2 radikalinin nükleik asitlerle tepkimeye girme yeteneği daha sınırlıdır ancak güçlü bir oksitleyici olduğundan, guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren moleküllerle daha kolay reaksiyona girer. 1O_2 'in, DNA hasarına yol açan $\cdot OH$, H_2O_2 ve O_2^- 'in geçiş metalleriyle reaksiyonu sonucu oluştuğu gösterilmiştir (25, 51-54).

2.2.2. Antioksidanlar

Nötrofil, makrofaj gibi immün sistem hücrelerinin savunma mekanizması için serbest radikal reaksiyonları gerekli olsa da serbest radikallerin fazla üretimi, doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (25). ROT'nin yarılanma ömürleri kısadır fakat başlattıkları serbest radikal zincir reaksiyonları ile doku hasarına sebep olmaktadır. Dolayısı ile serbest radikallerin tetiklediği oksidatif hasara karşı savunma mekanizmaları harekete geçer. Bunlar önleyici mekanizmalar, tamir mekanizmaları, fiziksel savunmalar ve antioksidan savunmalardır (25).

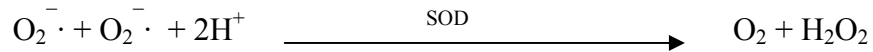
Antioksidan savunma; canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi oksitlenebilecek maddelerin oksidasyonunun önlenmesi veya geciktirilebilmesidir. Bu süreçte rol oynayan maddelere 'antioksidanlar' denir (55). Enzimatik antioksidanlar SOD, KAT ve GSH-Px enzimleridir. SOD'nin yapısında bakır, çinko ve manganez, GSH-Px'da ise selenyum iyonu bulunduğundan bu

enzimler metalloenzim olarak da adlandırılırlar (33, 37). Hücre içi ortamın aksine hücre dışı ortamda gerçekleşen enzimatik olmayan antioksidan savunmadan ise E ve C vitamini, transferrin, seruloplazmin, albumin, bilirubin, β -karoten sorumludur. SOD, GSH-Px ve KAT enzimlerinden ayrı olarak E ve C vitamini de hücre içi antioksidan özelliğe sahiptir. Her ikisi de hücre membranlarındaki LPO zincir reaksiyonlarını kıran antioksidanlardır. Hücre içi ortamın aksine hücre dışı sıvılarda enzimatik antioksidan sistemin aktivitesi sınırlıdır (37, 47, 55).

2.2.2.1. Enzimatik Antioksidanlar

Başlıca antioksidan enzimler: SOD, KAT ve GSH-Pxdır (55).

Süperoksit Dismutaz (SOD): $O_2^{\cdot -}$ radikalinin H_2O_2 ve O_2 moleküllerine dönüşümünü katalizlemektedir. Metalloprotein olan SOD, hücrelerdeki $O_2^{\cdot -}$ düzeylerini kontrol etmede rol oynar. SOD, bir $O_2^{\cdot -}$ radikalini yükseltgerken, diğer $O_2^{\cdot -}$ radikalini H_2O_2 'e indirger (56):



Memelilerde üç tip SOD izoenzimi tanımlanmıştır:

1. *Çinko-Bakır (Cu-Zn) SOD*: Genellikle lizozomda ve sitozolde lokalizedir. Bakır (Cu) ve çinko (Zn) atomları arasındaki köprü histaminle sağlanır. Cu atomları enzimatik aktiviteden sorumluyken, Zn atomları enzimin stabilitesinden sorumludur. Cu-Zn SOD'ın antioksidan savunmada ilk sırada yer aldığı düşünülmektedir (33).

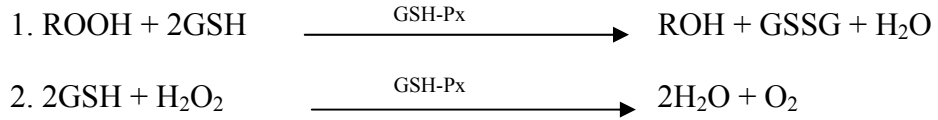
2. *Manganez (Mn) SOD*: Mn-SOD, mitokondriyal SOD olarak da ifade edilir, bakterilerden yüksek yapıli organizmalara kadar birçok kaynaktan izole edilebilmiştir (57).

3. *Ekstraselüler SOD (EC-SOD)*: EC-SOD, ekstraselüler bölümlere salgılanabilir ve hücre yüzeyindeki heparin sülfat proteoglikanlara bağlanabilir, Cu-Zn SOD gibi kofaktör olarak Zn ve Cu kullanır. EC-SOD'un $ONOO^{\cdot -}$ aktivitesini önlediği düşünülmektedir (49).

Yüksek O_2 kullanımı olan dokularda SOD aktivitesi, özellikle eritrositlerde fazladır. SOD, fagosite edilmiş bakterilerin intraselüler öldürülmesinde de rol

oyunmaktadır. Bu nedenle SOD granülosit fonksiyonu için çok önemlidir. Lenfositlerde de SOD fazla miktarda bulunmaktadır (27, 49).

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px): GSH-Px, glutasyon yolunun ilk enzimidir, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Enzim aktivitesi, pentoz fosfat yolunda üretilen NAD(P)H'a bağımlıdır (51).



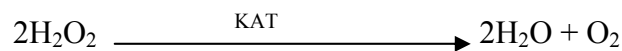
GSH-Px, üç peptidli glutasyonu kendi oksidize formuna (GSSG) oksidize ederken; sitozol ve mitokondrideki SOD tarafından üretilmiş olan H_2O_2 radikalini, yüksek spesifite göstererek ortadan kaldırabilme özelliği gösterir (52).

Selenyum bağımlı ve selenyumdan bağımsız olmak üzere farklı substratlar kullanan iki tip GSH-Px vardır. Selenyumdan bağımsız formu organik H_2O_2 moleküllerini kullanıp, yüksek bir aktivite gösterebilir. Selenyuma bağımlı olan formu ise sitoplazmada bulunur ve kapasitesi daha düşüktür (51, 53).

Fagositik hücrelerde majör peroksit uzaklaştırıcı olarak görev yapan GSH-Px diğer antioksidanlarla birlikte, oksidatif patlama sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. Endoplazmik retikulumdan salınan H_2O_2 'in dekompozisyonunun primer sorumlusu olan GSH-Px aktivitesindeki azalma, H_2O_2 'in artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açmaktadır (51).

Ayrıca GSH-Px, araşidonik asit metabolizmasının iki temeli olan lipooksijenaz ve siklooksijenaz yolların aktivasyonunu artırarak, tümör oluşumunda anahtar rol oynar (51, 52).

Katalaz (KAT): İçeriğinde Fe^{+3} bulunduran dört hem grubuna ayrılmış, glikoprotein yapısında, bir hemoproteindir. SOD'ın oluşturduğu H_2O_2 'in, peroksidazlarla beraber oksijen ve suya parçalanmasında rol alır (49, 54).



Hemen hemen tüm memeli hücrelerinde, KAT, ağırlıklı olarak eritrosit, karaciğer ve böbrekte bulunur. Kanseri dokularda, sağlıklı dokulara oranla daha

yüksek miktarda bulunan KAT, özellikle H₂O₂'in yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu durumlarda etkilidir. Eritrositler, KAT aktivitesinin %98'inden fazlasını sağlamaktadır (49).

2.2.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

1. Glutatyon (GSH): GSH, sistein içeren bir tripeptit yapısında olup in vivo sentezlenebilen ve ince bağırsaktan emilebilen endojen ve ekzojen bir antioksidandır. Peroksidazlar için substrat görevi görebilen GSH, antioksidan etkili C ve E vitaminleri üzerinde de orta düzeyde koruyucu etkiye sahiptir (55).

GSH'un yaklaşık %90'ı sitozolde, %10'u mitokondride ve çok az bir kısmı da endoplazmik retikulumda bulunur. GSH oksidasyonu, apoptozis sürecinin erken dönemdeki belirtisidir ve metabolik sinyal görevi görebilir (55, 56).

GSH, DNA sentezi ve hasarlı parçalarının onarılmasında etkindir; aminoasit transportu, peroksid metabolizması, iskelet-kas bütünlüğü ve birçok enzim aktivitesinin düzenlenmesinden sorumludur ve eksikliği hücre ölümüne yol açar (55, 57).

2. C Vitamini (Askorbik Asit):

GSH miktarı, C vitamini eksikliğinde azalır.

3. E Vitamini

4. A Vitamini

5. Karotenoidler

6. α-Lipoik Asit (LA)

7. Ubikinonlar (Redükte Koenzim Q)

8. Ürik Asit

9. Bilirubin

10. Albumin

11. Transferrin

12. Seruloplazmin

2.2.2.3. Antioksidanların Etki Mekanizmaları

Antioksidanlar; ROT ve nitrojen türlerinin temizlenmesi, oksidatif stresle hasarlanmış dokuların tamiri, diğer antioksidanların onarımı/yenilenmesi ve metal şelasyonu gibi farklı etki şekillerinden birini veya birkaçını ortaya koyarlar. İdeal bir antioksidan, bu etki şekillerinden çoğunu yerine getirebilir. Biyolojik sistemlerde oksidanların yıkımı ve oluşumu arasındaki denge, hücre ve dokunun biyolojik bütünlüğünün sürdürülmesinde önemlidir (58).

Antioksidanlar dört farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler:

1. Süpürücü etki (Temizleme Etkisi) (Scavenging): ROT'ni etkileyerek onları tutma veya daha zayıf bir moleküle çevirme işlemidir. Antioksidan enzimler bu şekilde etki gösterir.
2. Bastırıcı etki (Baskılama Etkisi) (Quencher): Vitaminler, flavonoidler ve trimetazidin, radikallere bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya onları inaktif forma dönüştüren bir etkiye sahiptir.
3. Onarıcı etki (Onarma Etkisi) (Repair): Bu grupta DNA tamir enzimleri, metiyonin sülfoksit redüktaz sayılabilir.
4. Zincir kırıcı etki (Zincir Koparma Etkisi) (Chain breaking): Serbest radikalleri kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye denir. Hemogloblin, seruloplazmin, E vitamini ve mineraller bu tip etki göstermektedir (58-60).

2.2.3. Fizyolojik Süreçlerde Oksidatif Stres

O₂, hücrenin günlük aktiviteleri için gerekli enerjiyi sağlar. Besin kaynakları, hücrenin enerji santrali olan mitokondrideki respiratuvar elektron transport zincirindeki enzimatik reaksiyon süreciyle oksidize edilirler, bir başka deyişle elektronlarını kaybederler. Bu süreçte en son elektron alıcısı O₂'dir ve bu elektron transferleri sırasında elde edilen enerji, kimyasal enerji formunda depolanır. Oksidatif fosforilasyon olarak ifade edilen bu reaksiyonlar zinciri sonucunda hücresel enerjinin kaynağı olan adenozin trifosfat (ATP) elde edilir. Bu reaksiyonların moleküler temeli, elektron alışverişidir.

Redoks (redüksiyon-oksidasyon reaksiyonu); atomların oksidasyon durumlarının değiştiği tüm kimyasal reaksiyonların genel adıdır. Redoks kelimesi, redüksiyon ve oksidasyon terimlerinden köken alır:

Redüksiyon elektronların/hidrojenin kazancını veya oksijen kaybını; molekül, atom veya iyondaki oksidasyon durumunun azalışını ifade eder.

Oksidasyon elektronların/hidrojenin kaybını veya oksijen kazancını; molekül, atom veya iyondaki oksidasyon durumunun artışını ifade eder (45).

Elektron transferi olmaksızın da çeşitli reaksiyonlarda aktif olarak bir redoks reaksiyonu gerçekleşebilir. Dolayısıyla oksidasyonu ‘oksidasyon miktarındaki artış’ ve redüksiyonu ‘oksidasyon miktarında azalma’ olarak ifade etmek mümkündür (61).

Her hücrede belli yapılar içinde elektron konsantrasyonu bulunur, sıkı şekilde denetim altında olan ve normal hücresel işlevi belirleyen bu denge haline ‘redoks durumu’ denir. Hücrenin redoks durumu, asit-baz dengesinde olduğu gibi (pH) normal şartlarda dar bir çerçeve içinde dengede tutulur. Hücre içi redoks homeostazı veya redoks tamponlaması, oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarının ürünleri arasındaki dengeye dayalıdır (61).

Hücrelerin birbirleriyle iletişim kurmasını sağlayan biyolojik mekanizma ‘sinyal iletimi’dir ve yine bu mekanizma aracılığıyla hücre dışı uyarılara cevap verirler. Sinyal iletimi, hücre dışından hücre içine bilgi taşınmasını sağlayan bir süreçtir. Hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinler ve nörotransmitterler gibi hücre dışı sinyaller, sinyal iletimini tetikler. Sinyal iletim süreçleri kas kontraksiyonu, gen ekspresyonu, hücre büyümesi ve sinir iletimi gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri başlatır (62).

Reaktif oksijen ve nitrojen ürünlerinin hücre ve doku hasarı yapıcı etkinliği ön plana çıksa da hücreler arası sinyallerin düzenlenmesi ve iletiminin birçok aşamasında fizyolojik olarak temel rol oynarlar. Hücre büyümesi ve farklılaşmasında etkin olan sinyal ileti yollarının uyarılması ve devamlılıklarının sağlanmasında rol oynayan ROT’ni hücreler, endojen olarak sentezlemektedirler (37, 64).

Hormonların, anjiyotensin II, platelet kaynaklı büyüme faktörü, IL-1 β , IL-3, TNF- α , sinir büyüme faktörü, granülosit-makrofaj koloni-stimüle eden faktör ve

fibroblast büyüme faktörü gibi sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin uyarısıyla birçok hücre tipinde düşük konsantrasyonlarda serbest radikal üretildiği belirlenmiştir. Buna göre; birçok sinyal iletim yolunun başlaması ve/veya doğru çalışmasının, bu yolların çeşitli aşamalarında ROT'nin etkinliğine dayandığı ve bu moleküllerin ikincil mesaj taşıyıcı olarak fizyolojik olarak önemli rol oynadığı düşünülmektedir.

Fizyolojik süreçlerde hücreler, redoks homeostazını sağlamaya yönelik olarak, hücre içerisinde artmış olan serbest radikal seviyelerine karşı tiyoredoksin (TRX) ve GSH sistemlerini aktive ederek oksidatif stres cevabını oluşturur. Böylece hücre ve dokuda ROT klirensi sağlanır, redoks dengesi korunur. Bu noktada oksidatif ürünlere karşı antioksidan aktivitenin dengeleyici rolü sadece moleküler reaksiyon mekanizmalarıyla sınırlı değildir. Bazı hücre sinyal ileti yollarının oksidanlara ve hücrel redoks dengesine oldukça duyarlı olması; serbest radikallerin ve antioksidanların, hücrede fonksiyon düzenleyici enzim ve proteinlere yönelik gen ekspresyonunu regüle etmelerini gerektirir. Dolayısıyla antioksidanlar hücre büyümesi, gelişimi, farklılaşması ve fonksiyonunun önemli bileşenleridir (25, 65).

Serbest radikaller ve antioksidanların fizyolojik yanıtlardaki düzenleyici rolleri, redoks homeostazını korumaya yönelik temel mekanizmalara bağlıdır ve birçok fizyolojik fonksiyon, redoks durumuna cevap veren ileti yolları aracılığıyla kontrol altında tutulur.

Redoks regülasyonu; hücreyi oksidatif strese karşı koruma ve redoks homeostazının devamlılığının sağlanmasıdır. Birçok temel fizyolojik fonksiyon, NO ve ROT üretimlerinin ve sinyal ileti yolları üzerindeki etkilerinin düzenlenmesine dayalıdır. Bu temel fizyolojik fonksiyonlar:

A. Serbest radikallerin düzenli üretimleri

1. NO'in düzenli üretimi
2. Fagositik NAD(P)H oksidaz ile ROT üretimi: Oksidatif patlama
3. Nonfagositik hücrelerde NAD(P)H oksidazlar ile ROT üretimi
4. Lenfositlerde 5-lipoksijenaz tarafından ROT üretimi
5. Siklooksijenazla ROT üretimi

B. Vasküler tonusun düzenlenmesi

C. O₂ konsantrasyonundaki değişiklikleri algılayan ROT üretimi: Ventilasyon kontrolü

D. Hücre adezyonunda redoks regülasyonu

E. İmmün cevabın redoks regülasyonu/amplifikasyonu

F. Programlı hücre ölümünde ROT'nin rolü:

1. Apoptozisin indüksiyonu ve gerçekleştirilmesi

2. NO-bağlı apoptozis

3. Tümör nekroz faktör- α (TNF- α)'nın indüklediği hücre ölümü

A. Serbest radikallerin düzenli üretimleri:

Biyolojik dokularda NO, indüklenebilir, nöronal ve endotelial olmak üzere üç izoformu bulunan spesifik nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri tarafından üretilir. Nöronal ve endotelial izoformlar daha çok intraselüler kalsiyum konsantrasyonu ile regüle edilirken, indüklenebilir izoformu ise lipopolisakkarit (LPS), sitokin ve diğer ajanların uyarısına bağlı olarak makrofajlarda ekspres edilir (66).

Enflamatuvar mekanizma olarak aşırı miktarda antimikrobiyal ve tümörisidal ROT üretimiyle karakterize olan oksidatif patlama, çevresel patojenlere karşı savunmanın ilk aşamasında anahtar rol oynar. Enflamatuvar bir ortamda, aktive olmuş nötrofil ve makrofajlar yüksek miktarlarda O₂⁻ radikali ve NAD(P)H oksidazın fagositik izoformu aracılığıyla diğer ROT'ni üretirler. NAD(P)H oksidazın fizyolojik rolü bir savunma ajanı olarak hareket etmektir. Stimüle olmuş nötrofil ve makrofajlar, NAD(P)H veya MPO'nin etkili olduğu reaksiyonlar aracılığıyla ¹O₂ radikalini üretirler (64).

Vasküler düz kas hücresi, fibroblast, kardiyak miyosit ve endotelial hücre gibi çeşitli tipteki nonfagositik hücreler, hücre içi sinyal iletim yollarını düzenlemek için NAD(P)H oksidaz aracılığıyla ROT üretirler. Nonfagositik hücreler, nötrofiller tarafından yapılan ROT üretiminin ancak 1/3'ünü üretebilirler. Nötrofil, endotelial hücre ve fibroblastlardan farklı olarak vasküler düz kas hücreleri O₂⁻ radikalini

temelde hücre içinde ürettiği için, kardiyak ve vasküler hücre fonksiyonlarında ROT çok önemli rol oynamaktadır (25, 63).

Lipoksijenazlar, PUFA moleküllerini oksidize eden dioksijenazlardır. Lenfositlerde ROT üretiminin indüklenebilir kaynaklarından biri olarak 5-lipoksijenaz enzimi tanımlanmış olsa da, redoks sinyal iletimindeki fizyolojik rolü netlik kazanmamıştır.

Siklooksijenaz (COX) enzimi prostanoid grubu enzimlerin formasyonundan sorumludur ve COX-1, COX-2 ve COX-3 olmak üzere bilinen üç izoformu vardır. TNF- α , interlökin-1 (IL-1) veya bakteriyel LPS ile stimüle edilmiş hücrelerde ROT üretiminde COX-1 enzimi rol oynamaktadır. Redoks sinyal iletiminde COX enziminin katkısıyla ilgili bulgular net değildir.

B. Vasküler tonusun düzenlenmesi:

Siklik guanozinmonofosfat (cGMP), protein kinaz yolu ve iyon kanalları gibi Vasküler tonusun sağlanmasındaki fizyolojik hedeflerin regülasyonunda esas rol oynar. cGMP oluşmasını sağlayan reaksiyonu katalizleyen, solubl guanilat siklaz (sGC)'dir. H₂O₂ ve NO radikalleri sGC aktivasyonunda etkilidir. Dolayısıyla, vasküler tonus regülasyonu ile platelet adezyonunun önlenmesinde bu radikaller anahtar rol oynar (63).

C. O₂ konsantrasyonundaki değişiklikleri algılayan ROT üretimi:

Yüksek organizmalarda O₂ homeostazı, eritrosit sayısı ile respiratuvar ventilasyon arasındaki dengeyle regüle edilir. O₂ konsantrasyonundaki değişikliklerin, birçok farklı ROT üreten protein tarafından algılandığı düşünülmektedir. Ayrıca, mitokondriyal ROT oranındaki değişimin, arteryel kan oksijenindeki değişiklikleri algılayan karotid cisimcikleri aracılığıyla, O₂ duyarlılığında rol oynayabileceği öne sürülmüştür (52).

D. Hücre adezyonunda redoks regülasyonu:

Embriyogenez, hücre büyümesi, farklılaşması, yara tamiri ve daha birçok farklı süreçte hücre adezyonu önemli rol oynar, dolayısıyla hücrelerin ve dokuların adeziv özellikleri sıkı bir redoks kontrolü altındadır. Bakteriyel LPS'e ve TNF- α , IL-1 gibi birçok sitokine cevaben hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonu uyarılır.

Lökositlerin endotelial hücrelere adezyonun ise ROT tarafından, özellikle hücre içi kaynaklı $\cdot\text{OH}$ radikalince indüklendiği gösterilmiştir (65).

E. İmmün cevabın redoks regülasyonu/amplifikasyonu:

İmmün cevap, redoks regülasyonu altındadır; T lenfosit aktivasyonu, ROT'nin etkisine veya hücre içi GSH, redoks durumundaki bir değişikliğe bağlı olarak belirgin bir biçimde artar. IL-2 üretimi gibi T-lenfosit fonksiyonları, fizyolojik olarak ilişkili düzeydeki O_2^- radikali ve H_2O_2 konsantrasyonlarından indüklenebilir. Hücre içi redoks durumunun, makrofajlardaki immünolojik fonksiyonları da etkileyebildiğine dair kanıtlar vardır. Makrofajlardaki prostaglandin ve IL (IL-6, IL-12 gibi) salımının, hücre içindeki GSH düzeyine bağlı olarak değişkenlik gösterdiği ve yardımcı T lenfositlerin oransal dengesini etkilediği bulunmuştur.

F. Programlı hücre ölümünde ROT'nin rolü:

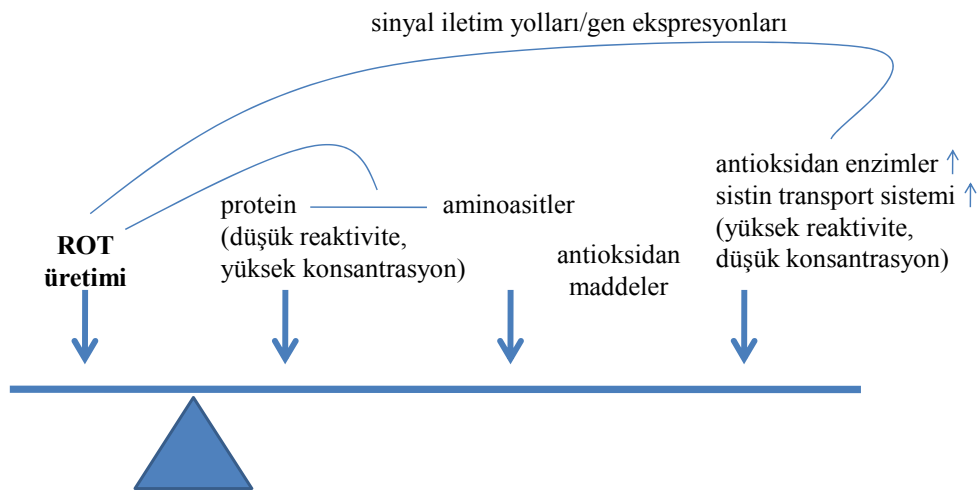
Normal büyüme-gelişme sürecinde ve organizma bütünlüğüne yönelik tehdit içeren hücrelerin yok edilmesi için programlı hücre ölümü (apoptozis) gereklidir. Bir hücrenin intihar etme kararı; devamlılık için gerekli pozitif sinyallerin (örneğin nöronlar için büyüme faktörleri gibi) geri çekilmesiyle, negatif sinyallerin (hücre içinde oksidan seviyelerinin artması, oksidatif DNA hasarı, radyasyon ve/veya kemoterapilerin zararlı etkileri gibi) alınması arasındaki dengeye dayalıdır. Mitokondriyal yolla yani hücre içerisinden tetiklenen apoptoziste, tetikleyici nedenlerden biri ROT olabilir.

NO aktivitesine bağımlı apoptozis, birçok deneysel modelde ve belli klinik patolojilerde gösterilmiştir. Ancak, hücre içi GSH düzeyleri daha yüksek olan bazı tip hücrelerde özellikle NO etkinliğine bağlı ilerleyen apoptozise olan direncin daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Lökosit ve fibroblastlarda $\text{TNF-}\alpha$ membran-bağılı NAD(P)H oksidazların aktivasyonu ile O_2^- radikalinin salınımını indükler. Bu süreç, ROT üreten hücrenin durumuna göre proliferasyonu veya hücre ölümünü tetikler (65, 67).

2.2.4. Patolojik Süreçlerde Oksidatif Stres

Geçici olarak artmış serbest radikal konsantrasyonlarına maruz kalan canlı hücre ve dokular, redoks dengesini yeniden oluşturmaya yönelik birçok mekanizmayı çalıştırır. ROT üretim düzeyleri ile antioksidan savunma kapasitesi sabit ve dengedeysse, hücre ve dokular stabil durumdadır (68) (Şekil 3). ROT seviyelerinin stabiliteledeki devamlılık, ROT üretim düzeyleri ile temizleyici/süpürücü mekanizmaların etkisi arasındaki dengeye dayalıdır.

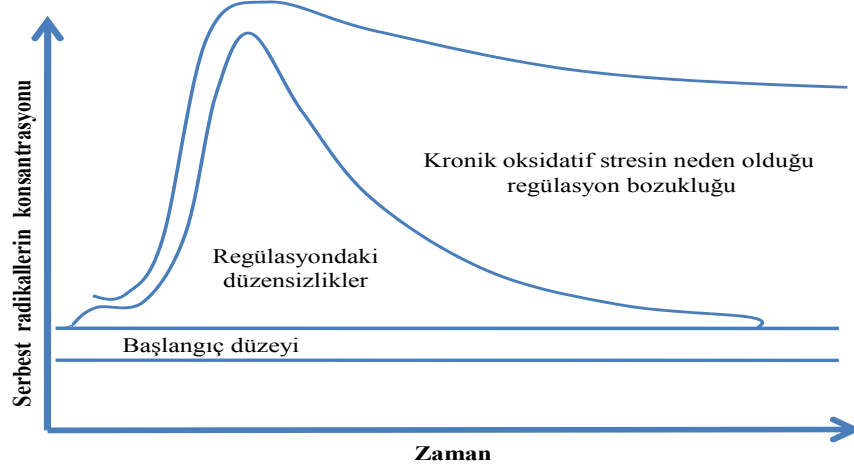


Şekil 3. Redoks homeostazının mekanizmaları

GSH-Px, SOD ve KAT gibi belli antioksidan enzimler etkili ROT temizleyicileridir, ancak hücrelerde sadece göreceli olarak düşük konsantrasyonlarda bulunurlar. Aynı durum, enzimatik olmayan antioksidanlar için de geçerlidir. Aminoasitler ve proteinler de ROT temizleyicisidir. Aminoasitler molarite bazında klasik antioksidanlardan daha az etkin olsalar da, hücre içi konsantrasyonları yüksektir (25).

Redoks sinyal iletiminin çalışması; ROT konsantrasyonlarında artış ya da bir veya daha fazla antioksidan sisteminin aktivitesinde azalmaya bağlı dengenin bozulmasını gerektirir. Yüksek organizmalarda bu tip oksidatif bir olay, endojen serbest radikal üretimi yapan sistemlerin kontrollü aktivasyonu ile düzenlenebilir. Diğer taraftan, çevresel faktörlerin oluşturduğu oksidatif stres şartları da benzer cevapların oluşmasını sağlayabilir. Eğer ROT düzeylerindeki ilk artış göreceli olarak düşükse, ROT artışını dengelemek için antioksidan cevap yeterli olacaktır.

Dolayısıyla, redoks regülasyonunun fizyolojik belirtileri, hücre içinde oksidatif duruma doğru geçici bir artış ve değişiklik şeklindedir (Şekil 4). Uzun dönemde, bu mekanizmalar redoks homeostazı olarak adlandırılan stabil bir durum kazanmaya eğilim gösterir.



Şekil 4. Redoks dengesi

ROT üretimi belli şartlar altında çok daha güçlüdür, antioksidan cevap ise redoks dengesinin yeniden oluşturulmasını sağlayamayabilir. Bu tip durumlarda sistem şekil 4'teki modele göre bir yarı-denge durumunu yakalayabilir, ancak bu durum daha yüksek ROT konsantrasyonları, farklı düzeylerde serbest aminoasitler ve/veya redoksa duyarlı sinyal ileti yollarına bağlı farklı gen ekspresyon tipleriyle ilişkilidir. Yaşlanma süreci, bu tip bir yarı denge süreci için iyi bir örnektir. Dolayısıyla, oksidatif yöndeki her öncül değişim, kesin bir patolojik süreç ve durumla ilişkilendirilemeyebilir (69).

Çok şiddetli ve yüksek ROT üretim düzeyleri söz konusu olduğunda patolojik durumlar ortaya çıkabilir. Bu durumların gelişimi, bir homeostaz kaybından çok homeostaz seviyesinde kronik bir değişiklik ile ilgilidir. Buna göre, patolojik durumlar hem ROT üretiminin hasar verici etkilerinden hem de ROT'nin yönlendirdiği gen ekspresyonundaki değişikliklerden kaynaklanabilir. Oksidatif stresin birçok klinik durumda rol oynadığına dair bulgular gittikçe artmaktadır.

2.3. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali

2.3.1. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali ve Önemi

Hücrelerin işlevleri hücrel iyon değişimleri ile tetiklenmektedir (70). Ca^{+2} , hem hücre içi süreçlerde hem de hücreler arası etkileşimde önemli görevlere sahiptir. Canlılarda gerçekleşen pek çok önemli olayda kalsiyum iyonları (Ca^{+2}) belirleyici rol oynamaktadır. Bu olaylar arasında hareket, kalp atışı, beynin bilgiyi işleyip hafızayı oluşturması, yumurtanın döllenme sonucu aktivasyonu, pankreatik hücrelerde salgılama, yaraların iyileşmesi, sillerin hareket frekansının koordinasyonu, karaciğer hücrelerinin davranışlarının düzenlenmesi ve apoptozis sayılabilir. Bu işlevlerde en önemli tetikleyici temel iyon, sekonder haberci olarak bilinen, Ca^{+2} iyonudur (70). Ca^{+2} , hem hücre içi süreçlerde hem de hücreler arası etkileşimde önemli görevlere sahiptir.

Hücre içi Ca^{+2} sinyali, hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun ($[Ca^{+2}]_i$) geçici bir şekilde artışından oluşur.

2.3.2. Hücre içi Ca^{+2} Sinyalinin Oluşumu

Endotel kaynaklı maddelerin sentezi veya salınımında Ca^{+2} iyonunun gerekliliği indirekt araştırma yöntemleri ile belirlenmesine karşın, moleküler işlergeler mikrospektrofluorometrik, elektrofizyolojik ve moleküler araştırma tekniklerin geliştirilmesi ile kısmen de olsa aydınlığa kavuşturulmuştur. Son yıllarda geliştirilen patch-clamp ve mikrospektrofluorometrik araştırma teknikleri ile beraber floresan ışığına duyarlı çeşitli boyalar hücre içerisindeki iyonik akımları ve hücre içi serbest iyon seviyelerinin ölçülmesini mümkün hale getirmiştir (70).

$[Ca^{+2}]_i$, hem hücre dışı ortama hem de hücre içinde Ca^{+2} depolayan yapılara göre çok düşük seviyededir. Bu nedenle Ca^{+2} hücre içinde sinyal molekülü görevi yapabilir. Öyle ki hücre dışındaki $[Ca^{+2}]_o$ 'u yaklaşık olarak $10^{-3}M$, Ca^{+2} depolarında, örneğin endoplazmik retikulumda (ER) $5 \times 10^{-4}M$ civarlarında iken, $[Ca^{+2}]_i$ bu değerlerden binlerce kez daha düşük olan 10^{-7} seviyelerindedir. Bu yüzden, hem hücre içi ile dışı arasında, hem de ER ile sitoplazma arasında, çok yüksek bir Ca^{+2} derişim farkı vardır. Bu fark, Ca^{+2} için çok büyük bir sürdürücü kuvvet oluşmasına

sebepler olur. Hem hücre zarı, hem de ER zarından Ca^{+2} geçişi, bu sürdürücü kuvvetin etkisi ile protein yapıdaki kanallardan olur. Bu kanallar, çoğunlukla kapalı durumda olup; voltaj, mekanik uyarı ya da ligand bağlanması ile aktive olur ve Ca^{+2} geçirgenliğini sağlarlar (71).

Hücrenin işlevini etkileyen hücre içi serbest Ca^{+2} iyon artışı iki yolla oluşmaktadır:(72)

1-Hücre dışından hücre içine kalsiyum girişi,

2- Hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyumun salınması,

1-Hücre dışından sitoplazmaya Ca^{+2} girişini sağlayan kanal tipleri şunlardır:

1- Voltaj Bağımlı Ca^{+2} kanalları: Membran depolarizasyonu sonucu aktive olur. Bu aktivasyon, kanalları Ca^{+2} 'a geçirgen hale getirir. Bu sayede hücre zarındaki elektriksel olaylar, hücre içindeki fizyolojik olaylarla çiftlenir (73).

2- Ligand Bağımlı Ca^{+2} kanalları: Hücre dışından gelen ligandların bağlanması ile aktive olur ve Ca^{+2} 'a geçirgen hale gelirler. Bu kanallar aynı zamanda birer reseptör görevi görürler. Bu kanallara nikotinik Asetilkolin (ACh) reseptörleri örnek verilebilir (74).

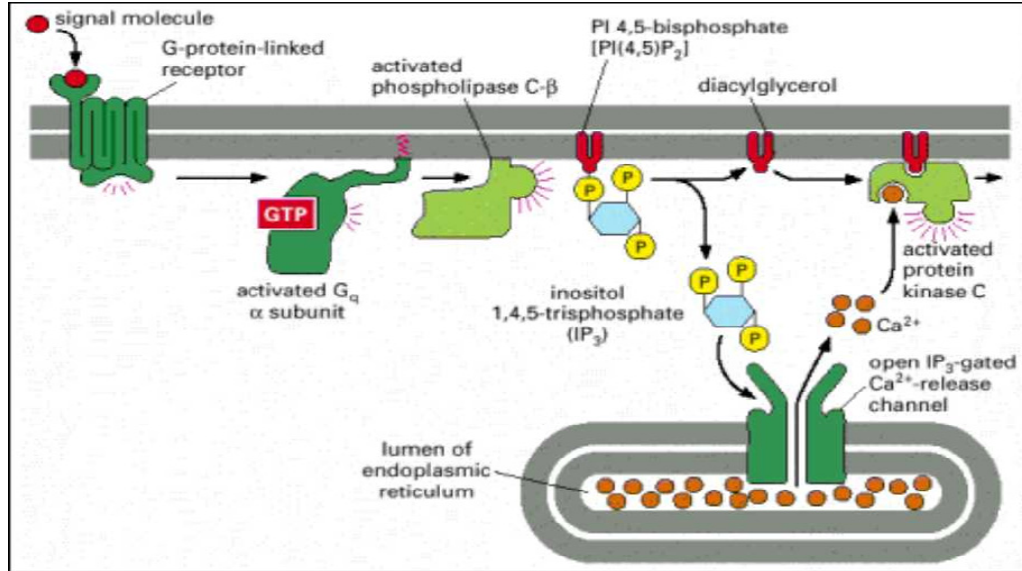
3- Kalsiyumun sızarak hücreye girdiği kanallar: Bu kanalların aktivasyon mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, hücre içi Ca^{+2} depoları, Ca^{+2} sinyali sonucu, ya da daha farklı şekillerde boşaldığı zaman, bu kanallar hücre dışından sitoplazmaya Ca^{+2} girişine sebep olurlar.

4- Na -Ca exchange (değiş-tokuş)

2- Hücre içi Ca^{+2} depolarından Ca^{+2} çıkışını sağlayan yapılar ise şunlardır:

Kalsiyumun hücre içi depolardan salınmasında kalsiyum ve inositol trifosfat (IP3) ile uyarılan işlergeler rol almaktadır. Hücre membranında bulunan reseptörlere agonistlerin bağlanması ile aktive olan G proteininin uyardığı fosfolipaz C (PLC), membran fosfolipidlerinde IP3 ve diaçilgliserol sentezine yol açmaktadır. Fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (PtdIns 4, 5P2) ve diaçilgliserol (DAG), protein kinaz C (PKC) yi aktive ederek bir seri fosforilasyon ve bunu izleyen aktivasyon veya inaktivasyona neden olurken; IP3 hücre içi depolardan heparinle bloke edilebilen

Ca^{+2} salınımını sağlamaktadır. Hücre içi serbest Ca^{+2} artışının tetiklediği kalsiyum salınımı, pozitif geri-besleme mekanizması olarak iş görmektedir. Bu işlergeler şekil 5 de gösterilmektedir.



Şekil 5. GPKR (G Proteinli Kenetli Reseptör) etkili Ca^{+2} sinyali (71)

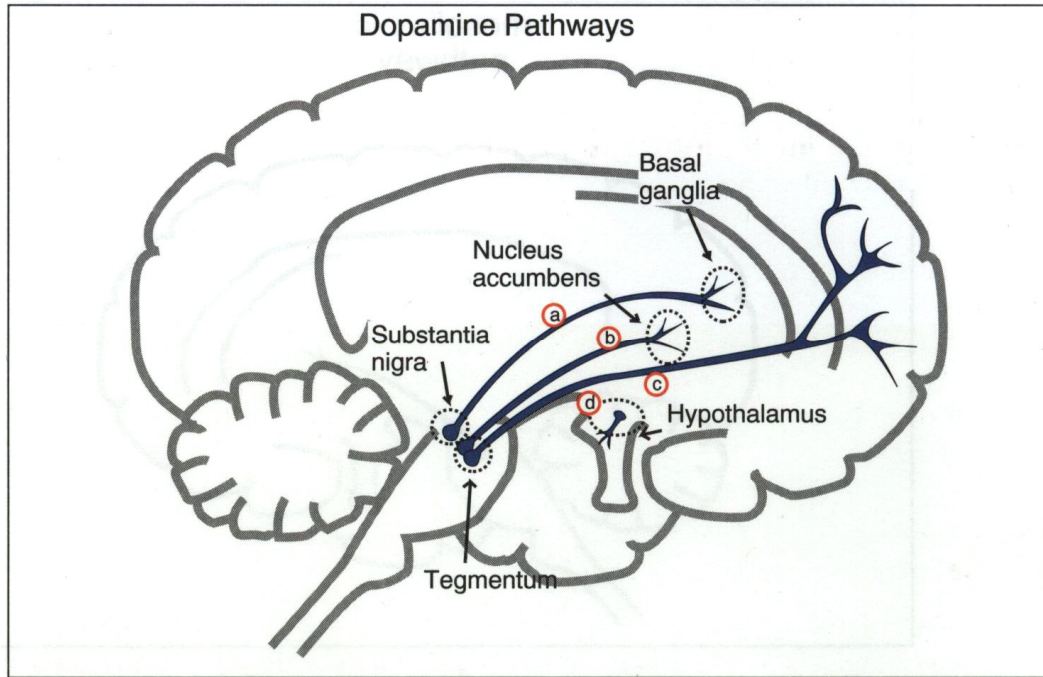
3- Hücre içi depolara Ca^{+2} un alınması başka bir deyişle sitozolden Ca^{+2} un uzaklaştırılması üç yolla gerçekleşir:

1. Endoplazmik retikulum (ER) membranındaki Ca-ATPaz enzim aktivitesinin artmasıyla ER'a Ca^{+2} alımının artması.
2. Hücre membranındaki Ca-ATPaz yardımıyla hücre dışına Ca^{+2} atılması.
3. Diğer ikisine oranla daha az olmak üzere Na – Ca “exchange” (değiş-tokuş) yardımıyla olmaktadır. Dinlenim durumunda hücre dışı kalsiyum iyon yoğunluğu, hücre içine oranla 10.000- 20.000 kat daha yüksektir (72, 103).

2.4. Antipsikotikler

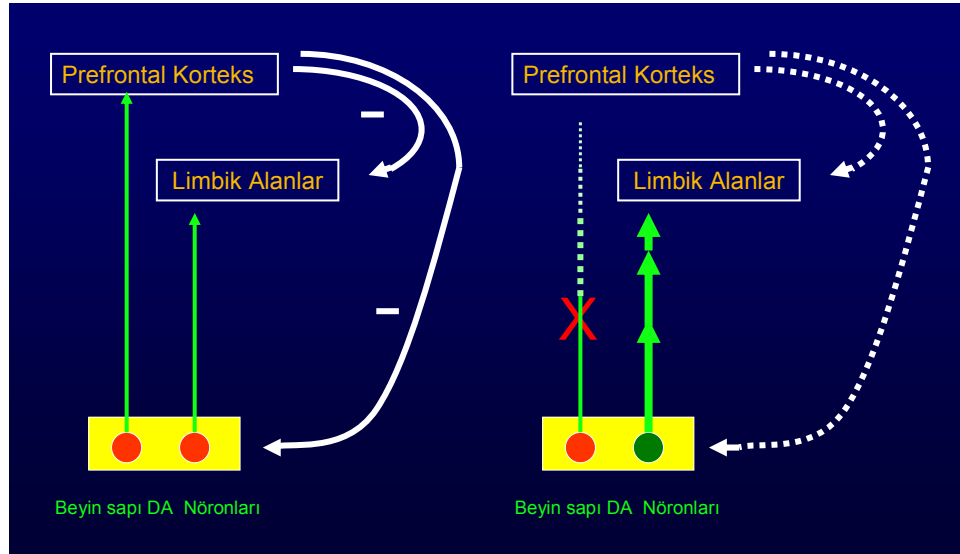
Antipsikotik ilaçların etkilerini, dopamin hipotezine dayanarak gösterdiği bilinmektedir. Dopamin hipotezi, şizofrenide dopamin yollarında anormallik olduğunu ileri sürer (9). Dopaminerjik nöroanatomi dört nöronal yoldan

oluşmaktadır. Bunlar: mezolimbik, mezokortikal, nigrostriatal ve tuberoinfundibuler yolaklar şeklindedir (Şekil 6).



Şekil 6. Dopamin yolları (a: nigrostriatal yolak, b: mezolimbik yolak, c: mezokortikal yolak, d: tüberoinfundibuler yolak) (102)

Normalde mezokortikal yolak, mezolimbik yolağı baskılar. Şizofrenide prefrontal dopaminerjik nöron aktivitesi azaldığı için, prefrontal alanın limbik sistem üzerindeki baskılayıcı etkisi azalır ve limbik dopamin sistem aktivitesi artar. Şizofrenide prefrontal dopamin sisteminde aktivite azalması negatif semptom (aloji, avolasyon, affekte düzleşme, sosyal içe çekilme) ve kognitif bozukluklara katkıda bulunurken, limbik dopamin sistemindeki aktivite artışı pozitif semptomlarda (halüsinasyonlar, hezeyanlar, dezorganize davranış, dezorganize konuşma) artmaya neden olur (Şekil 7).



Şekil 7. Şizofrenide Nöroanatomik Model (soldaki normal, sağdaki şekil şizofreni modeli)

Dopamin hipotezine dayanarak şizofreni tedavisinde D_2 reseptör antagonizması yaparak etki gösteren antipsikotikler geliştirilmiştir.

Şizofreninin patofizyolojisi ile ilgili geniş kabul görmüş olan dopamin hipotezi iki temel bulguya dayanır: İlki, hemen hemen tüm klinik yarara sahip olan antipsikotiklerin dopamin reseptör antagonisti olmalarıdır. İkinci bulgu ise dekstroamfetamin gibi dopamin salınımını artıran dopamin agonistlerinin, paranoid şizofrenide görülene benzer pozitif psikotik belirtilere (varsanı, sanrı ve düşünce bozuklukları) yol açmasıdır (1). Dopamin hipotezi, şizofrenideki psikiyatrik semptomlar ve dopamin kinetikleri arasındaki ilişkiyi açıklarken, etiyolojisini tam olarak açıklayamaz (22).

Nigrostriatal yolaktaki dopamin reseptör blokajı, ekstrapiramidal yan etkilerden ve tuberoinfundibuler sistemdeki dopamin reseptör blokajı prolaktin salınımındaki artıştan kaynaklanan hormonal yan etkilerden sorumlu tutulmaktadır (5).

Şizofreni ve diğer psikotik bozuklukların tedavisinde kullanılan antipsikotik ilaçlar eski nesil ve yeni nesil antipsikotikler olarak iki başlık altında ele alınabilirler. Eski nesil antipsikotikler için tipik, klasik, konvansiyonel ve dopamin reseptör antagonisti; yeni nesil antipsikotikler için ise atipik, ikinci nesil ve serotonin-dopamin reseptör antagonisti terimleri de yaygın olarak kullanılır (4).

2.4.1. Tipik Antipsikotikler

Tipik antipsikotiklerin etki mekanizmaları esas olarak mezolimbik sistemdeki D₂ reseptörlerinin bloke edilmesi ve depolarizasyon inaktivasyonuna bağlı olarak ventral tegmental dopamin nöronlarında ateşleme hızında bir azalma olmasıyla ilişkilidir. Bu ilaçlar, negatif belirtilerden çok pozitif belirtiler üzerinde etkilidirler. Şizofreni sağaltımında bu ilaçların birbirine üstünlüğünü ortaya koyan kesin kanıtlar yoktur (4). Klasik (tipik) antipsikotikler arasında klorpromazin, tiyridazin, trifluoperazin, flufenazin, perfenazin, zuklopentiksol, flupentiksol, haloperidol ve pimozid yer almaktadır (75).

Tipik antipsikotiklerle daha fazla yan etki ve tardif diskinezi olduğu bildirilmektedir.

2.4.2. Atipik Antipsikotikler

Klozapinin 1958 yılında bulunup, klinik çalışmalardan sonra 1972 yılında kullanımının bazı Avrupa ülkelerinde onaylanmasından sonra atipik antipsikotik kavramı gelişmeye başlamıştır (76).

Atipik antipsikotikler arasında klozapin, amisülpirid, risperidon, ketiapin, olanzapin, ziprasidon, sertindol ve aripiprazol yer almaktadır (75).

Bir antipsikotik ilacın atipik olarak değerlendirilmesi için geliştirilen ölçütler şöyle sıralanabilir:

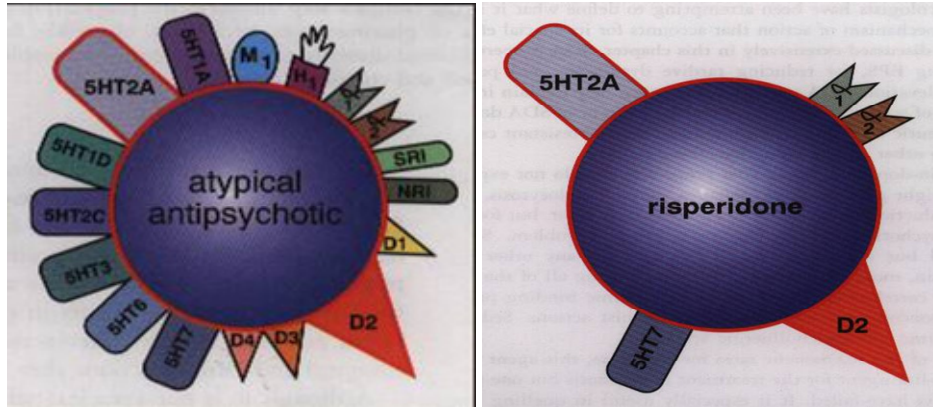
- 1- Nigrostriatal nöronlardan çok mezolimbik nöronlar üzerinde etkilidir.
- 2- 5-HT_{2A} reseptörlerine affinitesi D₂ reseptörlerine olan affinitesinden daha yüksektir.
- 3- Prolaktin düzeylerinde uzun süreli artış yapmaz, hayvanlarda düşük oranlarda katalepsi oluşturur ve insanlarda EPS oluşturma potansiyeli düşüktür (4).

2.4.2.1. Risperidon

2.4.2.1.1. Yapısı ve Etki Mekanizması

Bir benzizoksazol türevidir. $5HT_{2A}$, $5HT_7$, D_2 , α_1 ve α_2 adrenerjik reseptör antagonizması yapar. $5HT_{2A}$ antagonistik etkisi çok güçlüdür, bu etki D_2 antagonistik etkisinden 25 kat fazladır (4).

Kolinerjik reseptörlere bağlanmaz. Haloperidolün etkisine eş değer düzeyde prolaktin düzeylerinde doz-ilişkili artışlar yapar. Serotonin/dopamin blokajı oranına dayanan hayvan testlerinde, risperidon düşük dozlarda atipik bir antipsikotik ilaç olarak sınıflandırılırken; EP sistem yan etkileri çıkartacak kadar yüksek dozlarda ise tipik bir antipsikotik olarak sınıflandırılır (77). (şekil 8)



Şekil 8. Risperidonun yapısı (102)

2.4.2.1.2. Klinik Kullanımı

Risperidon, hem pozitif, hem negatif belirtiler üzerinde etkilidir. Şizofreni ve şizoaffektif bozukluğun akut alevlenmesinde ve sürdürüm sağaltımında etkilidir. Bunun yanında relapsı önlemede de haloperidolden daha etkili bulunmuştur. Bipolar bozukluğun manik atağında kullanımı onaylanmıştır ayrıca koruyucu sağaltımda da etkinliğini gösteren çalışmalar vardır. Çocuklarda görülen davranım bozukluklarında, dürtü denetim bozukluklarında, saldırgan davranışlar üzerinde, demanslı hastalarda gözlenen davranım bozukluklarında, psikotik özellikli majör depresyonda ve obsesif-kompulsif bozuklukta etkili olduğu klinik çalışmalarla gösterilmiştir. Günlük önerilen kullanım dozu 2-6 mg'dır. 1, 2, 3, 4 mg'lık tablet ve solüsyon formları

bulunur. Yeni nesil antipsikotikler içinde depo formu bulunan tek ajandır. 25, 37,5 ve 50 mg'lık ampulleri vardır, 15 günde bir uygulanması önerilir (4).

2.5. Balık Yağı

Günümüzde, özellikle gelişmiş ülkelerde insanlar, beslenmelerine çok dikkat etmekte ve beslenme rejimlerinde sağlık açısından uygun gıdaları seçmeye özen göstermektedirler. Bu gıdalar içerisinde de ilk sırayı çoklu doymamış yağ asitleri yönünden zengin olan balık ve diğer su ürünleri almaktadır (78).

Yağlar, insan organizması için gerekli olan en önemli unsurlardan bir tanesidir. Bunlar sadece yüksek enerji kaynağı olmayıp aynı zamanda yağda çözünen vitaminleri bulundurmaları, proteinlerle birleşerek lipoproteinleri oluşturmaları ve kan lipid düzeylerinde rol oynamaları bakımından oldukça önemlidirler (78).

Plazma lipidleri ya diyetle dışarıdan alınır ya da karaciğerde endojen olarak yapılır. Diyetteki yağların % 90'ından fazlasını trigliseridler (3 yağ asidi+1 gliserol) geri kalanını ise kolesterol, kolesterol esterleri, esterleşmemiş yağ asitleri (serbest yağ asitleri), fosfolipidler ve sfingolipidler oluştururlar (79).

Yağ asitlerinden karbon zincirleri çifte bağ içermeyenlere doymuş yağ asitleri, çifte bağ içerenlere doymamış (ansatüre) yağ asitleri denir. Doymamış yağ asitleri ise tekli doymamış (monoansatüre, tek çifte bağlı) ve çoklu doymamış (poliansatüre) yağ asitleri olarak ikiye ayrılır (79).

Oda sıcaklığında doymuş yağ asitleri katı halde bulunurlar ve vücutta birikebilirler. Çoklu doymamış yağ asitleri ise oda sıcaklığında sıvı halde bulunurlar ve insan hayatının devamlılığı için de çok önemlidirler. Temel yağ asitleri olarak adlandırılarak, omega (ω)-6, omega (ω)-3 yağ asitleri olmak üzere iki gruba ayrılırlar. ω -6'ların esas kaynağı yüksek miktarda linoleik asit içeren mısır ve soya fasulyesi yağıdır. ω -3 ise keten tohumu, ceviz ve özellikle planktonlar ile yağlı balıklarda bol miktarda bulunur, keten tohumu ve cevizde alfa-linolenik asit, balık yağlarında ise eikozapentaenoik asit (EPA) ve dokozaheptaenoik asit (DHA) en önemli yağ asitleridir (80).

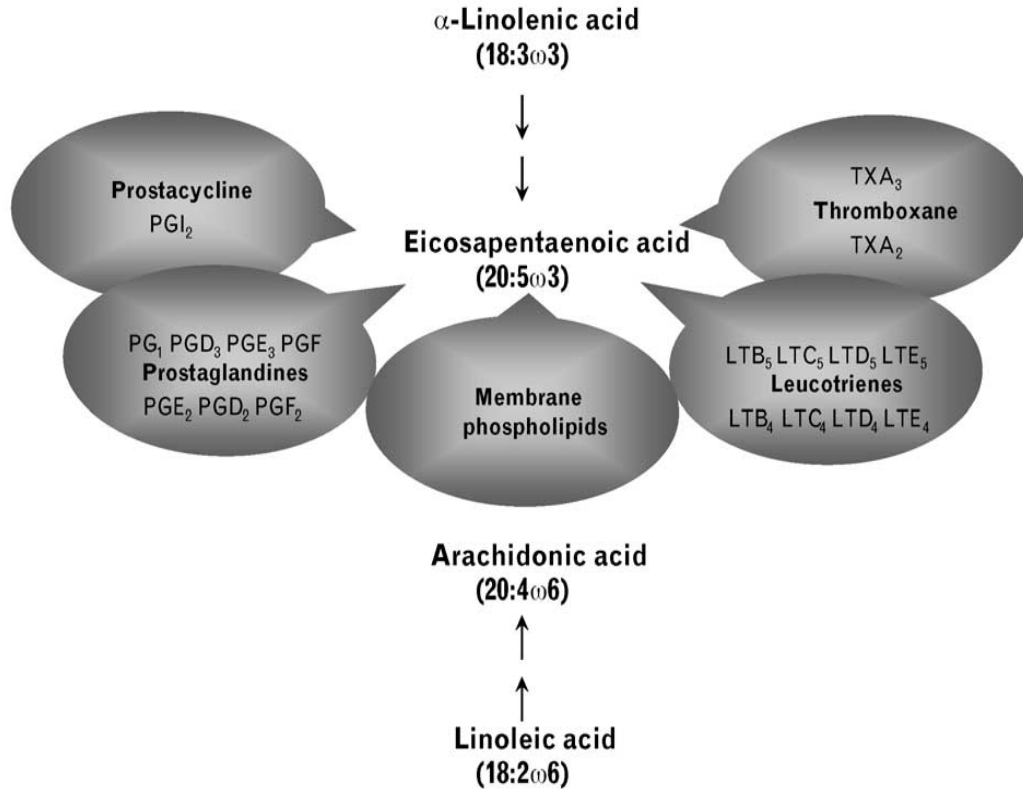
2.5.1. Yapısı ve Fonksiyonları

Balık yağı, yapısında eikozapentaenoik asit (EPA) ve dokozahegzaenoik asit (DHA) içeren önemli çoklu doymamış yağ asitlerindedir (79). EPA ve DHA mutlaka dışarıdan alınmalıdır. Vücutta sentezlenemedikleri için esansiyel yağ asitleri olarak adlandırılırlar (80). Bu bileşiklerin çok önemli görevleri vardır; hücre zarının fosfolipid yapısında bulunurlar, hücre sinyal sistemini modifiye ederler, gen ekspresyonunda ve biyosentetik fonksiyonların oluşumunu kolaylaştırırlar ve eikozanoidlerin oluşumunu sağlarlar (79).

Poliansatüre yağ asitleri olan omega-6 ve omega-3 yağ asitlerinin membran yapısının oluşumunda çok önemli görevleri vardır. Membranların aşırı yıkımında ya da diyetle aşırı alındıklarında kanda ve dokularda birçok omega-3 ve omega-6 kaynaklı metabolitlerin düzeyi artar (79).

Omega-6 yağ asitleri metabolitleri enflamatuar, hiperaljezik, trombotik ve mitojenik özelliklere sahiptir. Aslında vücudun bu özelliklere ihtiyacı vardır. Fakat bunların aşırı etkileri de dizginlenmelidir. İşte omega-3 yağ asitleri antiinflamatuvar, analjezik, antitrombotik ve antimitojenik özellikleri ile omega-6 metabolitlerinin etkilerini dizginlerler (79).

Çeşitli enzimatik zincir reaksiyonlarından sonra, EPA, ALA'dan üretilir. Ve son olarak EPA'dan DHA üretilir. Fakat ALA'nın ancak %5'i bu metabolik yola girebilir. Diğer taraftan doku EPA seviyeleri diyetle ALA alındığı zaman artar fakat DHA seviyeleri değişmez. Bu yüzden beyin hücre membranlarının fosfolipid yapısında yer alan DHA, nöronal fonksiyonun devam edebilmesi için esansiyeldir ve balık ürünleriyle telafi edilmesi önerilmektedir. AA ve DHA retinada bol miktarda bulunur. Beyin için ve davranışsal gelişim için kritik öneme sahiptir. DHA formu serebral korteks yağ içeriğinin %15-20 sini oluşturur. Nöronal doku ve retinal koni hücrelerine özel fonksiyonlar sağlar (81).



Şekil 9. Eikosapentaenoik asit (EPA) ve Araşidonic Asidin (AA) sentezi ve fonksiyonları

2.5.2. Balık Yağının İnsan Sağlığı Açısından Önemi

Yapılan araştırmalar, insanların karşılaştıkları birçok hastalığa besin maddelerinin ve beslenme alışkanlıklarının neden olduğunu ortaya koymaktadır. Bundan dolayı insanlar beslenmelerine dikkat etmek zorundadırlar. Yüksek kolesterolden ileri gelen hastalıkların, önemli oranda kırmızı etten kaynaklandığı artık bütün insanlar tarafından bilinmektedir. Bunun için daha sağlıklı olan doymamış yağ asitleri yönünden zengin olan gıdalar tüketilmesi tavsiye edilmektedir (78).

Tüketim gıdalarındaki yağların, doymamış yağlardan zengin olması çok önemlidir. Çünkü ω -3 yağ asitlerinin vücutta, biyokimyasal ve fizyolojik aktivitelerde önemli görevleri olduğu artık kesin olarak bilinmektedir. Yağ asitleri, insan vücudunda göz, beyin, testis ve plasentada toplanır. Gözlerin uygun çalışmasına ve beynin fonksiyonlarını eksiksiz olarak yerine getirmesine yardımcı olur. Kandaki yağ konsantrasyonunu düzenler (82).

Balık yağında bulunan dokozahegzaenoik asit (DHA) TNF, IL-6, IL1(b) gibi sitokinlerle, lökotrien B4, prostaglandin E2 ve tromboksan A2 gibi eikozanoidleri inhibe ederek sistemik enflamasyonu baskılar. Bu etkileri ile birçok hastalığın korunma tedavisinde önemli rolleri vardır (79). (bakınız şekil 9).

EPA ve DHA'nın faydaları üzerine yapılan çalışmalarda, kalp krizi, kalp damar hastalıkları, depresyon, migren tipi baş ağrıları, eklem romatizmaları, diabetes mellitus, hiperkolesterolemi, hipertansiyon, bazı alerji türleri ile kanser gibi birçok hastalıktan korunmada önemli etkisi olduğu bulunmuştur (83).

Bir omega-3 yağ asidi olan DHA, insan beynindeki hücrelerin yenilenmesine yardım eder ve beyin ile retina hücrelerinin çoğalmasını sağlar. Bu hücrelerde DHA seviyesinin düşmesi, depresyon, hafıza kaybı, şizofreni ve görme bozuklukları gibi problemlerin ortaya çıkmasına yol açar (78).

3. MATERYAL METOD

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyaller

PC12 (A rat phenochroma-derived hücre dizisi) hücreleri DSMZ hücre serileri bankasından (Almanya) alındı. Biyofizik laboratuvarında poly-D-lysine kaplanmış hücre kültürü flasklarında bulunan RPMI 1640 hücre ortamında üretildiler. Fötal Bovine serum, horse serumu, balık yağı ve diğer kimyasallar Sigma firmasından Fagus Firması (İstanbul) aracılığı ile Amerika ve Almanya'dan satın alındı. Risperidon Janssen Cilag ilaç firmasından satın alındı.

3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

1. Soğutmalı santrifüj: Eppendorf MR5415 (Almanya)
2. Santrifüj: Jouan B4İ (Fransa)
3. Derin dondurucu: Uğur (Türkiye)
4. Hassas terazi: Scaltec SPB 33 (İsviçre)
5. Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)
6. Otomatik pipetler: Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)
7. Spektrofotometre: Shimadzu UV 1601 (Japonya)
8. Cam-Teflon homojenizatör: Çalışkan Cam A.Ş.(Türkiye)
9. pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)
10. Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)
11. Floresan spektrofotometre (Carry Eclipsy Marka, Varian Firması, Avustralya)
12. CO₂ inkubator (Shel Lab-Biolab Lab, Fransa).
13. Laminar flow kabini (Bilser BLF2000, İstanbul).

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Tris, Merck (Almanya)
2. Glisin, Merck (Almanya)
3. Sodyum Klorür, Merck (Almanya)
4. Tween 20, Merck (Almanya)
5. Bovin Serum Albumin, Merck (Almanya)
6. EDTA, Merck (Almanya)
7. EGTA, Merck (Almanya)
8. Leupeptin, Sigma (Almanya)
9. Triton X-100, Sigma (Almanya)
10. Metanol, Merck (Almanya)
11. Hidroklorik Asit, Merck (Almanya).
12. Histopaque REF-11191-6x100ML (Amerika)
13. Bradford Kimyasalı Bio-Rad 500-0006 (Almanya)
14. Collagenase type II- A7906, 1 gram (Almanya)
15. Collegenase-Type4 Wothington 4188/47M9961 100 mg (Almanya)
16. Ultrasantrifüj tüpü, MS-80 santrifüj, 35 ml (Sorvall, Ankara)
17. Ultrasantrifüj tüpü, MS-80 santrifüj için, 2 ml (Sorvall Ankara)
18. PC12 hücreleri, DSMZ-Germany. Kültür (37 °C) seklinde
19. Nerve growth factor, Sigma, N0513, 1 mg (Amerika)

3.2. Metot

3.2.1. Hücre Kültürü ve Deneysel Tedavi

3.2.1.1. PC12 Hücre Kültürü

PC12 hücreleri normalde fare böbrek üstü bezi hücrelerinden elde edilmektedir. Bu hücelere hücre kültürü ortamında nöron büyüme faktörü (nöronal growth factor-NGF) ilave edilmesiyle nöronal hücelere dönüşmektedirler. PC12 hücreleri hem nörolojik hem de psikiyatrik hastalıklarla ilgili çalışmalarda rutin olarak kullanılmaktadır (23, 24). PC12 hücreleri DSMZ hücre serileri bankasından (Almanya) alındı. Deneysel bu hücre hattının 2-9 arasındaki pasajları kullanıldı. Deneysel kullanılan 25 ve 75 cm²'lik kültür flaskları hücrelerin ekiminden önce tutunmayı arttırmak amacıyla Poly-D-Lysin ile kaplandı. Poly-D-Lysin steril distile su ile çözüldü ve kültür kaplarına 10 µg/ml konsantrasyonda eklenerek yayıldı. Bir saatlik bir enkübasyon süresinin ardından PC12 hücreleri kültür kaplarına 1x10⁵ hücre/cm² yoğunluğunda ekildi. Kültür ortamı olarak % 15 oranında ısıyla inaktive edilmiş horse serumu, % 5 oranında ısıyla inaktive edilmiş bovin serumu, 100 IU/ml penisilin ve 100 mg/ml streptomisin içeren RPMI 1640 ortamı kullanıldı. Ekim sonrası kültürler % 5 karbondioksitli nemli hava içeren 37 °C sıcaklıkta inkübatöre konuldu.

Hücreler her 2-3 günde bir taze mediumla beslendi. Hücrelerin % 80'i birleşmeye başladığı zaman, steril pipetler aracılığı ile medium konularak, flask zemininden hücreler tyripsin-EDTA ile ayrılarak pasajlandı. Dağıtılmış PC12 hücreleri, her kuyuda hücre dansitesi 2x 10⁴ olacak şekilde Poly-D-Lysin kaplı 25 ve 75 cm²'lik kültür flasklarına aynı dansitede eklendi. 48 saat sonra hücreler gruplara ayrıldı;

1. GRUP: Kontrol grubu: Sadece RPMI 1640' da 24 saat bırakıldı.
2. GRUP: Balık yağı grubu: Sadece balık yağı verildi. 0,2 ml balık yağı (DHA 60 µM+ EPA 75 µM) 24 saat boyunca verildi (101).
3. GRUP: Risperidon grubu: Sadece risperidon (40 µM) ile hücreler 48 saat boyunca inkübe edildiler (1).

4. GRUP: Balık yağı + H₂O₂ grubu: Balık yağıyla 24 saat inkübe edildikten sonra 15 dakika 100 µM H₂O₂'e (84) maruz bırakıldı.

5. GRUP: Risperidon + H₂O₂ grubu: Risperidonla 48 saat inkübe edildikten sonra 15 dakika 100 µM H₂O₂'e maruz bırakıldı.

6. GRUP: Balık yağı + Risperidon grubu: Risperidonla 48 saat, balık yağıyla 24 saat inkübe edildi.

7. GRUP: Balık yağı + risperidon + H₂O₂ grubu: Hücreler balık yağıyla 24 saat, risperidonla 48 saat inkübe edildikten sonra 15 dakika süre ile 100 µM H₂O₂'e maruz bırakıldı.

8. GRUP: H₂O₂ grubu: Hücreler 24 saat bekletildikten sonra 15 dakika 100 µM H₂O₂'e maruz bırakıldı.

3.2.2. Antioksidan Enzim Aktivitesinin Ölçümü

3.2.2.1. İndirgenmiş Glutatyon (GSH) ve Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Analizleri

GSH düzeyleri Sedlak and Lindsay'in (85) bildirdikleri yönteme göre spektrofotometre cihazı ile belirlendi. GSH tayini için gerekli solüsyonlar;

%10 trikloroasetik asit (TCA) solüsyonu

Tris tamponu (0,4M pH:8,9): 48,46 gram tris-hydroxymethyl-aminomethan'ın hidroklorik asit (HCl) ile pH: 8,9 olacak şekilde 1 litrede çözülmesi ile hazırlanır.

Deneyin yapılışı: 0,1 ml hücre homojenatı 0,4 ml TCA solüsyonu ile karıştırıldı. 20 sn karıştırıcıda vortekslendi ve 3000 rpm de 5 dk santrifüj edildi, 0,1 ml süpernatant temiz bir tüp içine alındı. Üzerine 0,9 ml distile su, 2,0 ml Tris tamponu ve 0,1 ml DTNB solüsyonu eklendi. Oluşan sarı renk distile suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

GSH-Px enzim aktiviteleri Lawrence ve Burk (86) tarafından bildirilen yönteme göre spektrofotometrede belirlendi.

Kullanılan kimyasallar:

- 1- Tris HCl tamponu (50 mM) pH:7,6
- 2- GSH solüsyonu
- 3- CHPO (cumene-hydroperoxide) solüsyonu
- 4- %10 TCA solüsyonu
- 5- Tris tampon 0,4 M pH: 8,9
- 6- DTNB solüsyonu

Tablo 3. GSH-Px Deneyinin analiz şeması ve kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	Kontrol	Örnek
Hücre homojenatı	0.5 ml	0.5 ml
Tris HCl tamponu eklendi.	0.3 ml	0.3 ml
CHPO ilave edildi.	-	0.1 ml
GSH (her tüpe 5 sn aralıklarla konuldu.)	0.1 ml	0.1 ml
Oda ısısında tam 10 dakika beklendi.		
TCA (her tüp için 5 sn aralıklarla konuldu)	1.0 ml	1.0 ml
2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.		
Üstteki süpernatant temiz bir tüpe alındı.		
Üzerine Tris Tampon eklendi.	2.0 ml	2.0 ml
DTNB eklendi.	0.1 ml	0.1 ml

Oda ısısında 5 sn beklendi. Saf suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

3.2.3. İntrasellüler Kalsiyumun Ölçülmesi

Hücre içi kalsiyum miktarının ölçümü için PC12 hücreleri oda ısısında 45 dakika boyunca 4 μ M fura-2 AM floresan boyası ile boyandı (87). Boyanma işleminden sonra yıkamaya tabi tutulan hücre manyetik olarak karıştırılan, şeffaf küvetlere hücre yoğunluğu 2x10⁶ olacak şekilde Na⁺-HEPES [(mM cinsinden) NaCl, 140; KCl, 4,7; CaCl₂, 1,2; MgCl₂, 1,1; glukoz, 10 ve HEPES, 10 (pH 7,4)] solüsyonu içerisinde floresan spektrofotometrede (Varian Cary Eclipse, Australia)

haznesine yerleştirildi. Fura-2 AM için eksitasyon dalga boyları 340 nm ve 380 nm, 505 nm emisyon dalga boylarında floresan ışık ile uyarıldı ve yaklaşık yedi dakika boyunca kayıt alındı. Hücre içi serbest Ca^{+2} iyon düzeyi $[Ca^{+2}]_i$ değişimleri bilgisayar ekranında 340 nm/380 nm dalga boylarındaki uyarımları ile kaydedildi (84) ve Grynkiewicz ve arkadaşlarının metoduna göre hesaplandı (88).

3.2.4. Lipid Peroksidasyon Analizi

PC12 hücrelerinde LPO düzeylerinin belirlenmesi, Placer ve ark.'nın (84) bildirdikleri yöntemle göre tiyobarbitürik asit (TBARS) reaksiyonu ile son derece hassas bir spektrofotometrede (Schimadzu, UV-1800, Japonya) yapıldı.

Deneyin yapılışı: Tüm PC12 hücre grupları 1/9 (2.25 ml) oranında TBARS solüsyonu ile sulandırıldı. Kör olarak ise 0.25 ml fosfat tamponu ile 1/9 oranında TBARS karışımı kullanıldı. Örnekler ve kör, 20 dakika süresince 100°C'lik kaynar suda, su banyosunda tutuldu. Daha sonra çeşme suyu altında soğutuldu. 2500 devirde 5 dk santrifüj edildi. Üstteki pembe renkli sıvı otomatik pipetle hassas bir şekilde alınarak 1cm ışık geçişine sahip küvette 532 nm dalga boyundaki spektrofotometrede köre karşı okundu. Standart olarak ise yine aynı oranlarda hazırlanmış 1, 1, 3, 3 tetraethoxy propane solüsyonu kullanıldı. Değerler mikromol/gram protein olarak belirlendi. Sonuçlar nanomol/ gram protein olarak verildi.

3.3. İstatistiksel Analiz

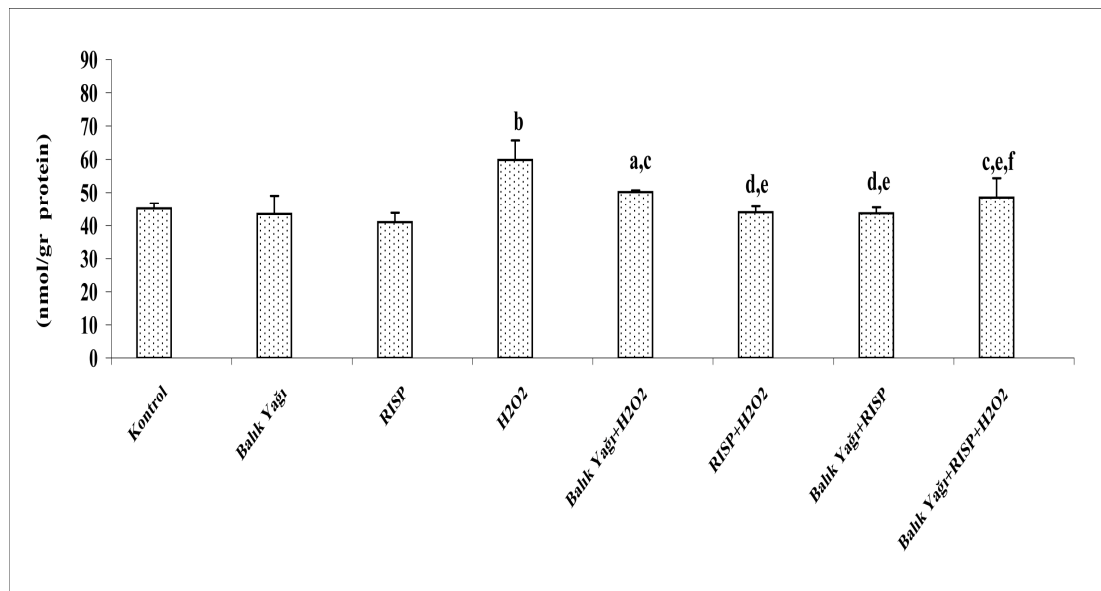
Bütün veriler ortalama \pm standart sapma [mean \pm standard deviation (SD)] olarak verildi. PC12 hücrelerinde çalışılan bilimsel değerlerin aritmetik ortalama değerleri arasındaki farklılıklar, SPSS, Windows 9.05 paket bilgisayar programı kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Gruplar arası fark olup olmadığı Mann-Whitney U testi istatistiksel analizi ile değerlendirildi. Tüm istatistikî karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ den küçük olanlar anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. PC12 Hücrelerinde LP Düzeyleri

Grafik 1. Balık Yağı ve Risperidon'un (RISP) PC12 hücrelerindeki lipid peroksidasyon (LP) düzeylerine etkileri (n=8, ortalama \pm SD).

	LP	SD
Kontrol	45,15	1,53
Balık Yağı	43,48	5,63
RISP	40,92	2,87
H ₂ O ₂	59,95	5,72
Balık Yağı+ H ₂ O ₂	50,26	0,52
RISP+ H ₂ O ₂	43,97	1,77
Balık Yağı+RISP	43,54	1,81
Balık Yağı+RISP+ H ₂ O ₂	48,65	5,73



^ap<0.05 ve ^bp<0.01 Kontrol, Balık Yağı ve RISP. kıyasla

^cp<0.05 ve ^dp<0.01 H₂O₂ kıyasla

^ep<0.05 Balık Yağı+H₂O₂ kıyasla

^fp<0.05 RISP+ H₂O₂ kıyasla

Kontrol grubu, balık yağı grubu ve risperidon grubu arasında lipid peroksidasyon düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

H₂O₂ verilen grupta; kontrol grubu, balık yağı grubu ve risperidon grubuna göre LP düzeyi belirgin olarak (P<0,01) yüksek saptandı.

Balık yağı + H₂O₂ verilen gruptaki LP düzeyi; kontrol, balık yağı ve risperidon grubuna göre anlamlı olarak yüksek (P<0,05), H₂O₂ grubuna göre ise anlamlı olarak (P<0,05) düşük bulundu.

Risperidon + H₂O₂ verilen grupta LP düzeyi; H₂O₂ grubuna göre belirgin düzeyde (P<0,01) düşük bulundu. Risperidon, balık yağı ve kontrol gruplarına göre ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.

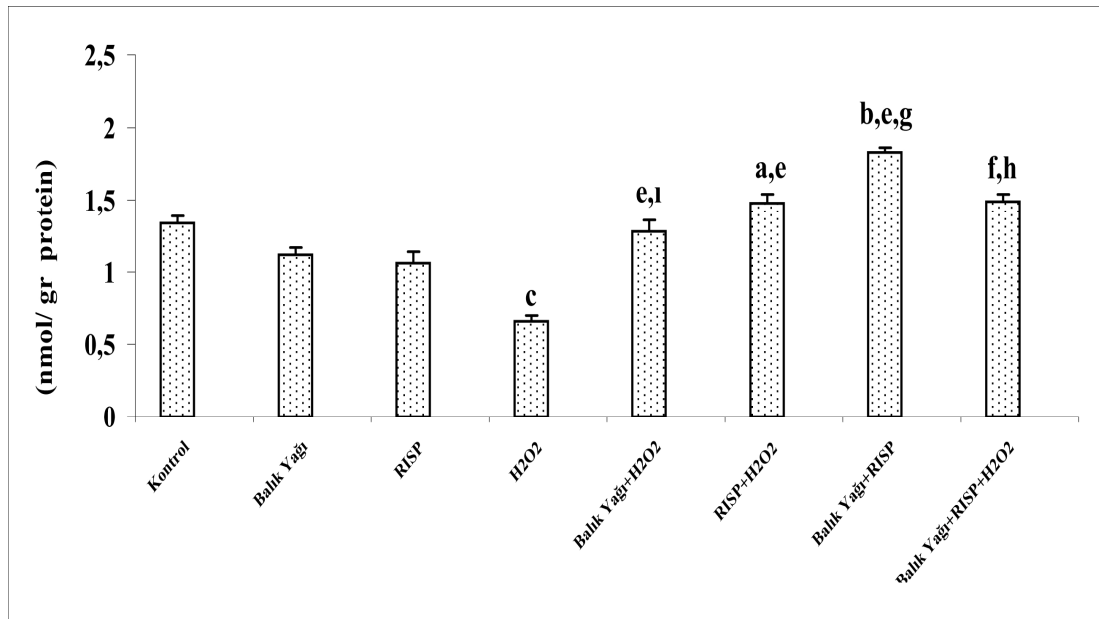
Risperidon + balık yağı verilen gruptaki LP düzeyiyle; kontrol, balık yağı, risperidon ve risperidon + H₂O₂ gruplarındaki LP düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Risperidon + balık yağı verilen gruptaki LP düzeyi, H₂O₂ verilen gruba göre belirgin olarak (P<0,01) düşük; balık yağı + H₂O₂ grubuna göre anlamlı olarak (P<0,05) düşük saptandı (Bakınız grafik 1).

Balık yağı + risperidon + H₂O₂ verilen grupta LP düzeyi; H₂O₂ grubuna göre ise anlamlı olarak (P<0,05) düşük, balık yağı + H₂O₂ grubuna göre anlamlı olarak düşük (P<0,05) ve risperidon + H₂O₂ gruplarına göre anlamlı olarak yüksek (P<0,05) bulundu. (Bakınız Grafik 1, tablo 4).

4.2. PC12 Hücrelerinde GSH Düzeyleri

Grafik 2. Balık Yağı ve Risperidon'un (RISP) PC12 hücrelerindeki indirgenmiş glutatyon üzerine etkileri (n=8, ortalama \pm SD).

	GSH	SD
Kontrol	1,34	0,05
Balık Yağı	1,12	0,05
RISP	1,06	0,08
H ₂ O ₂	0,66	0,04
Balık Yağı+ H ₂ O ₂	1,28	0,08
RISP+ H ₂ O ₂	1,48	0,06
Balık Yağı+RISP	1,83	0,03
Balık Yağı+RISP+ H ₂ O ₂	1,49	0,05



^ap<0.05 ve ^bp<0.01 ve ^cp<0,001 Kontrol, Balık Yağı ve RIS gruplarına kıyasla

^dp<0.01 ve ^ep<0.001 H₂O₂ grubuna kıyasla

^fp<0.05 ve ^gp<0,001 Balık Yağı + H₂O₂ ve RISP+ H₂O₂ gruplarına kıyasla

^hp<0.05 Balık Yağı+RISP grubuna kıyasla

^lp<0.05 balık yağı ve risperidon gruplarına kıyasla

Balık yağı grubu, risperidon grubu ve kontrol grubu arasında GSH düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

H₂O₂ verilen grupta; kontrol grubu, balık yağı grubu ve risperidon grubuna göre GSH düzeyi çok belirgin (P<0,001) düşük saptandı.

Balık yağı + H₂O₂ verilen gruptaki GSH düzeyleri, H₂O₂ grubuna göre çok belirgin (P<0,001) yüksekti. Balık yağı ve risperidon gruplarına göre ise GSH düzeyleri anlamlı olarak (p<0.05) daha yüksekti.

Risperidon + H₂O₂ verilen grupta H₂O₂ grubuna göre GSH düzeyi çok belirgin yüksekti (p<0,001). Kontrol, balık yağı ve risperidon grubuna göre GSH düzeyleri anlamlı olarak daha yüksekti (p<0.05).

Risperidon + balık yağı verilen gruptaki GSH düzeyleri, kontrol, balık yağı ve risperidon grubuna göre belirgin düzeyde (p<0,01) yüksekti. Risperidon + balık yağı verilen gruptaki GSH düzeyi, balık yağı + H₂O₂ ve risperidon + H₂O₂ gruplarına göre çok belirgin olarak (p<0,001) yüksekti. H₂O₂ grubuna göre ise GSH düzeyleri çok belirgin düzeyde (p<0,001) yüksekti.

Balık yağı + risperidon + H₂O₂ verilen grupta GSH düzeyleri ise balık yağı + H₂O₂ ve risperidon + H₂O₂ gruplarına göre anlamlı olarak (P<0,05) yüksek, balık yağı + risperidon grubuna göre ise anlamlı olarak düşük (p<0,05) bulundu. (Bakınız Grafik 2, tablo 4).

4.3. PC12 Hücrelerinde GSH-Px Düzeyleri

Balık yağı grubu, risperidon grubu ve kontrol grubu arasında GSH-Px düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

H₂O₂ verilen grupta GSH Px düzeyi; kontrol grubu, balık yağı grubu ve risperidon grubuna göre anlamlı olarak düşük (P<0,05) saptandı.

Balık yağı + H₂O₂ verilen gruptaki GSH-Px düzeyi; H₂O₂ grubuna göre belirgin düzeyde (P<0,01) yüksekti. Kontrol, balık yağı ve risperidon grubuna göre ise anlamlı olarak (p<0,05) daha yüksekti.

Risperidon + H₂O₂ verilen grupta; H₂O₂ grubuna göre GSH-Px düzeyi belirgin düzeyde (P<0,01) yüksekti. Kontrol, balık yağı ve risperidon grubuna göre ise GSH-Px düzeyi anlamlı olarak (p<0,05) daha yüksekti.

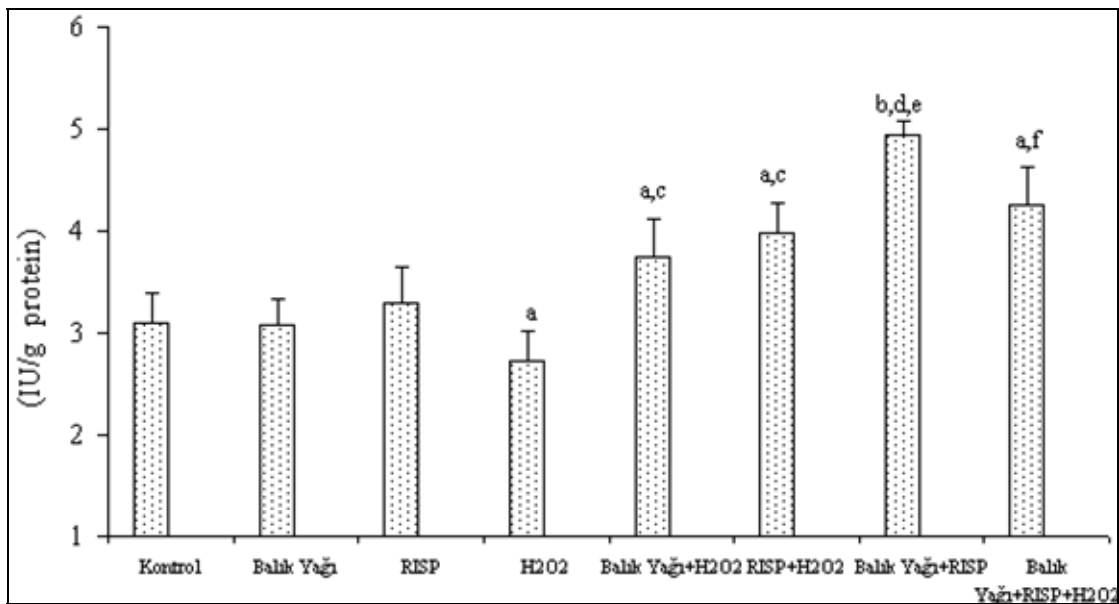
Risperidon + balık yağı verilen gruptaki GSH-Px düzeyi; kontrol, balık yağı ve risperidon grubuna göre belirgin düzeyde (P<0,01) yüksek; balık yağı + H₂O₂ ve

risperidon + H₂O₂ gruplarına göre anlamlı olarak (P<0,05) yüksek; H₂O₂ grubuna göre ise çok belirgin (p<0,001) yüksek bulundu.

Balık yağı + risperidon + H₂O₂ verilen grupta GSH-Px düzeyleri; kontrol, balık yağı ve risperidon gruplarına göre anlamlı olarak (P<0,05) yüksek; balık yağı + risperidon grubuna göre ise anlamlı olarak (p<0,05) düşük bulundu (Bakınız Grafik 3, tablo 4). Balık yağı + H₂O₂ ve risperidon + H₂O₂ gruplarıyla karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.

Grafik 3. Balık Yağı ve Risperidon'un (RISP) PC12 hücrelerindeki glutatyon peroksidaz enzimi üzerine etkileri (n=8, ortalama \pm SD).

	GSH-Px	SD
Kontrol	3,1	0,29
Balık Yağı	3,07	0,27
RISP	3,29	0,36
H ₂ O ₂	2,73	0,28
Balık Yağı+ H ₂ O ₂	3,75	0,37
RISP+ H ₂ O ₂	3,99	0,28
Balık Yağı+RISP	4,94	0,13
Balık Yağı+RISP+ H ₂ O ₂	4,26	0,36



^a p<0.05 ve ^b p<0.01 Kontrol, Balık Yağı ve RISP. Grubuna kıyasla

^c p<0.01 ve ^d p<0.001 H₂O₂ grubuna kıyasla

^e p<0.05 Balık Yağı + H₂O₂ ve RISP + H₂O₂ grubuna kıyasla

^f p<0.05 Balık Yağı + RISP grubuna kıyasla

Tablo 4. Balık yağı ve risperidonun oksidatif stres (H_2O_2) neden olduğu lipid peroksidasyon (LP), indirgenmiş glutatyon (GSH) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) düzeyleri üzerine etkileri.

Parametreler	LP (nmol/gr protein)	GSH (nmol/gr protein)	GSH-Px (IU/gr protein)
Kontrol	45.15 ± 1.53	1.34 ± 0.05	3.10 ± 0.29
Balık Yağı	43.48 ± 5.63	1.12 ± 0.05	3.07 ± 0.27
RIS	40.92 ± 2.87	1.06 ± 0.08	3.29 ± 0.36
H_2O_2	59.95 ± 2.72 ^b	0.66 ± 0.04 ^c	2.73 ± 0.28 ^a
Balık Yağı+ H_2O_2	50.26 ± 0.52 ^{a,*}	1.28 ± 0.08 ^{***,h}	3.75 ± 0.37 ^{** , a}
RISP+ H_2O_2	43.97 ± 1.77 ^{** ,g}	1.48 ± 0.06 ^{***, a}	3.99 ± 0.28 ^{** , a}
Balık Yağı+RISP	43.54 ± 1.81 ^{** ,g}	1.83 ± 0.03 ^{b,f,***}	4.94 ± 0.13 ^{b,d,***}
Balık Yağı + RISP + H_2O_2	48.65 ± 5.73 ^{d,*}	1.49 ± 0.05 ^{d,1}	4.26 ± 0.36 ^{d,1}

^a p<0.05, ^bp<0.01 ve ^cp<0.001 kontrol, balık yağı ve RISP gruplarına kıyasla.

^d p<0.05, ^e P<0.01 ve ^f p<0.001 balık yağı+ H_2O_2 ve RISP+ H_2O_2 gruplarına kıyasla.

*p<0.05, **p<0.01 ve ***p<0.001 ve H_2O_2 gruplarına kıyasla.

^g p<0.05 balık yağı+ H_2O_2 grubuna kıyasla

^h p<0.05 balık yağı ve risperidon grubuna kıyasla

¹ p<0.05 balık yağı+RISP grubuna kıyasla

4.3. PC12 hücrelerinde Sitozole Kalsiyum İyonu [Ca^{+2}]_i Salınım Düzeyleri:

Kontrol grubu, balık yağı grubu ve risperidon grubu arasında sitozole saniyede kalsiyum iyonu [Ca^{+2}]_i salınımlarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

H_2O_2 grubunda; kontrol, balık yağı ve risperidon gruplarına göre sitozole [Ca^{+2}]_i salınımı çok belirgin düzeyde yüksek (P<0,001) saptandı.

Balık yağı + H_2O_2 grubunda; kontrol, balık yağı ve risperidon gruplarına göre [Ca^{+2}]_i salınımı anlamlı olarak yüksek (P<0,05), H_2O_2 grubuna göre ise belirgin düzeyde (P<0,01) düşük saptandı.

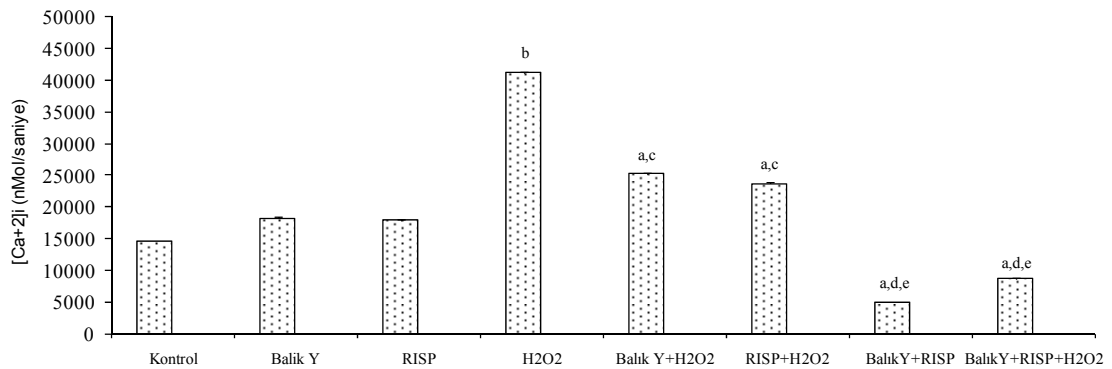
Risperidon + H_2O_2 grubunda sitozole [Ca^{+2}]_i salınımı; kontrol, balık yağı ve

risperidon gruplarına göre anlamlı olarak yüksek ($P<0,05$), H_2O_2 grubuna göre ise belirgin düzeyde ($P<0,01$) düşük bulundu. Balık yağı + H_2O_2 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Balık yağı + risperidon grubunda sitozole $[Ca^{+2}]_i$ salınımı; kontrol, balık yağı ve risperidon gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük ($P<0,05$); balık yağı + H_2O_2 ve risperidon + H_2O_2 gruplarına göre belirgin düzeyde düşük ($P<0,01$); H_2O_2 grubuna göre ise çok belirgin düzeyde düşük ($P<0,001$) bulundu.

Balık yağı + risperidon + H_2O_2 grubunda sitozole $[Ca^{+2}]_i$ salınımı; kontrol, balık yağı ve risperidon gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük ($P<0,05$); balık yağı + H_2O_2 ve risperidon + H_2O_2 gruplarına göre belirgin düzeyde düşük ($P<0,01$); H_2O_2 grubuna göre ise çok belirgin düzeyde düşük ($P<0,001$) bulundu. Balık yağı + risperidon grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Bakınız Grafik 4, şekil 10).

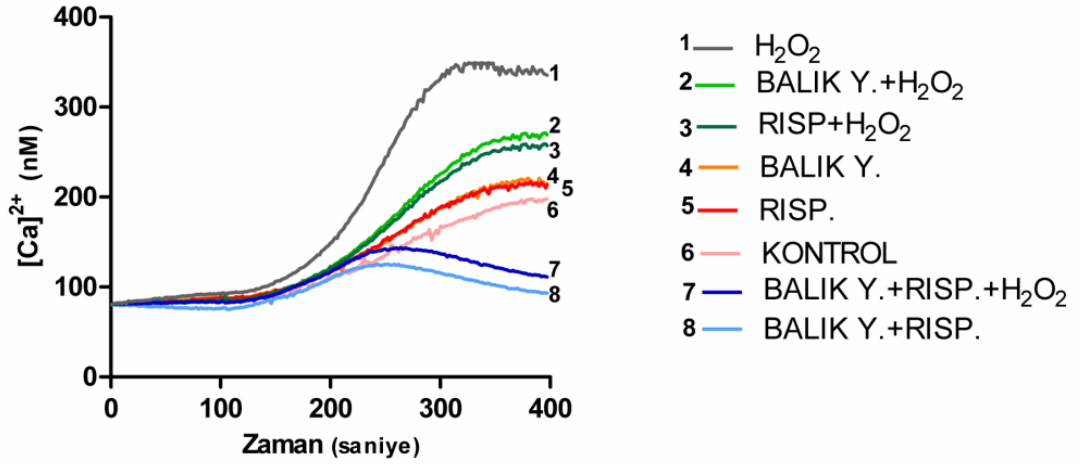
Grafik 4. PC12 nöronal hücrelerde oksidatif stresin (H_2O_2) neden olduğu sitozole saniyede kalsiyum iyonu $[Ca^{+2}]_i$ salınımı üzerinde balık yağı (Balık Y) ve risperidon (RISP)'un koruyucu etkileri. ($n=8$, ortalama değer±standart sapma).



^a $P<0,05$ ve ^b $P<0,001$. Kontrol, balık yağı ve risperidon gruplarına kıyasla.

^c $P<0,01$ ve ^d $P<0,001$. H_2O_2 grubuna kıyasla

^e $P<0,01$. Balık yağı+ H_2O_2 ve RISP+ H_2O_2 gruplarına kıyasla



Şekil 10. PC12 nöronal hücrelerde oksidatif stresin (H₂O₂) neden olduğu sitozole saniyede kalsiyum iyonu [Ca⁺²]_i salınımı üzerinde balık yağı (Balık Y) ve risperidon (RISP)'un koruyucu etkilerinin alan olarak gösterilişi.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada PC12 hücrelerine H₂O₂ vererek oluşturduğumuz oksidatif stres modelinde, balık yağı ve risperidonun antioksidan enzimler üzerine ve sitozole saniyede kalsiyum iyonu [Ca⁺²]_i salınımı üzerine etkinliği olup olmadığını göstermek, alınan sonuçlarla da risperidonun etki mekanizmasının aydınlatılarak, balık yağı ile birlikte verilmesinin fayda veya zararlarının araştırılması amaçlandı.

Risperidon nöroprotektif etkinliği olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiş bir atipik antipsikotiktir (1, 8, 9, 90). Fakat bu etkisini hangi mekanizma üzerinden gösterdiğine yönelik araştırmalar ve tartışmalar halen devam etmektedir. Şizofreni çoğul etiyolojinin suçlandığı nörogelişimsel bir hastalıktır. Aşırı serbest radikal üretimi ya da oksidatif stresin şizofrenili hastaların patofizyolojisinde rol oynayabileceğini gösteren artan sayıda kanıt vardır. Antioksidan enzimler ya da lipid peroksidasyonla şizofreni fizyopatolojisi arasında korelasyon olduğu bildirilmiştir. Örneğin antioksidan enzimler ya da lipid peroksidasyondaki anormalliklerin şizofreninin negatif semptomları, pozitif semptomları ve tardif diskineziyle ilişkisi olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (7). Bir grup araştırmacı hiç tedavi edilmemiş ilk epizod şizofreni hastalarında SOD düzeyinde azalma, katalaz ve GSH-Px seviyelerinde değişiklik olmadığını göstermiştir. Yine kronik şizofreni hastalarında yapılan bir çalışmada plazma SOD ve GSH-Px aktivitesinde azalma ve plazma MDA seviyelerinde artma olduğu gösterilmiştir (7). Bu bulgular, endojen antioksidan enzimlerinde azalma olan şizofreni hastalarının oksidatif stres ve hasar riski altında olduğunu ve şizofrenide artmış membran lipid peroksidasyonuna katkıda bulunabileceğini destekler. Tersine birçok diğer çalışma şizofrenik hastalar ve normal kontroller arasında GSH-Px ya da SOD aktivitesindeki farklılıkları göstermekte başarısız olmuşlardır (91). Diğer taraftan plazma MDA düzeylerinin şizofreni hastalarında normal kontrollerle karşılaştırıldığında 3-4 kat arttığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Plazma lipid peroksitlerinde artış, lipid peroksidasyonun göstergesidir. Şizofreni patofizyolojisinde rolü olduğu düşünülen oksidatif stres aracılı membran patolojisinin önemli göstergelerindendir (7). Lipid peroksidasyonunun, şizofrenide gözlenen EPUFA azalmasıyla uyumlu olarak major mekanizmalardan biri olduğu gösterilmiştir. Şizofrenide değişmiş membran fosfolipidlerinin esasen anormal EPUFA metabolizmasında olduğuna dair kanıtlar

vardır (7). Membran esansiyel yağ asidi azalmasının ve dolayısıyla hücre hasarının aşırı serbest radikal üretimi ya da bozulmuş antioksidan savunma sisteminden kaynaklandığını gösteren çalışmalar mevcuttur (7). Şizofrenik hastaların antioksidan enzim aktivitesindeki değişiklikleri bildiren çeşitli çalışmalar vardır. Fakat sonuçlar tutarsızdır. Şizofrenik hastaların kanlarında bazı antioksidan enzimlerin sıklıkla da SOD'ın azalmış seviyeleri hastalığın farklı sürelerinde ve postmortem beyin incelemesinde gösterilmiştir. Daha önce hiç ilaç kullanmamış ilk epizod şizofreni hastalarında artmış plazma lipid peroksitleri, değişmiş antioksidan enzim seviyeleri olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (22,92). Antipsikotik ilaçların, cfos ve cjun gibi erken genlerin, transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri ve peptidlerin ekspresyonuna neden olduğu bulunmuştur. Erken genlerin ve büyüme faktörlerinin, nöroprotektif mekanizmaları sağlayan antioksidan enzimlerin ekspresyonunu düzenlediğine dair kanıtlar vardır (22). Antioksidan özelliği olan vitaminlerin ya da esansiyel poliansatüre yağ asidi kullanımının şizofreninin bazı psikopatolojik semptomlarını düzelttiği bulunmuştur (7). Hiç tedavi edilmemiş ilk epizod şizofreni hastalarıyla, atipiklerle tedavi edilen kronik şizofreni hastaları karşılaştırıldığında, atipik kullananlarda daha düşük plazma lipid peroksitleri ve daha yüksek membran esansiyel yağ asitleri bulunmuştur. Bu bulgular psikopatolojiyle koreledir (92).

H_2O_2 , enzimatik oksidaz aktivitesinin doğal bir yan ürünüdür, serbest radikallerin endojen kaynağıdır ve hücresel düzeyde oksidatif strese katkıda bulunur. Beyin yüksek oksijen tüketimiyle birlikte yüksek metabolik aktiviteye sahiptir. Diğer organlara göre serbest radikal oluşturmaya eğilimlidir ve antioksidan aktivitesi daha azdır. Serbest radikal oluşumu ciddi boyuttaysa nöronal apoptozis olur (5).

Bizim çalışmamızda, H_2O_2 verilen grupta; kontrol grubu, risperidon grubu ve balık yağı grubuyla karşılaştırıldığında lipid peroksidasyon ürünlerinde anlamlı artma, GSH-Px düzeylerinde anlamlı azalma, GSH düzeylerinde çok belirgin azalma saptandı. Bu durum, daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olarak H_2O_2 'in, endojen antioksidan savunma sisteminin koruma kapasitesine zarar vererek oksidatif stresi arttırdığını (5,21) ve oluşan ROT'nin hücre membran ve lipoproteinlerindeki PUFA ile etkileşime girip, lipid peroksidasyon sürecini başlattığını gösterdi (93). Oluşan oksidatif strese bağlı aşırı serbest radikal üretimi başta voltaja duyarlı kalsiyum kanalları olmak üzere birçok kanalı uyararak sitozole kalsiyum akışını daha da

uyarmaktadır. Bunun sonucunda, mitokondrinin daha fazla depolarize olması sonucu serbest radikallerin üretimi daha da artmaktadır. Bu olay apoptozise kadar gitmektedir (94,95). Bu çalışmada H₂O₂ verilen grupta, sitozole kalsiyum iyonu [Ca⁺²]_i salınımlarında diğer gruplara göre çok belirgin artma bulundu. Bu durum, yapılan diğer çalışmalarla uyumlu olarak H₂O₂'in apoptozis yollarını tetiklediğini düşündürdü (5, 84).

H₂O₂'in indüklediği apoptozis modeli yalnız hipotezimizi test etmek için değil, yapılan çalışmalar sonucunda oksidatif stres göstergeleri olan antioksidan enzim savunma sisteminde değişiklikler, artmış lipid peroksidasyon ve azalmış membran poliansatüre yağ asidi seviyeleri gösterilmiş şizofreni için de bir model oluşturabilir (9).

Şizofreni etyopatogenezinde sözü geçen bir diğer hipotez membran fosfolipid hipotezidir. Bu hipoteze göre şizofrenik hastaların eritrosit ve trombosit membranlarında, postmortem beyin dokusunda özellikle dokozahegzaenoik asit (DHA) ve araşidonik asit olmak üzere poliansatüre yağ asitlerinin seviyesinde azalma olduğu gösterilmiştir (6, 10, 11, 12). Serbest radikal oluşumu, hücrel antioksidan savunma sistemlerinin koruma kapasitesini aşarsa, nöronal proteinlerde ve lipidlerde oksidatif hasar oluşur. Nöronal bağlantılar azalır ve ciddi boyuttaysa nöronal apoptozis olur (5). Şizofreni gibi genetik zemini olan hastalıklar, çevresel faktörlerden özellikle de diyetten etkilenebilir. Bu düşünceden hareketle diyetle EFA eklenmesinin psikiyatrik hastalıkların başlangıç semptomlarını önleyebileceği düşünülmüştür. Çünkü EFA vücut tarafından sentezlenemez. Beyinde araşidonik asit (AA), eikozapentaenoik asit (EPA) ve dokozahegzaenoik asit (DHA) gibi EFA metabolitleri özellikle önemlidir. Omega 6 ve Omega 3 yağ asitlerinin diyetdeki değişiklikleri, beyin lipid içeriğinde ve özellikle beyin gelişiminde dramatik değişikliklere neden olabilir (19).

Şizofrenideki membran fosfolipid hipotezi göz önüne alınarak, EFA'nin diyetdeki önemini, şizofreni semptomları üzerine etkinliği olup olmadığını araştıran çok sayıda çalışma mevcuttur. Arvindakshan ve ark. (2003) şizofreni hastalarının tedavisine n-3 PUFA eklemişler ve PANNS skorlarında ilerleme olduğunu göstermişlerdir (96).

Peet ve ark (2001) EPA eklenmesiyle DHA eklenmesini karşılaştırmışlar toplam PANNS skorlarını EPA'nın daha çok azalttığını göstermişlerdir. İlk atak şizofreni hastalarına EPA 2g/gün verilerek yapılan randomize, plasebo kontrollü çift-kör çalışmada EPA verilen hastalarda antipsikotik yanıtının daha hızlı ve yüksek, antipsikotik dozunun %20 daha düşük, EPS, konstipasyon ve cinsel yan etkilerin daha az olduğu gösterilmiştir. Yine çift-kör plasebo kontrollü çalışmalarda, prodromal dönemdeki şizofreni hastalarına verilen omega-3 yağ asitlerinin, prodromal dönemden ilk epizod psikoza geçişi önledikleri ve ilk epizod hastalarda antipsikotik doz gereksinimini azalttığına dair kanıtlar vardır. Ayrıca EPA tedavisi verilen hastaların PANNS skorlarında ve tardif diskinezi semptomlarında anlamlı düzelme olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (10, 12, 15, 16, 20, 97, 98). EPA ve DHA'nın bu etkinliklerini hangi mekanizma üzerinden gösterdiği tam olarak aydınlatılamamıştır.

Bizim çalışmamızda; balık yağı grubu, risperidon grubu ve kontrol grubu arasında antioksidan enzim düzeyleri ve sitozole $[Ca^{+2}]_i$ salınımı açısından anlamlı fark saptanmadı.

Balık yağı+ H_2O_2 verilen grupta; H_2O_2 verilen gruba göre GSH düzeyleri çok belirgin düzeyde yüksek, GSH Px düzeyi belirgin düzeyde yüksek bulundu. Bu durum, H_2O_2 'in antioksidan savunma sistemine zarar verici etkisini, balık yağının önlediğini gösterebilir. Risperidon grubu ve balık yağı grubuna göre ise GSH ve GSH Px düzeyi anlamlı olarak yüksek saptandı. Bu durum H_2O_2 'in antioksidan savunma sistemine zarar verici etkisine karşı antioksidan savunma sisteminin çalışma kapasitesini artırma çabası olarak yorumlanabilir. H_2O_2 verilen gruba göre LP düzeyi anlamlı düzeyde düşük; kontrol grubu, risperidon grubu ve balık yağı grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Bu bulgular, balık yağının, H_2O_2 'in neden olduğu membran PUFA oksidasyonunu anlamlı düzeyde önlediğini gösterebilir. Yine balık yağı + H_2O_2 grubunda H_2O_2 grubuna göre, daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olarak sitozole $[Ca^{+2}]_i$ salınımı belirgin düzeyde düşük bulundu (100). Aksine, monositik lösemi U937 hücrelerine tek başına DHA verilmesinin sitozole $[Ca^{+2}]_i$ salınımını arttırdığını ve ROT üretimi ile apoptozisi indüklediğini gösteren yayınlar da mevcuttur (99). Çalışmamıza göre balık yağının sitozole $[Ca^{+2}]_i$ salınımını azaltıcı etkisi, apoptozise karşı koruyucu etkisi olduğunu destekleyebilir.

Risperidon + H₂O₂ verilen grupta H₂O₂ grubuna göre; LP düzeyi belirgin olarak düşük (92), GSH düzeyi çok belirgin yüksek, GSH-Px düzeyi belirgin yüksek, sitozole [Ca⁺²]_i salınımı ise belirgin düşük saptandı. Kontrol, risperidon ve balık yağı grubuna göre ise sitozole [Ca⁺²]_i salınımı anlamlı düzeyde yüksek saptandı. Daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olarak risperidon bizim çalışmamızda da hücre içi kalsiyum düzeyini azaltarak hücre canlılığını arttırdı (90). Bu bulgular, risperidonun oksidatif strese karşı koruyucu etkisi olduğunu, apoptozisi önlediğini gösterdi. Daha önce yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarla, risperidonun da arasında bulunduğu atipik antipsikotiklerin hücre ölümünü engellediğini gösteren sonuçlarla uyumlu sonuçlar alındı. Fakat daha önce yapılan çalışmalarda atipik antipsikotik ilaçların nasıl hücre canlılığını arttırdığına dair net bir veri yoktu (1, 5, 9). Daha önce yapılan çalışmalarda risperidonun GSH-Px üzerine etkisi ilgili olarak tutarsız sonuçlar elde edilmiştir (7). Bu çalışma sonuçlarına göre risperidon sitoprotektif etkinliğini muhtemelen antioksidan savunma sisteminin zarar görmesini engelleyerek ve sitozole [Ca⁺²]_i salınımını azaltarak gösteriyor gibi görünmektedir. Risp + H₂O₂ grubunda LP düzeyleri, balık yağı+ H₂O₂ verilen gruba göre anlamlı olarak daha düşüktü. Bu iki grup arasında GSH, GSH Px ve sitozole [Ca⁺²]_i salınım düzeyleri üzerine etkinlikleri açısından anlamlı fark yoktu. Bu durum risperidonun, hücreyi lipid peroksidasyona karşı koruyucu etkisinin balık yağına göre daha fazla olduğunu gösterebilir.

Oksidatif stres hücredeki çekirdekte ADP-riboz (ADPR) üretimini 3 yolla artırmaktadır (104). ADPR üretimi G proteine bağlı reseptörlere ligand kanal aktivasyonu ile başlatılır. Reseptör aktivasyonu aynı zamanda intrasellüler Ca⁺² yoğunluğunun yükselmesi IP₃ tarafından hücre içi organelerden Ca⁺² serbest bırakılmasını sağlar. Voltaja duyarlı Ca⁺² ve transient reseptör potansiyel melastatin 2 (TRPM2) kanalları hücreye doğru güçlenen TRPM2 aktivasyonu ile bir pozitif feed back ile Ca⁺² girişi sağlar. Alternatif kaynaklar ADPR içeren mitokondri ve çekirdektir. ADPR polimerlerinin stimülasyon sonrası poli (ADPR) polimeraz-1 (PARP-1)'e ve sonrasında poly (ADPR) glikohidrolaz (PARG) tarafından ADPR'ye hidroliz edilir (94). Bu olay hücreyi apoptozise gidinceye kadar uyarabilir. Sitozolde Ca⁺² artışı mitokondride depolarizasyon ve porların açılması veya hücre dışından sitozole H₂O₂ lerin gelişi daha fazla ROT üretilir. ADPR ve ROS geri bildirim

mekanizması ile TRPM2 kanallarının açılması yolu ile sitozole Ca^{+2} akışını artırır (102). Bu tez çalışmamızda gözlenen lipid peroksidasyon artışına paralel artması, fakat antioksidan özelliğe sahip GSH ve GSH-Px düzeylerinin azalması kendi arasında uyumluluk arz etmektedir. Artan okidatif strese bağlı olarak bir kısım katyon kanallarının açılması bağlı olarak sitozele Ca^{+2} akışının artışına neden olmuş olabilir. Bununla birlikte risperidon ve balık yağının ROT ürünlerini bloke etmesi, mitokondiride ROT üretimini baskılamış ve katyon kanallarındaki bozukluğun azalarak sitozole Ca^{+2} akışında fizyolojik sınırlar içerisine doğru azalmıştır.

Risperidon+balık yağı verilen grupta;

1- Kontrol, balık yağı ve risperidon grubu karşılaştırıldığında; GSH ve GSH-Px düzeyleri belirgin düzeyde yüksek, sitozole $[Ca^{+2}]_i$ salınımı anlamlı düzeyde düşük bulundu.

2- Balık yağı + H_2O_2 ve risperidon+ H_2O_2 grupları karşılaştırıldığında; GSH düzeyi çok belirgin olarak yüksek, GSH Px düzeyi anlamlı olarak yüksek, sitozole $[Ca^{+2}]_i$ salınımı belirgin düzeyde düşük olarak bulundu.

3- H_2O_2 grubuyla karşılaştırıldığında; LP düzeyi belirgin düzeyde düşük, sitozole $[Ca^{+2}]_i$ salınımı çok belirgin düzeyde düşük, GSH ve GSH Px düzeyi çok belirgin yüksek olarak bulundu.

Risperidon+balık yağı+ H_2O_2 verilen grupta;

1- Kontrol, balık yağı ve risperidon gruplarına göre; sitozole $[Ca^{+2}]_i$ salınımı anlamlı olarak düşük bulundu.

2- Balık yağı+ H_2O_2 ve risperidon+ H_2O_2 gruplarına göre; GSH düzeyleri anlamlı olarak yüksek, sitozole $[Ca^{+2}]_i$ salınımı belirgin düzeyde düşük, LP düzeyleri balık yağı + H_2O_2 grubuna göre anlamlı olarak düşük, risperidon+ H_2O_2 grubuna göre ise anlamlı olarak yüksek bulundu.

3- H_2O_2 grubuna göre; LP anlamlı olarak düşük, sitozole $[Ca^{+2}]_i$ salınımı çok belirgin olarak düşük bulundu.

4- Balık yağı + risperidon grubuna göre; GSH ve GSH Px anlamlı düzeyde düşük bulundu.

Bu bulgularla risperidon ve balık yağının, antioksidan savunma sistemi ve hücre içi kalsiyum seviyeleri üzerinde sinerjik etki yaparak sitoprotektif etkiyi arttırdığı düşünüldü.

6. SONUÇ

PC12 hücrelerine H₂O₂ vererek oluşturduğumuz oksidatif stres modelinde, risperidon ve balık yağının oksidatif stresten koruyucu etkilerinin olduğu bulundu.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre risperidon ve balık yağı sitoprotektif etkinliğini, antioksidan enzimlerden GSH ve GSH-Px'ın hasar görmesini engelleyerek, lipid peroksidasyonu ve sitozole [Ca⁺²]_i salınımını azaltarak yapıyor gibi görünmektedir. Risperidonun lipid peroksidasyonunu önleyici etkisinin balık yağına göre daha fazla olduğu görünmektedir. Ayrıca balık yağı ve risperidonun birlikte verilmesi durumunda antioksidan enzimler, lipid peroksidasyonu ve sitozole [Ca⁺²]_i salınımı üzerine etkinlik daha da fazla artmaktadır. Şizofreni hastalarında daha önce yapılan çalışmalarda balık yağı eklenmesinin, hastalığın prognozuna ve tedavi yanıtına olan etkisini bu bulgular açıklayabilir. Her ne kadar bizim çalışmamızda olumlu sonuçlar saptanmış olsa da bu konuda daha önce yapılmış çalışmalarda birbiriyle tutarsız sonuçlar alınmıştır.

Atipik antipsikotiklerin ve balık yağının, nöronlardaki nöroprotektif etkilerini sadece oksidatif stresi inhibe ederek gösterdiklerini düşünmek doğru olmaz. İlaçların nöroprotektif etkilerine katkıda bulunan farklı faktörler de bildirilmiştir. Örneğin atipik antipsikotiklerin erişkin rat beyinde nörogenezisi arttırarak, rat hipokampusunda mRNA BDNF ekspresyonunu arttırarak katkıda bulduklarını gösteren yayınlar mevcuttur (8).

Bu sonuçlarımıza göre risperidonla birlikte balık yağı verilmesinin şizofrenik hastaların tedavisinde olumlu etkilerinin sitozole [Ca⁺²]_i salınımında düzenleyici rolüyle ilgili olduğu gözlenmiştir. Bu konunun aydınlatılması için şizofreni etyopatogenezine yönelik hücre kültüründe oksidatif stres, antioksidan sistem ve [Ca⁺²]_i salınımının birlikte araştırıldığı daha çok sayıda çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

ÖZET

PC12 Hücrelerinde Risperidon ve Balık Yağının Antioksidan Düzeyleri ve Sitozole Kalsiyum Akışı Üzerine Etkileri

Risperidon şizofreni tedavisinde kullanılan bir atipik antipsikotiktir. Şizofreni progresyonunu yavaşlattığını ve sitoprotektif etkinliği olduğunu gösteren artan sayıda kanıt vardır. Şizofreni etyopatogenezinde rolü olduğu düşünülen hipotezlerden biri de membran fosfolipid hipotezidir. Bu hipotezi destekleyen bulgular, şizofrenik hastaların trombosit membranlarında ve postmortem beyin dokusunda azalmış omega-3 yağ asidi miktarının gösterilmiş olmasıdır. Balık yağı yapısında omega-3 yağ asitlerinden DHA ve EPA içerir. Şizofrenik hastalara verilen omega-3 yağ asitlerinin hastalığın prognozunu olumlu yönde etkilediğini ve şizofreni semptomlarını azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur.

Bu çalışmada, PC12 hücrelerinde balık yağı ve risperidonun antioksidan düzeyi, LP, sitozole saniyede kalsiyum iyonu $[Ca^{+2}]_i$ salınımı üzerine etkinliği araştırıldı.

PC12 hücreleri flaklarda kontrol, balık yağı, risperidon, H_2O_2 , balık yağı + H_2O_2 , risperidon + H_2O_2 , balık yağı + risperidon ve balık yağı + risperidon + H_2O_2 gruplarına ayrıldı. Daha sonra hücreler analizden önce 15 dakika H_2O_2 'e maruz bırakıldı. Her grupta GSH, GSH-Px, LP, sitozole saniyede kalsiyum iyonu $[Ca^{+2}]_i$ salınım düzeyine bakıldı. Balık yağı ve risperidonla inkübe edilen hücrelerde düzeyleri azalsa da, $[Ca^{+2}]_i$ salınımı ve LP düzeyleri H_2O_2 grubunda kontrol, balık yağı ve risperidon grubuna göre yüksekti. Hücrelerdeki GSH Px ve redükte GSH düzeyleri, risperidon ve balık yağıyla inkübe edilen grupta H_2O_2 'li gruplara göre yüksek olsa da, H_2O_2 grubunda kontrol, balık yağı ve risperidon grubuna göre düşüktü.

Sonuç olarak balık yağı ve risperidonun oksidatif stresi modüle ederek koruyucu etkiye neden olduğu gösterilmiştir.

Anahtar sözcükler: Şizofreni, risperidon, balık yağı, Ca^{+2} salınımı, oksidatif stres, PC12 hücreleri

ABSTRACT

Effects of Risperidone and Fish Oil on Antioxidant Enzyme Levels and Cytosolic Ca²⁺ Release in PC12 Cells

In schizophrenia, early prevention with atypical neuroleptics such as risperidone has been shown to prevent development of some of the more serious and debilitating symptoms in many patients. The mechanisms whereby risperidone slows or prevents symptom progression in schizophrenia remain unclear.

It has been hypothesised that polyunsaturated fatty acids (PUFA) play an important role in the aetiology of schizophrenia and depression. The main evidence in support of membrane phospholipid composition hypothesis of schizophrenia comes from postmortem and platelet studies which show that in schizophrenia certain omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acid (PUFA) levels are reduced. Omega-3 fatty acids are primarily obtained from dietary sources particularly fish. There is evidence from double-blind placebo-controlled trials that omega-3 fatty acids might prevent conversion from a prodromal state into first episode psychosis, and reduce the antipsychotic drug requirement in first episode patients.

We investigated effects of fish oil and risperidone in PC12 cell line by evaluating Ca²⁺ mobilization, lipid peroxidation (LP) and antioxidant levels.

The PC12 cell were divided into flask namely control, fish oil, risperidone, H₂O₂, fish oil+ H₂O₂, risperidone+ H₂O₂, fish oil+risperidone and fish oil+risperidone+ H₂O₂. The cells were incubated with fish oil and risperidone for 24 and 48 hours respectively. Then the cells were exposed to H₂O₂ for 15 minute before analysis. Ca²⁺ release and LP levels were higher in H₂O₂ group than in control, risperidone and fish oil although their levels were decreased in the cells incubated with fish oil and risperidone. Glutathione peroxidase activity and reduced glutathione in the cells were lower in H₂O₂ group than in control, risperidone and fish oil although their levels were higher in the cells incubated with fish oil and risperidone than in H₂O₂ groups.

In conclusion, these results indicated that risperidone and fish oil induced protective effects by modulating oxidative stress.

Keywords: Schizophrenia, risperidone, fish oil, Ca²⁺ release, oxidative stress, PC12 cells.

KAYNAKLAR

1. Bai O, Wei Z, Lu W, Bowen R, Keegan D, Li XM. Protective Effects of Atypical Antipsychotic Drugs on PC12 Cells after serum Withdrawal. *Jour. Neuroscience Research* 2002;69:278-283
2. Öztürk OM. *Ruh Sağlığı ve Bozuklukları kitabı* (10.Basım). Ankara, Nobel Tıp Kitapevleri, 2004:217-279
3. Kapur S, Agid O, Mizrahi R, Li M. How Antipsychotics Work From Receptors to Reality. *Neuro Rx* 2006; 3: 10-21.
4. Danacı AE. Antipsikotik ilaçlar. Köroğlu E, Güleç C (Editörler). *Psikiyatri temel kitabı'nda*. 2. baskı. Ankara: HYB Basım Yayın; 2007. s. 648-57.
5. Wei Z, Bai O, Richardson JS, Mousseau DD, Li XM. Olanzapine protects PC12 cells from Oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Journal of neuroscience Research* 2003; 73:364-368
6. Ohara K. The n-3 polyunsaturated fatty acid/ dopamine hypothesis of schizophrenia. *Progress In Neuro-Psychopharmacology& Biological Psychiatry* 2007;31:469-474
7. Zhang XY, Tan YL, Cao LY, Wu GY, Xu Q, Shen Y, et al. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different forms of schizophrenia treated with typical and atypical antipsychotics, *Schizophrenia Research* 2006;81:291-300
8. Wang H, Xu H, Dyck LE, Li XM. Olanzapine and Quetiapine Protect PC12 Cells From β - Amyloid Peptide 25-35- Induced Oxidative Stres and the Ensuing Apoptosis, *Journal of Neuroscience Research* 2005;81: 572-580
9. Qing H, Xu H, Wei Z, Gibson K, Li XM. The ability of atypical antipsychotic drugs vs. haloperidol to protect PC12 cells against MPP+ -induced apoptosis *European Journal of Neuroscience* 2003;17:1563-1570
10. Paris M, Kidd PM. Omega-3 DHA and EPA for Cognition, Behaviour, and Mood: Clinical Findings and Structural Functional Synergies with Cell Membrane Phospholipids. *Alternative Medicine Review* 2007; (12;3): 207-227
11. Horrobin DF, Glen AI, Vaddadi K. The membrane hypothesis of schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 1994; 13:195-207
12. Peet M. Omega-3 Polyunsaturated Fatty acids in the Treatment of Schizophrenia. *Isr J Psychiatry Relat Sci* 2008; (45:1): 19-25
13. du Bois TM, Deng C, Huang XF. Membrane phospholipid composition, alterations in neurotransmitter systems an schizophrenia, *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2005;29:878-888
14. Asisi A, Banzi R. Fish oil and mental health: the rol of n-3 long chain polyunsaturated fatty acids in cognitive development and neurological disorders, *Lippincott Williams & Wilkins* 2006;(21: 6)
15. Peet M, Brind J, Ramchand CN, Shah S, Vankar GK. Two double blind placebo-controlled pilot studies of eicosapentaenoic acid in the treatment of schizophrenia. *Shizophr Res* 2001;49:243-251
16. Emsley R, Myburgh C, Oosthuizen P, Van rensburg SJ. Randomized, placebo-controlled study of ethyl-eicosapentaenoic acid as supplemental treatment in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2002;159:1596-1598
17. Işık E. Güncel Şizofreni; Ankara, Asimetrik Paralel, 2006:63-94.

18. Freud S. Pskikopatoloji. Atalay H (editör). İstanbul, Payel Yayınları, 1999:193-211.
19. Vaddadi K. Essential fatty acids and mental illness, *International Review of Psychiatry*, April 2006;18(2):81-84
20. Peet M. Eicosapentaenoic acid in the treatment of schizophrenia and depression: rationale and preliminary double-blind clinical trial results, *Prostaglandins Leukotrienes and Essential fatty acids* 2003;69:477-485
21. Mahadik SP, Pillai A, Joshi S, Foster A. Prevention of oxidative stress-mediated neuropathology and improved clinical outcome by adjunctive use of combination of antioxidants and omega-3 fatty acids in schizophrenia. *International review of Psychiatry* 2006;18(2):119-131
22. Pillai A, Parikh V, Terry AV Jr, Mahadik SP. Long-term antipsychotic treatments and crossover studies in rats: Differential effects of typical and atypical agents on expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain. *Journal of psychiatric Research* 2007;41:372-386
23. Levi A, Eldridge JD, Paterson BM. Molecular cloning of a gene sequence regulated by nerve growth factor. *Science*. 1985 Jul 26;229(4711):393-5.
24. Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976 Jul;73(7):2424-8.
25. Knight JA. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30(2):145-58.
26. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem* 2007;18(9):567-79.
27. Sapolsky RM. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry* 2000;57:925-35.
28. Seifried HE, Anderson DE, Sorkin BC, Costello RB. Free radicals: the pros and cons of antioxidants. Executive summary report. *J Nutr* 2004;134(11):3143-63.
29. Lam MA, Pattison DI, Bottle SE, Keddie DJ, Davies MJ. Nitric oxide and nitroxides can act as efficient scavengers of protein-derived free radicals. *Chem Res Toxicol* 2008;21(11):2111-9.
30. Russell RC, Roth AC, Kucan JO, Zook EG. Reperfusion injury and oxygen free radicals: a review. *J Reconstr Microsurg* 1989;5(1):79-84.
31. Van Wijk R, Van Wijk EP, Wiegant FA, Ives J. Free radicals and low-level photon emission in human pathogenesis: state of the art. *Indian J Exp Biol* 2008;46(5):273-309.
31. Leusen JH, Verhoeven AJ, Roos D. Interactions between the components of the human NADPH oxidase: a review about the intrigues in the phox family. *Front Biosci* 1996;1:72-90.
32. Peskin AV. Cu, Zn-superoxide dismutase gene dosage and cell resistance to oxidative stress: a review. *Biosci Rep* 1997;17(1):85-9.
33. Raha S, Myint AT, Johnstone L, Robinson BH. Control of oxygen free radical formation from mitochondrial complex I: roles for protein kinase A and pyruvate dehydrogenase kinase. *Free Radic Biol Med* 2002;32(5):421-30.
34. Juránek I, Bezek S. Controversy of free radical hypothesis: reactive oxygen species-cause or consequence of tissue injury? *Gen Physiol Biophys* 2005;24(3):263-78.

35. Mruk DD, Silvestrini B, Mo MY, Cheng CY. Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception* 2002;65(4):305-11.
36. Sharpe MA, Robb SJ, Clark JB. Nitric oxide and Fenton/Haber-Weiss chemistry: nitric oxide is a potent antioxidant at physiological concentrations. *J Neurochem* 2003;87(2):386-94.
37. Liochev SI, Fridovich I. The Haber-Weiss cycle 70 years later: an alternative view. *Redox Rep* 2002;7(1):55-7.
38. Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 2000;149(1):43-50.
39. Khan AU, Kasha M. Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(26):12365-7.
40. Gutteridge JM, Maitt L, Poyer L. Superoxide dismutase and Fenton chemistry. Reaction of ferric-EDTA complex and ferric-bipyridyl complex with hydrogen peroxide without the apparent formation of iron(II). *Biochem J* 1990;269(1):169-74.
41. Imlay JA, Chin SM, Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* 1988;240(4852):640-2.
42. Winterbourn CC. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett* 1995;82-83:969-74.
43. Valko M, Morris H, Cronin MT. Cronin, Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005;12(10): 1161-208.
44. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995;41:1819-28.
45. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992;119(6):598-620.
47. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 2000;899:136-47.
48. Morrow JD, Chen Y, Brame CJ, Yang J, Sanchez SC, Xu J, Zackert WE et al. The isoprostanes: unique prostaglandin-like products of free-radical-initiated lipid peroxidation. *Drug Metab Rev* 1999;31(1):117-39.
49. Leutner S, Eckert A, Müller WE. ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain. *J Neural Transm* 2001;108(8-9):955-67.
50. Quinlan GJ, Gutteridge JM. Hydroxyl radical generation by the tetracycline antibiotics with free radical damage to DNA, lipids and carbohydrate in the presence of iron and copper salts. *Free Radic Biol Med* 1988;5(5-6):341-8.
51. Wallace SS. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med* 2002;33(1):1-14.
52. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160(1): 1-40.
53. Mason RP, Stolze K, Flitter WD. Free radical reactions with DNA and its nucleotides. *Basic Life Sci* 1990;52:119-25.
54. Peskin AV. Interaction of reactive oxygen species with DNA. A review. *Biochemistry (Mosc)* 1997;62(12): 1341-7.

55. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 2003;91:179-94.
56. Greenwald RA. Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases. A critical review. *Free Radic Biol Med* 1990;8(2):201-9.
57. Macmillan-Crow LA, Cruthirds DL. Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic Res* 2001;34(4):325-36.
58. Krinsky NI. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;200(2):248-54.
59. Pinchuk I, Lichtenberg D. The mechanism of action of antioxidants against lipoprotein peroxidation, evaluation based on kinetic experiments. *Prog Lipid Res* 2002;41(4):279-314.
60. Klouche K, Morena M, Canaud B, Descomps B, Beraud JJ, Cristol JP. Mechanism of in vitro heme-induced LDL oxidation: effects of antioxidants. *Eur J Clin Invest* 2004;34(9):619-25.
61. Comporti M. Introduction-serial review: iron and cellular redox status. *Free Radic Biol Med* 2002;32(7):565-7.
62. Kleinová M, Hewitt M, Brezová V, Madden JC, Cronin MT, Valko M. Antioxidant properties of carotenoids: QSAR prediction of their redox potentials. *Gen Physiol Biophys* 2007;26(2):97-103.
63. Dworakowski R, Anilkumar N, Zhang M, Shah AM. Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Biochem Soc Trans* 2006;34(Pt 5):960-4.
64. Becker BF, Reinholz N, Leipert B, Raschke P, Permanetter B, Gerlach E. Role of uric acid as an endogenous radical scavenger and antioxidant. *Chest* 1991;100(3 Suppl):176S-181S.
65. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004;266(1-2):37-56.
66. Guittet O, Roy B, Lepoivre M. Nitric oxide: a radical molecule in quest of free radicals in proteins. *Cell Mol Life Sci* 1999;55(8-9):1054-67.
67. Kasparová S, Brezová V, Valko M, Horecký J, Mlynárik V, Liptaj T, et al. Study of the oxidative stress in a rat model of chronic brain hypoperfusion. *Neurochem Int* 2005;46(8):601-11.
68. Herrera DG, Yagüe AG, Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Collado-Morente L, Muriach M, et al. Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of antioxidant. *PNAS* 2003;100:7919-24.
69. Hengstler JG, Bolt HM. Oxidative stress: from modification of cell-cycle related events, secondary messenger function, dysregulation of small GTPases, protein kinases and phosphatases to redox-sensitive cancer models. *Arch Toxicol* 2008;82(5):271-2.
70. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985 25;260(6):3440-50.
71. Alberts B, Johnson A, Lewis J. *Molecular Biology of the Cell: Fourth Edition*. Garland Publishing Inc, 2002: 852-862.
72. Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem*.1987;56:395-433. Review.

73. Catterall WA, Perez-Reyes E. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol Rev.* 2005;57(4): 411-25.
74. Mckay BE, Placzek AN. Regulation of synaptic transmission and plasticity by neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem. Pharmacol.* 2007;74(8): 1120-33.
75. Sönmez MB. Şizofreni ve şizoaffektif bozukluk akut alevlenmesi olan hastalarda risperidon ile ziprasidonun kardiyak ekstrapiramidal ve metabolik yan etkilerinin karşılaştırılması, uzmanlık tezi, 2007
76. Sadock BJ, Sadock VA. (Çeviri Editörleri, Aydın H, Bozkurt A). Kaplan Sadock, Klinik Psikiyatri. 8. baskı. 3.cilt. Güneş Kitabevi Ltd Şti, Ankara, 2007.
77. Servet E, Başoğlu C. Şizofrenili Hastalarda Haloperidol ve Risperidon'un Klinik Etki ve Yan Etkileri, Klinik Psikofarmakoloji Bülteni 2002;12:6-13
78. Kaya Y, Duyar HA, Erdem ME. Balık yağ asitlerinin insan sağlığı için önemi. E.Ü. Su Ürünleri Dergisi 2004;21(3-4):365-370
79. Aydın A, Sağlığımız ve Omega-3 yağ asitleri. İ.Ü. Tıp Fakültesi sürekli tıp eğitimi etkinlikleri, Sağlıkta ve hastalıkta beslenme sempozyum dizisi 2004;41:181-189
80. Calabrese JR, Rapport DJ, Shelton MD. Fish oils and bipolar disorder, *Archives of General Psychiatry*, 1999;56:413-414.
81. Sarsilmaz M, Songur A, Ozyurt H, Kuş I, Ozen OA, Ozyurt B, et al. A Potential role of dieatry omega-3 essential fatty acids on some oxidant/antioxidant parameters in rats' corpus striatum, *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids*, 2003;69:253-259
82. Gordon DT, Ratliff V. The implications of omega-3 fatty acids in human healty, *Advances in Seafood Biochemistry Composition and Quality*, Ed. By George L. Flick, 1992: 406
83. Gorga C. A new selected comments on lipids, *Quality Assurance of Seafood Appendix* 1998; 1- 245
84. Uğuz AC, Naziroğlu M, Espino J, Bejarano I, González D, Rodríguez AB, et al. Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and -9 activities. *J Membr Biol.* 2009 Dec;232(1-3):15-23. Epub 2009 Nov 7.
85. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968;25(1):192-205.
86. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976;71(4):952-8.
87. Bejarano I, Terrón MP, Paredes SD, Barriga C, Rodríguez AB, Pariente JA. Hydrogen peroxide increases the phagocytic function of human neutrophils by calcium mobilisation, *Mol Cell Biochem.* 2007 Feb;296(1-2):77-84
88. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260:3440-3450.
89. Placer ZA, C.L. Johnson BC. Estimation of products of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biological fluids. 1966.
90. Tan QR, Wang XZ, Wang CY, Liu XJ, Chen YC, Wang HH, et al. Differential effects of classical and atypical antipsychotic drugs on rotenone-induced neurotoxicity in PC12 cells, *European Neuropsychopharmacology* 2007;17, 768-773 40

91. Li M, Kong ZM, Liu ZL. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation induced by eicosapentaenoic acid (EPA) in PC12 cells, *Cell Biol Toxicol* 2006; 22: 331–337.
92. Parikh V, Khan MM, Mahadik SP. Differential effects of antipsychotics on expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain, *Journal of Psychiatric Research* 2003;37:43-51
93. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005;15(4):316-28.
94. Naziroğlu M. Role of Selenium on Calcium Signaling and Oxidative Stress-induced Molecular Pathways in Epilepsy. *Neurochem Res* 2009.
95. Naziroğlu M, Kutluhan S, Uğuz AC, Celik O, Bal R. Butterworth PJ. Topiramate and vitamin E modulate the electroencephalographic records, brain microsomal and blood antioxidant redox system in pentylenetetrazol-induced seizure of rats. *J Membr Biol* 2009;229(3):131-40.
96. Arvindakshan M, Sitasawad S, Debsikdar V, Ghate M, Evans D, Horrobin DF, et al. Essential polyunsaturated fatty acid and lipid peroxide levels in never-medicated and medicated schizophrenia patients, *Society of Biological Psychiatry* 2003;53:56-64
97. Berger GE, Smesny S, Amminger GP. Bioactive lipids in schizophrenia. *Int Rev Psychiatry*. 2006 Apr;18(2):85-98.
98. Schäfer MR, Klier CM, Papageorgiou K, Friedrich MH, Amminger GP. Early detection of psychotic disorders *Neuropsychiatr*. 2007;21(1):37-44.
99. Aires V, Hichami A. Docosahexaenoic acid induces increases in $[Ca^{2+}]_i$ via inositol 1,4,5-triphosphate production and activates protein kinase C gamma and -delta via phosphatidylserine binding site: implication in apoptosis in U937 cells. 2007;72:1545-1556
100. Calviello G, Palozza P, Di Nicuolo F, Maggiano N, Bartoli GM. N-3 PUFA dietary supplementation inhibits proliferation and store-operated calcium influx in thymoma cells growing in Balb/c mice. *J Lipid Res*. 2000 Feb;41(2):182-9.
101. Arab K, Rossary A, Flourié F, Tourneur Y, Steghens JP. Docosahexaenoic acid enhances the antioxidant response of human fibroblasts by upregulating gamma-glutamyl-cysteinyl ligase and glutathione reductase, *British Journal of Nutrition* 2006;95:18-26
102. Stephen M.Stahl, Bilgen Taneli. Temel Psikofarmakoloji Nörobilimsel Temeli ve Pratik Uygulamaları, Astra Zeneca, Yelkovan yayıncılık, 2003;375
103. Emre M, Özcal I, Şan M. Endoteldeki iyon kanalları ve işlevleri, *Erciyes Tıp Dergisi (Erciyes Medical Journal)* 2004;26(4):186-193,
104. Naziroğlu M. New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochemical Research* 2007; 32: 1990-2001. Review.