

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyofizik Anabilim Dalı

YAŞLILIĞIN OLUŞTURDUĞU DEĞİŞİKLİKLERDE
NİTRİK OKSİD'İN ROLÜNÜN
ELEKTROFİZYOLOJİK PARAMETRELERLE
İNCELENMESİ

Semir ÖZDEMİR

Yüksek Lisans Tezi

T 90478

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Piraye YARGIÇOĞLU

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
Desteklenmiştir (Proje No: 98.01.0122.02).

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2000

T.C. YÜKSEK ÖĞRETİM BAKANLIĞI
DOKÜMANİZASYON MERKEZİ

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyofizik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 30/03/2000

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Piraye YARGIÇOĞLU
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Aysel AĞAR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Oğuz K. BAŞKURT
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Yurttaş OĞUZ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Nöroloji Anabilim Dalı

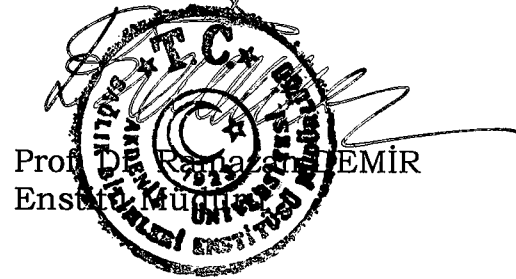


Üye : Doç. Dr. Saadet GÜMÜŞLÜ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Rana DEMİR
Enstitü Müdürlüğü



ÖZET

Yaşlanmanın oluşturduğu komplikasyonlarda serbest radikallerin önemli rolü olduğu birçok çalışmada ortaya konmuştur. Ancak, görsel sistemde bol miktarda bulunan ve görme fizyolojisinde önemli bir rolü olan nitrik oksidin, yaşlanmanın görsel sistemde oluşturduğu değişikliklerdeki rolü bilinmemektedir. Bu etkiyi ortaya çıkarmayı amaçlayan çalışmamızda 80 adet sıçan kullanılmıştır.

Bu hayvanlar; genç kontrol (GK), orta-yaşlı kontrol (OK), genç L-arginin (GA), orta-yaşlı L-arginin (OA), genç L-NAME (GN), orta-yaşlı L-NAME (ON), genç vitamin E (GE) ve orta-yaşlı vitamin E (OE) olmak üzere 8 eşit gruba bölünmüştür. Kontrol gruplarına serum fizyolojik verilirken, diğer gruplara; 160 mg/kg/gün L-arginin, 10 mg/kg/gün L-NAME ve 30 mg/kg/gün vitamin E 8 hafta boyunca uygulanmıştır.

Deneysel sürenin sonunda, sıçanların görsel uyarılma potansiyelleri (VEPs) kaydedildikten sonra, biyokimyasal parametrelerin ölçümü için beyin dokuları alınmıştır.

TBARS ve nitrit düzeylerinin orta-yaşlı grupta genç gruba göre anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. GN ve ON gruplarında kontrollerine göre beyin TBARS düzeylerinin arttığı ve bu artışın anlamlı olduğu gözlenmiştir. Diğer yandan GA, OA, GE ve OE gruplarında TBARS seviyelerinin kontrol gruplarına göre azaldığı fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur. Kontrollerine göre OA grubunda beyin nitrit seviyesinin arttığı, ON grubunda ise beyin nitrit seviyesinin anlamlı düzeyde azaldığı tespit edilmiştir. Vit E'nin GE ve OE gruplarında kontrollerine göre beyin nitrit seviyesini anlamlı ölçüde düşürdüğü gözlenmiştir.

VEP sonuçları incelendiğinde; OK grubunun P₃ bileşeninin latensinde GK'ya göre anlamlı bir uzama tespit edilmiştir. GN grubunda P₁, ON grubunda P₁, P₂, N₂ bileşenlerinin tepe latenslerinin kontrollerine göre anlamlı ölçüde uzadığı saptanmıştır. Ancak diğer gruplar arasında önemli bir farklılığın olmadığı görülmüştür. Tepeden-tepeye genlik değerleri incelendiğinde; P₂N₂ ve N₂P₃ genliklerinin, ON ve OE gruplarında OK'ya göre önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Diğer gruplarda ise genliklerde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.

ABSTRACT

It has been reported in many studies that free radicals have a crucial role in the complications occurred in aging. However nitric oxide (NO) is found to be located all over the visual system and play a critical role in vision, its effects on changes occurred during aging stayed to be unknown. Thus, in this experiment the possible effect of NO on visual system of individuals with various ages was investigated.

80 rats were divided into 8 groups as; young control (YC), middle-age control (MK), young+L-arginine (YA), middle-age+L-arginine (MA), young+L-NAME (YN), middle-age+L-NAME (MN), young+vitamin E (YE) and middle-age+vitamin E (ME). While physiologic solution were administered the control groups, 160 mg/kg/day L-arginine, 10 mg/kg/day L-NAME and 30 mg/kg/day vitamin E . were administered to the experimental groups.

At the end of experimental period (8 weeks), visual evoked potentials (VEPs) were recorded from animals. Subsequently, brain tissue of the animals were taken for the measurement of biochemical parameters.

Brain TBARS and nitrite levels were increased significantly with age. There were also a significant increments in the brain TBARS levels of YN and MN groups with respect to their controls. Although, brain TBARS levels in YA, MA, YE and ME groups were found to be increased compared with their corresponding controls, they didn't reach statistically significance level. Brain nitrite level was found to be significantly decreased in MN group, whereas increased in MA group compared with the MC group. However, vit E caused a significant decrement in brain nitrite levels of YE and ME groups with respect to their control groups.

P₃ latency of the MC group was increased compared with the young group. P₁ in the YN group prolonged while P₁, P₂ and N₂ components in the MN group were delayed with respect to their corresponding controls. But, there was no significant changes between other groups. Results obtained from amplitudes was shown that, P₂N₂ and N₂P₃ amplitudes were decreased significantly with respect to MC group. However, there was no important changes in amplitudes of other groups.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşme sürecindeki değerli eleştirileriyle bana yol gösteren hocam Prof . Dr. Piraye YARGIÇOĞLU'na, özverili çabaları ve yardımları dolayısıyla;

Prof. Dr. Aysel AĞAR ve ekibine,

Doç. Dr. Saadet GÜMÜŞLÜ ve ekibine

Yrd. Doç. Dr. Berrin AKTEKİN'e

Uzm. Şakir ATALAY şahsında tüm Deney Hayvanları Ünitesi çalışanlarına,

Erol NİZAMOĞLU'NA,

Dostlarım Nazmi YARAŞ ve Özgür SEVGİ'ye,

Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Ve burada adını anmadığım tüm dostlarıma sonsuz şükranlarımı sunarım.

Ayrıca, teknik olanaklarını bizden esirgemeyen Fizyoloji, Biyokimya ve Nöroloji Anabilim Dallarına da teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Görsel Sistem ve Görsel Uyarılma Potansiyelleri	3
2.1.1. Görsel Sistem	3
2.1.2. Görsel Uyarılma Potansiyelleri	8
2.2. Yaşlanma	10
2.2.1 Yaşlanmanın Hücresel ve Moleküler Mekanizması	11
2.3. Serbest Radikaller	13
2.3.1. Serbest Radikallerin Hücrelere Etkisi	15
2.4. Antioksidan Savunma Sistemi	17
2.5. Nitrik Oksid	22
GEREÇLER VE YÖNTEMLER	30
3.1. Görsel Uyarılma Potansiyellerinin Kaydedilmesi	30
3.2. Kan Basıncı Ölçümü	30
3.3. Biyokimyasal Yöntemler	31
3.3.1. Dokuların Homojenizasyonu	31
3.3.2. Doku thiobarbitürik Asid Reaktif Ürünlerinin Ölçümleri	32
3.3.3. Nitrit Tayini	32
3.3.4. Protein Tayini	32
3.4. İstatistiksel İşlem	32
BULGULAR	33
4.1. Genel Görünüm	33
4.2. Besin Tüketimi	33
4.3. Ağırlık Değişimi	33
4.4. Kan Basıncı	33
4.5. Doku TBARS ve Nitrit Sonuçları	35
4.5.1. Beyin TBARS ve Nitrit Sonuçları	35
4.6. VEP Sonuçları	38
TARTIŞMA	43
KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	60

SİMGELER VE KISALTMALAR

NO	Nitrik Oksid
ONOO-	Peroksinitrit
cGMP	Siklik Guanozin Mono Fosfat
PDE	Fosfodiesteraz Enzimi
GC	Guanilat Siklaz
dLGN	Dorsal Lateral Genikulat Nükleus
GTP	Guanozin Tri Fosfat
EEG	Elektroensefalografi
EP	Uyarılma Potansiyeli
VEPs	Görsel Uyarılma Potansiyelleri
FVEP	Flaş Görsel Uyarılma Potansiyeli
PR-VEP	Patern Değişmeli Görsel Uyarılma Potansiyeli
GABA	Gamma Amino Butirik Asid
EPSP	Eksitatör Post-sinaptik Potansiyel
IPSP	İnhibitör Post-sinaptik Potansiyel
CO	Karbonmonooksid
Ach	Asetilkolin
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
NMDA	N-metil D-aspartat
MDA	Malondialdehid
EDTA	Etilen Di-amin Tetra-asetik Asid
O ₂ ⁻	Süperoksid Anyonu
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksid
[•] OH	Hidroksil Radikali
O ₃	Ozon
NO [•] ₂	Nitrojen Dioksid
PUFA	Poliansatüre Yağ Asidleri
L [•]	Karbon Merkezli Radikal
LOO [•]	Peroksil Radikali
LOOH	Lipid Hidroperoksid
SOD	Süperoksid Dismutaz Enzimi
CAT	Katalaz Enzimi

GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz Enzimi
GSSG-R	Glutasyon Redüktaz
GSH	Glutasyon
AH	İndirgeyici Ajan
A β	Amiloid Beta Peptid
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler
NOS	Nitrik Oksid Sentaz Enzimi
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat redükte formu
BH ₄	Tetrahidrobiopterin
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginin metil-ester
L-NMMA	L- N ^G -monometil-arginin
L-NNA	N ^G -nitro-L-arginin
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
GSNO	S-nitrosoglutasyon
N ₂ O ₃	Dinitrojen Trioksit
IL	İnterlökin
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
PVN	Paraventriküler Çekirdek
CRH	Kortikotropin Salgılatıcı Hormon
GHRH	Büyüme Hormonu Salgılatıcı Hormonu
LH	Luteinleştirici Hormon
GH	Büyüme Hormonu
RNOS	Reaktif Nitrojen Oksit Türleri
NO ⁺	Nitrozonyum Katyonu
SIN-1	3-morpholino-sydnonimine
SNP	Sodyum Nitroprusid
sGC	Çözünebilir (soluble) Guanilat Siklaz
pGC	Partiküler Guanilat Siklaz
CaBP	Kalsiyum Bağlayıcı Protein
CaM	Kalsiyum Kalmodulin
TBARS	Thiobarbütirik Asit Reaktif Ürünleri
ANOVA	Varyans Analizi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Retina'nın Nükleer Tabakaları	3
2.2. Işık Etkisinde Rodopsin Döngüsü	4
2.3. Guanilat Siklaz ve Kalsiyumun Çubukların Işığa Adaptasyonunda Rolü	5
2.4. Lateral Genikulat Nükleus	6
2.5. Primer Görsel Korteksin Anatomik Tabakaları	7
2.6. Görsel Uyarılma Potansiyeli ve Komponentleri	9
2.7. Nitrik Oksid Sentezi	23
2.8. Nitrik Oksidin Biyolojik Reaksiyonları	24
2.9. Nitrik Oksidin Fotoreseptördeki Etki Mekanizması	28
4.1. Grupların Haftalık Ağırlık Değişimi	35
4.2. Beyin TBARS Düzeyleri	37
4.3. Beyin Nitrit Düzeyleri	37
4.4. Genç Gruplardan Kaydedilen VEP'ler ve Komponentleri	39
4.5. Orta-yaşlı Gruplardan Kaydedilen VEP'ler ve Komponentleri	40

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
4.1. Kontrol ve Deney Gruplarının Ağırlık Değişimleri ve Yem Tüketimleri	34
4.2. Beyin TBARS ve Nitrit Değerleri	36
4.3. Latens Değerlerinin Ortalama ve Standart Sapmaları	41
4.4. Genlik Değerlerinin Ortalama ve Standart Sapmaları	42



GİRİŞ

Yaşlanma, nöron kaybı ile karakterize, nörotransmitterlerin ve birtakım fizyolojik fonksiyonların azaldığı doğal bir olaydır (1, 2). Yaşlanma, üzerinde çok çalışılan bir konu olmasına rağmen, mekanizması henüz aydınlatılamamış bir olgudur. Ancak bu konuda yapılan araştırmalar, diğer hastalıklarda olduğu gibi yaşlanmada da serbest radikallerin önemli rolü olduğunu vurgulamaktadır (1, 2, 3, 4). Yaşlanmayı açıklayan en önemli teorilerden biri olan serbest radikal teorisi, serbest radikallerin yol açtığı hasarların birikmesi sonucu yaşlanmanın oluştuğunu ileri sürmektedir. Serbest radikaller, hücrenin yapı taşları olan lipidler, proteinler, karbohidratlar ve nükleik asitlere zarar verip fonksiyonlarını bozmaktadır. Özellikle hücre membranlarında bol miktarda bulunan lipidlerin oksidasyonu, membranın fonksiyonunda önemli değişikliklere yol açmaktadır.

Bu konuda yapılan çalışmalar, bugüne kadar lipid peroksidasyona sebep olan birçok kimyasal ajan içerisinde vazodilatör etkisinin yanında birçok fizyolojik fonksiyonu olan ve L-arginin aminoasidinden üretilen nitrik oksid molekülünün de yer aldığını göstermiştir (2, 5, 6, 7, 8). Ancak, özellikle son yıllarda bu molekülün nörodejeneratif etkisinin ortam koşullarına ve konsantrasyona bağlı olduğu ve fizyolojik koşullarda antioksidan etki göstererek nöroprotektif bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (9-13). Ayrıca bazı çalışmalarda NO'nun etkisinin kullanılan donörlere bağlı olduğu ve bunlardan bazılarının serbest radikal oluşumuna yol açarak lipid peroksidasyonu arttırdığı iddia edilmektedir (9, 10, 14).

NO, oksijen varlığında çeşitli reaktif nitrojen oksid türleri (RNOS) oluşturabilen moleküler bir serbest radikal olmakla birlikte, kendisinin zayıf bir indirgeyici ajan olduğu ileri sürülmüştür. Ancak, moleküler oksijen (O_2) ile reaksiyonuyla oluşan arabileşiklerin, enzimler ve DNA gibi makromoleküllerin değişmesine neden olan substratları oksitleyebildiği veya nitrozlayabildiği bildirilmiştir. Buna ek olarak NO'nun endojen bir serbest radikal olan süperoksit (O_2^-) ile reaksiyona girip, reaktif bir arabileşik olan peroksinitrit ($ONOO^-$) de oluşturduğu vurgulanmaktadır. $ONOO^-$ in birçok biyolojik molekülü tahrip edebilen ve metal katalizinden bağımsız olarak hidroksil radikallerine ayrışabilen, güçlü bir oksidan olduğu ifade edilmiştir (6, 11). Zararlı etkilerine karşın NO'nun antioksidan özellikler gösterdiği de tespit edilmiştir. NO'nun hemoproteinlerin hidrojen peroksid (H_2O_2) tarafından tahribini engellediği ve Fenton tipi oksidasyon reaksiyonlarını ortadan kaldırdığı belirtilmiştir. Dolayısıyla NO'nun lipid peroksidasyon reaksiyonlarında zincir kırıcı antioksidan olduğu ve nöroprotektif bir etki gösterdiği ileri sürülmektedir (2, 11).

Serbest radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için, organizmada birçok antioksidan savunma mekanizması bulunmaktadır. Hücre membranlarında yer alan, en çok bilinen ve en önemli temizleyici antioksidan, vitamin E'dir. İnsanlarda vitamin E eksikliğinin nörolojik fonksiyon kaybı ve eritrositlerin yaşam süresinin kısalması da dahil, birçok bozukluğa neden olduğu bildirilmiştir (5). Araştırmalar kronik vitamin E eksikliğinde biyokimyasal, nörolojik ve oftalmolojik anormalliklere sıkça rastlandığını ve vitamin tedavisiyle bu anormalliklerin düzeldiğini ortaya koymaktadır (15, 16).

Görsel sistemde de bulunan NO'nin retinadan görme korteksine kadar bütün görsel işlemleri etkilemesi beklenir. Ancak, yaşlanmaya paralel olarak oluşan görsel sistem değişikliklerinde rolünün ne olduğu henüz bilinmemektedir. Bu soruyu aydınlatmak amacıyla planlanan çalışmamızda, bu değişiklikleri saptamak için görsel uyarılma potansiyelleri (VEPs) kullanılacaktır. Zira bu potansiyellerin görsel sistem değişikliklerini gösteren güvenilir ve duyarlı bir yöntem olduğu çok sayıda çalışmada ortaya konmuştur (17). Birçok faktörün etkileri olmakla birlikte, VEP'leri etkileyen faktörlerden birinin de yaş olduğu bilinmektedir. Yaşlanmayla birlikte VEP'lerin latenslerinin uzadığı ve görsel bilginin iletiminin yavaşladığı saptanmıştır (18). Ayrıca VEP'lerin vitamin E eksikliğine bağlı komplikasyonlardan da etkilendiği gözlenmiştir (19). Ancak dışardan vitamin E verildiğinde, VEP'lerde yaşa bağlı olarak ortaya çıkan değişikliklerin bundan nasıl etkilendiği bilinmemektedir.

NO'nin serbest radikal ve oksidan özelliği dikkate alındığında yaşlanmayla oluşan VEP değişikliklerini arttıracığı, ancak antioksidan özelliği nedeniyle aksine oluşan VEP değişikliklerini düzeltereği beklenebilir. Bu soruyu aydınlatmak amacıyla planlanan çalışmamızda, NO sentezinin hammaddesi olan L-Arginine aminoasidi ve NOS inhibitörü L-NAME kullanılarak VEP'lerin yaşa bağlı değişikliklerindeki etkileri incelenmiştir. Diğer yandan, antioksidan olan vitamin E verilerek VEP'ler üzerindeki yaşa bağlı değişikliklerde lipid peroksidasyonun rolü ve NO ile olan ilişkisi de ortaya konulabilecektir.

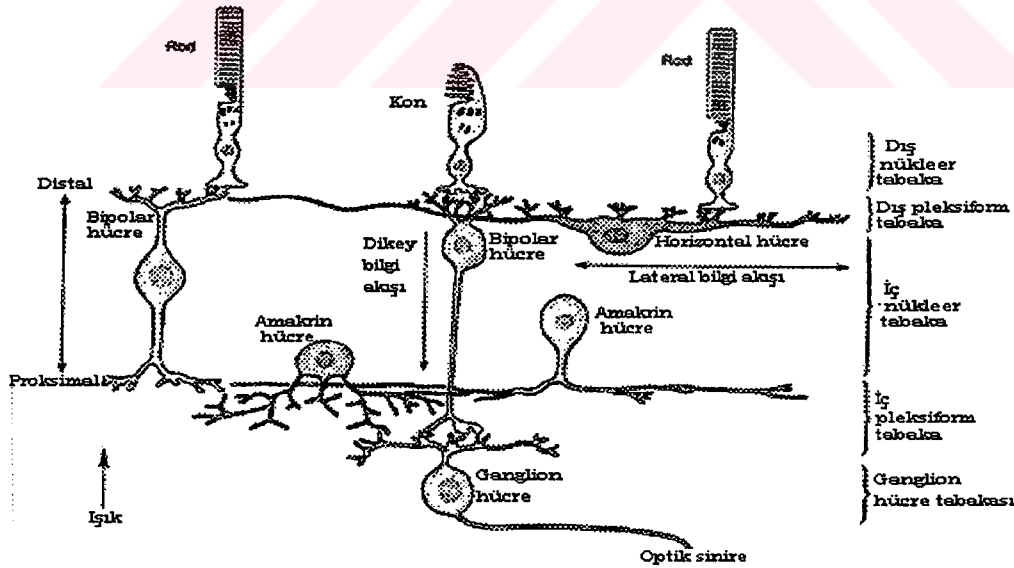
GENEL BİLGİLER

2.1. GÖRSEL SİSTEM ve GÖRSEL UYARILMA POTANSİYELLERİ (VISUAL EVOKED POTENTIALS)

2.1.1. Görsel Sistem

Görsel sistem duyu sistemlerinin en kompleks olanıdır. İşitsel sinir 30000 civarında lif içermesine karşın, optik sinir yaklaşık 1 milyon lif içerir (20). Bu sayı spinal kordon içine giren tüm dorsal kök liflerinden daha fazladır. Görsel sistemde bilginin işlenmesi retinada başlar. Tunica nervosa da denilen retina, göz yuvarlağının arka tarafındaki en iç tabakayı oluşturur. Retina renkli görmeden sorumlu koni hücrelerini ve temel olarak karanlıkta görmeden sorumlu çubuk hücrelerini (basiller) içermesi nedeniyle gözün ışığa duyarlı bölümüdür. Görmenin nöral yolağı çubuk ve koniler ile başlar. Bu fotoreseptörler birbirleriyle ve ikinci düzeydeki nöronlarla etkileşime girerek görsel bilgiyi optik sinir aracılığıyla lateral genikulat çekirdeğe (LGN), oradan da ilgili beyin bölgesi olan görsel kortekse ileten yapılardır (20, 21).

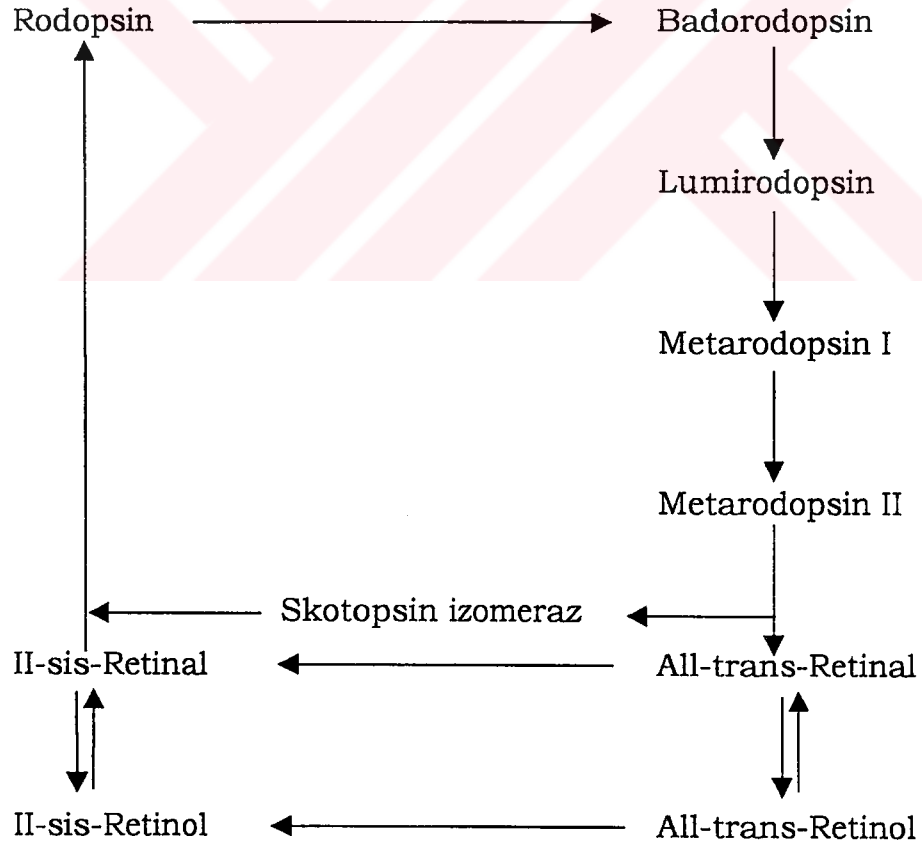
Retinada koni ve çubuklar gibi görme reseptörlerinin dışında 4 çeşit nöron daha bulunur (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Retinanın üç nükleer tabakası üç temel fonksiyonel nöron sınıfı oluşturur; dış nükleer tabakada fotoreseptörler, iç nükleer tabakada internöronlar ve ganglion hücre tabakasında ganglion hücreleri. Dış pleksiform tabakada internöronlar kendi aralarında sinaptik bağlantı yaparken, iç pleksiform tabakada bipolar, amakrin ve ganglion hücreleri bağlantı yaparlar.

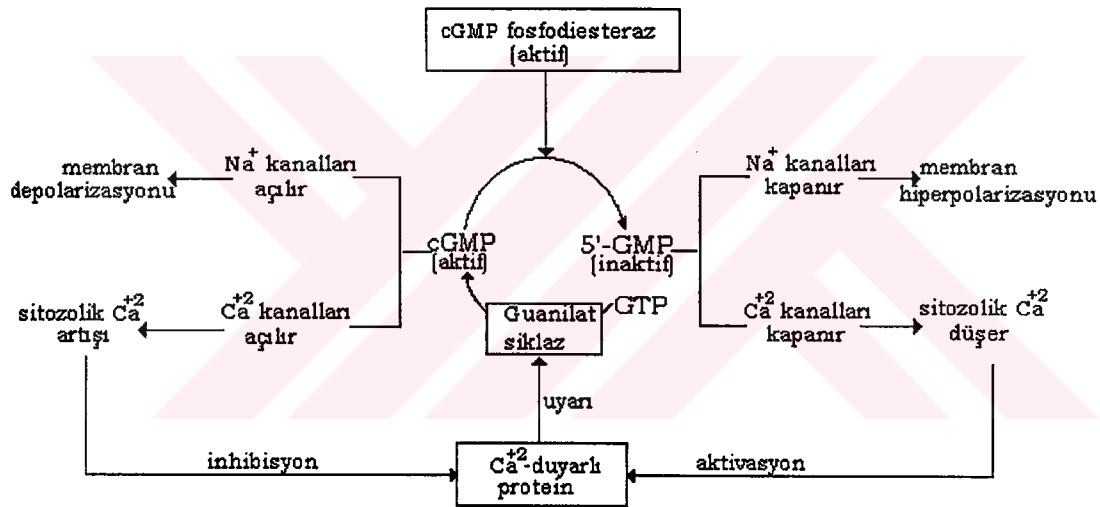
- 1) Bipolar hücreler
- 2) Horizontal hücreler
- 3) Amakrin hücreler
- 4) Ganglion hücreler

Fotoreseptörler bipolar hücrelerle sinaps kurmuşlardır. Bipolar hücreler de retinanın bir bölümünden diğer bölümlerine yatay olarak bilgi aktaran horizontal hücreler ve ganglion hücrelerle sinaps yapmışlardır. Amakrin hücreler ise, bipolar ve ganglion hücreler ile sinaps yaparlar. Fotoreseptörler ışığı absorbe eden pigmentler içerirler. Retinada biri basillerde (rodopsin) diğerleri konilerde olmak üzere dört farklı fotopigment vardır. Her fotopigment, opsin denilen ve bir kromofor (chromophore) molekülü bağlayan integral proteinlerden birini içerir. Fotopigmentin asıl ışığa duyarlı kısmı olan kromofor, bir vitamin A varyantı olan retinal'dir. Retinal'e gelen ışığı filtre eden opsin her fotopigment için farklıdır. Bu farklı opsiner fotopigmentlerin görünür spektrumun farklı kısımlarında ışığı absorbe etmelerini sağlarlar (20, 21, 22, 23).



Şekil 2.2. Işık etkisinde Rodopsin döngüsü

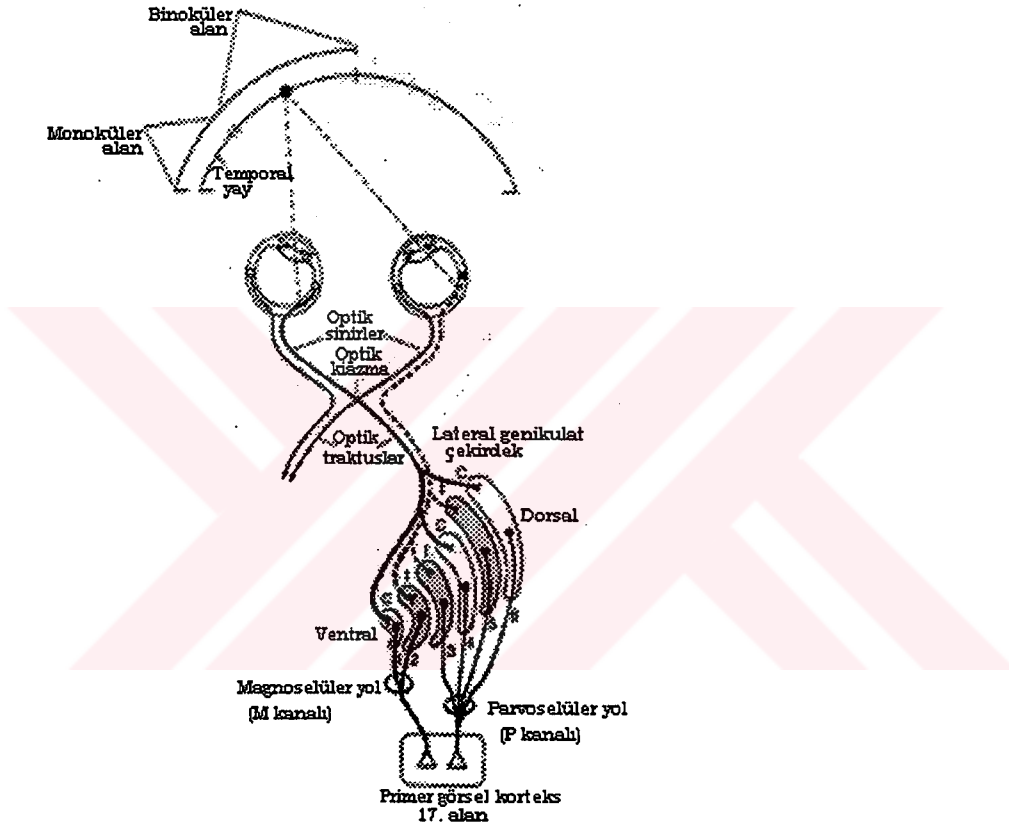
Genel olarak fototransdüksiyon birkaç aşamadan oluşur: (1) Işığın emilmesi rodopsindeki 11-*cis* retinali *all-trans* konfigürasyonuna çevirir (Şekil 2.2). (2) Aktive olmuş rodopsin (metarodopsin II) cGMP fosfodiesteraz (PDE)'yi aktif hale getiren G-proteinini (transdusin) etkin hale getirir. (3) Bu enzim siklik GMP'yi hidrolize ederek konsantrasyonunu düşürür. (4) cGMP kapılı kanallar (Na^+ ve Ca^{+2}) kapanır ve fotoreseptör hiperpolarize hale gelir. Hiperpolarizasyon fotoreseptörün ucuna pasif olarak iletilir ve hücreden nörotransmitter salınmasını düşürür. (5) Daha sonra kalsiyum kanallarının kapanması nedeniyle sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonundaki düşüş, kalsiyuma duyarlı proteini aktifleştirerek, guanilat siklaz (GC)'a bağlanmasına ve daha fazla cGMP üretilmesine neden olur (Şekil 2.3). Bu da Na^+ ve Ca^{+2} kanallarının tekrar açılmasını sağlar. Böylece hücreler tekrar dinlenim durumuna döner (21, 24).



Şekil 2.3. Ca^{+2} -duyarlı protein, guanilat siklaz ve kalsiyumun çubukların ışığa adaptasyonunda rolü.

Bu şekilde oluşan sinyaller en son iki tip olduğu saptanan ganglion hücrelerine ulaşırlar. Bunlardan ilki farklı türde konilerden gelen yanıtları toplayan, hareket ve üç boyutlu görme ile ilişkili olan büyük ganglion hücreleri (Magno=M), ikincisi ise renk, yapı ve ince detaylarla ilgili olan küçük ganglion hücreleri (Parvo=P)'dir (21, 25, 26, 27). Bu ganglion hücrelerinin aksonları optik sinir liflerini oluşturur ve retinadan aldıkları impulsu merkezi sinir sistemine iletirler. Retinanın nazal yarımından gelen lifler optik kiazmada çaprazlaşarak, temporal yarımından gelen lifler ise optik kiazmada çaprazlaşma yapmadan dorsal lateral genikülat nükleus'a (dLGN) girerler ve sinaps yaparlar. Bu nükleus altı nükleer tabakadan

oluşmuştur. 2 3 ve 5'inci tabakalar sinyalleri retinanın temporal bölgesinden alırken 1, 4 ve 6'ıncı tabakalar sinyalleri karşı gözün nazal retinasından alırlar (23). Ayrıca LGN'da P hücrelerinden sinyalleri alan parvoselüler (3 ve 4 üncü tabakalar), M hücrelerinden sinyalleri alan magnoselüler tabaka (1 ve 2'inci tabakalar) ve bu iki tabaka arasında kalan muhtemelen dendritleri parvoselüler tabakaya uzandığı için, P hücrelerinden sinyaller alan interlaminar tabaka olarak kabaca üç bölge ayrıt edilir (Şekil 2.4) (23, 26, 28).



Şekil 2.4. Lateral genikulat nükleus görsel bilginin işlendiği temel subkortikal bölgedir.

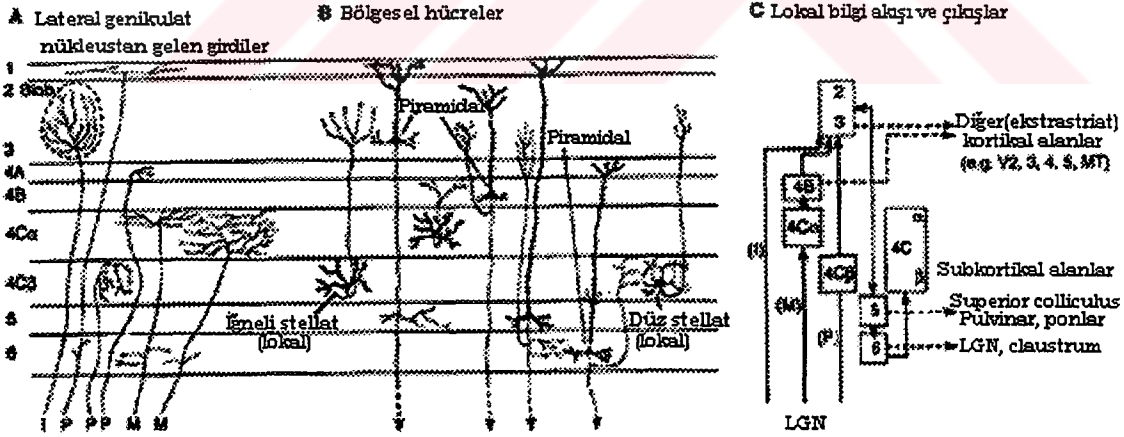
dLGN iki temel işlev görür.

1) Optik traktusun görsel bilgisini, optik radyasyon (Genikülokalkarin traktus) yolu ile görme korteksine iletmek.

2) Görsel bilgi sinyallerinin ne kadarının kortekse geçeceğini kontrol etmek. Bu işi yaparken iki temel kaynaktan sinyal alır. İlki primer görme korteksinden lateral genikülat'a uzanan kortikofügal lifler, ikincisi ise mezensefalon'un retiküler alanlarından gelen lifler. Bunların uyarımı ile dLGN görsel bilginin kortekse geçişini kontrol eder.

Dorsal lateral genikülat nükleus'tan çıkan görsel bilgi sinyalleri optik radyasyon yolu ile oksipital lob'un kalkanin bölgesindeki primer görme korteksine ulaşır. Bu bölge altı tabakadan oluşmuştur. dLGN'tan gelen aksonlar genellikle 4 üncü tabakada sonlanır. Bu tabakada a, b, c-alfa, c-beta olmak üzere 4 farklı katman ayırt edilir. dLGN'un parvoselüler tabakasından gelen aksonlar katman 4c'nin derin bölgelerinde sonlanırken, magnoselüler tabakadan gelen aksonlar ise genellikle daha yüzeysel bölümlerinde sonlanır (26). Yine dLGN'daki interlaminer alanlardan gelen aksonlar ise, bu bölgede mitokondrial bir enzim olan sitokrom oksidaz'ı bol miktarda içeren ve renk damlaları (blob'lar) adı verilen bölgelerde sonlanırlar. Primer görme korteksinde yer alan bu bölgenin renkli görme ile ilişkili olduğu tesbit edilmiştir (29, 30, 31). Bunlara ek olarak görme liflerinin beynin farklı bölgelerine (Şekil 2.5);

- 1) Sirkadyen ritmin kontrolünü sağlamak üzere hipotalamusun suprakiazmatik nükleusuna,
- 2) Gözün odaklanması ve göz bebeğinin ışık refleksi sağlamak için pretektal çekirdeklere,
- 3) İki gözün hızlı doğrusal hareketlerini kontrol etmek için süperior kollikulusa,
- 4) Vücudun bazı davranışsal işlevlerini kontrole yardım etmek için talamusun ventral lateral genikülat nükleusuna gittiği gösterilmiştir (23).



Şekil 2.5. Primer görsel korteksin farklı anatomik tabakaları, girişleri ve çıkışları. Parvoselüler (P), magnoselüler (M) ve interlaminer (I).

Diğer duyu sistemlerinin kortikal temsilinde. olduğu gibi görme korteksi de primer ve sekonder olmak üzere ikiye ayrılır.

Primer görme korteksi : Primer görme korteksi kalkarin fissür alanında her bir korteksin medial bölümünde oksipital kutba doğru uzanır. Bu bölge Brodmann'ın 17'inci kortikal alanı ile aynı yerdedir ve 1. görme alanı (V-1) olarak adlandırılır. Aynı zamanda çizgili görünüşünden dolayı striat korteks de denir.

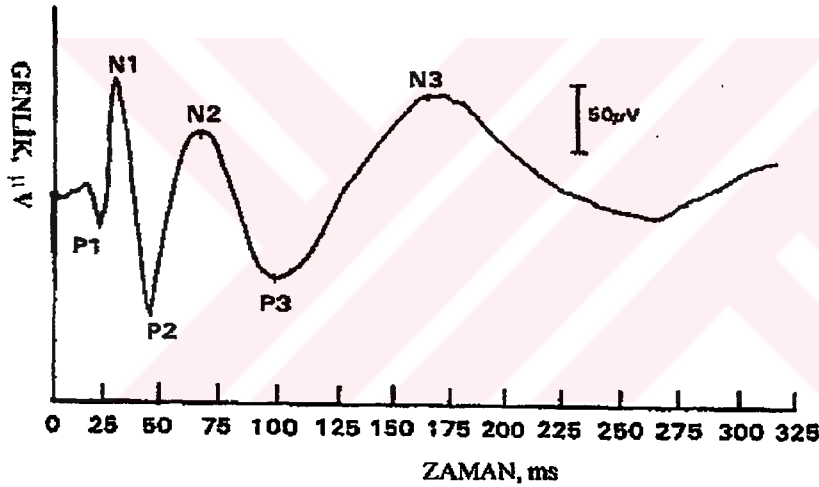
Sekonder görme korteksi : Bu alana görsel asosiyasyon alanları da denir. Primer görme korteksinin lateral, anterior, süperior ve inferiorunda uzanır. Görsel anlamların analizi için primer görme korteksinden gelen sinyallerin iletildiği alanlardır. Primer görme korteksini çepeçevre saran Brodmann'ın 18'inci alanı 2.görme alanı (V-2) olarak adlandırılır. Ayrıca V-3, V-4 gibi yarım düzineden fazla uzak sekonder görme alanları vardır (23).

2.1.2. Görsel Uyarılma Potansiyelleri (Visual Evoked Potentials)

Belirli bir uyarana cevap niteliğinde ortaya çıkan ve beyinden kaydedilen, ölçülebilir elektriksel büyüklüğe “Uyarılma Potansiyeli (EP)” denir. Uyarılma potansiyelleri ilk kez 1939'da Davis tarafından kaydedilmiştir. Tek bir uyarılma potansiyeli kaydı, uyarının beyinde oluşturduğu elektriksel değişikliklerin, uyarı olmaksızın süregiden kendiliğinden aktivite üzerine binmesinden oluşur. Başka bir deyişle, biri uyarıya bağlı, diğeri uyarıdan bağımsız iki elektriksel aktivite, bir tek uyarılma potansiyelini oluşturduğundan, böyle bir kayıta uyarının oluşturduğu değişimleri gözlemek mümkün olmamıştır. Ancak, daha sonraki yıllarda bilgisayar teknolojisinin gelişmesiyle birlikte, ilk olarak 1954 yılında Dawson uyarılmış potansiyellerin spontan EEG zemin aktivitesinden ayrılmasını sağlayan klasik ortalama yöntemini kullanmıştır. Bu yöntem sayesinde ses, ışık, dokunma gibi spesifik uyarıların tekrarlanmasıyla oluşan bu tip uyarılmış potansiyellerin daha belirgin bir şekilde kaydedilmesi sağlanmıştır. Uyarılma potansiyellerinin EEG zemin aktivitesinden ayrılmasına olanak veren bilgisayardaki bu gelişmeler ve ortalama yöntemlerinin ortaya konması ile, VEP duyusal olarak aktif ve uyanık insanda görsel sistem fizyolojisinin çalışıldığı birkaç yoldan biri haline gelmiş ve görsel yollardaki patolojilerin teşhis edilmesine olanak sağlamıştır (32, 33, 34). VEP artık günümüzde görme keskinliğini belirleme, optik sinir hastalıklarının, ambliyopinin, renk körlüğünün ve alan bozukluklarının teşhisi gibi birçok görsel sistem patolojisinin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

VEP oluşturmak için kullanılabilen iki tip uyarı vardır: Kısa süreli ve değişik şiddetlerde şekilsiz ışık (flaş) ve şekilli uyarılar. Flaş ışığının kısa aralıklarla tekrarlanması ile kaydedilen potansiyellere

Flaş Uyarılma Potansiyelleri (FVEP) denir. Şekli uyaran olarak genellikle TV ekranında oluşturulmuş birbirinin tamamlayıcısı olan (ör.dama tahtası) şekiller kullanılır. Bu şekillerin dönüşümlü olarak yer değiştirmesi ile kaydedilen potansiyellere Patern Değişmeli Görsel Uyarılma Potansiyelleri (PR-VEP) denir. Görsel uyarımı takiben ortaya çıkan dalgalar negatif (N) ve pozitif (P) olarak gösterilmektedirler. Tipik bir VEP'ten söz etmek mümkün değildir: Çünkü, VEP dalgasının biçimi, her tepenin zamanlaması ve derinliği ve potansiyelin süresi birçok koşula bağlıdır. Kullanılan uyarının yanısıra, frekansı, süresi, şiddeti, dalga boyu, büyüklüğü, optik kalitesi, elektrotların yerleşimi, yaş, cinsiyet ve vücut sıcaklığı da latens ve genlikleri etkiler (34, 35, 36). Ancak, görsel uyarılma potansiyelleri ortaya çıkış zamanlarına göre, üç gruba ayrılarak incelenmiştir. Uyarıyı izleyen ilk 10 msn'lik süre içinde oluşan dalgalara kısa latensli (erken) VEP'ler, uyarıdan sonraki 10 ile 50 msn içinde oluşan dalgalara orta latensli VEP'ler, 50 ile 300 msn içinde oluşan dalgalara da uzun latensli VEP'ler denir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Görsel uyarılma potansiyeli ve komponentleri.

Yapılan çalışmalarda, VEP'lerin P1 bileşeninin 17. alanın derin tabakalarından kaynaklandığı ve tabaka IV'teki depolarizasyon (EPSPs) sonucu ortaya çıktığı tespit edilmiştir. N1 bileşeninin ise genikulokortikal girişlerin 4. tabakadaki satelat hücrelerini depolarize etmesi sonucu ortaya çıktığı belirlenmiştir (37, 38). Bununla birlikte, P2 bileşeninin GABA-aracılı yüzeysel hiperpolarizasyonu (IPSPs) yansıttığı ileri sürülmektedir (39). Diğer yandan, N2 ve N3 bileşenlerinin yine yüzeysel kortikal tabakalardan kaynaklandığı belirtilmiştir. N3 jeneratörlerinin yüzeysel tabakalar boyunca dik olarak yayıldığı ve bu bileşenin, gövdeleri derin tabakalarda bulunan nöronların apikal dendritleri boyunca oluşan depolarizasyonu yansıttığı ifade edilmiştir(39).

Klinik çalışmalarda PR-VEP'ler tercih edilmektedir. Çünkü bu potansiyeller görsel yol lezyonlarını göstermede daha duyarlı olup, denekler arasında çok fazla değişkenlik göstermezler. Ayrıca, görsel sistemin temel fonksiyonlarından biri de karşıtlıkları ve sınırları analiz etmek olduğundan, şekilli uyarının bazı özellikleri değiştirilerek daha fazla bilgi elde edilebilmektedir. PR-VEP'ler insanda temel olarak fovea ve konların aktivitesini göstermektedir(40). Ancak, PR-VEP'lerde yaklaşık 100 ms latenste oluşan P100 bileşeninin optik nöropatilerde, retrobulbar nöropatilerde ve multipl sklerozda (34, 41) daha klinik semptomlar ortaya çıkmadan uzaması, bu hastalıkların erken teşhisi yönünden önemli bir parametre olarak kabul edilmesine yol açmıştır.

Flaş uyarılma potansiyelleri insanlarda nadir kullanılmasına karşın, hayvanlarda tercih edilen bir yöntemdir. Özellikle sıçanların görsel sisteminin, insanlarınkine benzemesi nedeniyle sıçanlardan kaydedilen VEP'lerin toksik ajanların insan sağlığı üzerine olan olumsuz etkilerini yansıtmada iyi bir model olduğu saptanmıştır (42). VEP'lerin nörotoksik çalışmalarda kullanılması, ilk olarak karbonmonooksid'in (CO) merkezi sinir sistemine etkilerinin incelenmesi amacıyla başlamıştır. Bugün bilinen 36 adet nörotoksik maddenin VEP'leri etkilediği tesbit edilmiştir. Bunların içerisinde kurşun, kadmiyum, karbondisülfid, CO, civa, toluen gibi nörotoksik ajanlar yer almaktadır (42, 43, 44, 45). Bunun yanında VEP'in yaşlanmayla birlikte görsel sistemde oluşan değişiklikleri de yansıttığı bildirilmiştir. Yaşlanmayla birlikte VEP latenslerinin uzadığı ve görsel bilginin iletiminin yavaşladığı gözlenmiştir(19, 46).

2.2. YAŞLANMA

Yaşlanma zaman içerisinde oluşan doğal bir süreçtir. Yaşlanmayla birlikte öğrenme, hafıza ve motor kontrol gibi beyin fonksiyonlarında ve sinaptik plastisitede azalma görülürken, hücresel iletişimin, iskelet dokusundaki kemik kütlelerinin ve bağ dokusundaki elastik liflerin azaldığı ve dendritik uzantılarda kayıplar olduğu tespit edilmiştir (4, 47, 48).

Yaşlanmayla birlikte merkezi sinir sisteminde de bir takım değişiklikler meydana gelmektedir. Yaşamın 90. yılında beyin ağırlığının %10 azaldığı ve beynin gri cevherinde beyaz cevherden daha fazla kayıp olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, sulcus genişliklerinde ve beyin zarları ile beyin arasındaki boşluklarda artma, giruslarda düzleşme, ventriküllerde genişleme olurken, nöron ve sinaps sayılarında azalma olduğu gözlenmiştir (20). MSS'deki bu değişikliklerin dışında, bazal metabolizma, kardiyak çıkış ve solunum kapasitesi gibi birçok fizyolojik fonksiyonların da azaldığı görülmüştür (1, 49).

Korteksteki yaşa bağlı değişiklikler, vücudun ilgili fonksiyonlarını ve davranışlarını etkilemektedir: Kognisyon ve kişilikte değişiklikler, işitme, görme ve hafızada kayıplar olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, melanin içeren nöronların yaşa bağlı aşırı azalmasından dolayı REM uykusunun kısaldığı vurgulanmıştır (20).

Araştırmalar yaşlanma sürecinden en çok etkilenen parametrelerden birinin de nörotransmitterler olduğunu göstermiştir (48, 50, 51, 52, 53, 54). Yaşlanmayla beraber nörotransmitterlerin sentezinde, katabolizmasında ve reseptör aktivitesinde azalma olduğu bildirilmiştir. Yaşa bağlı olarak, dopamin sentezinin azaldığı ve yıkımının arttığı, asetilkolin (Ach) üretiminin ve kolinerjik reseptörlerin bağlanma kapasitelerinin azaldığı görülmüştür. Ayrıca, muskarinik ve nikotinik reseptörlerin de sayısında azalma belirlenmiştir (50, 51, 52, 53, 55, 56).

Öğrenme ve hafızada rolleri olan serotonin ve glutamat da yaşlanmadan etkilenmektedir. Yaşlanma sonucu serotonin dönüşümünün arttığı, reseptör sayısında düşme olduğu, glutamatın ise azaldığı görülmüştür. Yaşlanmaya bağlı olarak, glutamat reseptörlerinden biri olan N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörünün sayısında ve NMDA reseptöründe glisin bağlanma bölgelerinin duyarlılığında azalma olduğu bildirilmiştir (50, 51, 52, 57).

Sonuç olarak, yaşlanmanın nörotransmitterlerde yol açtığı değişiklikler görsel sistemde, öğrenmede ve hafızada önemli bozukluklara neden olmaktadır.

2.2.1. Yaşlanmanın Hücresel ve Moleküler Mekanizması

Yaşlanmayı açıklamaya çalışan iki önemli hipotez ileri sürülmüştür: Birincisi, yaşlanmanın genetik olarak programlanmış aktif bir olay olduğunu belirtmektedir. İkincisi ise, yaşlanmanın DNA, RNA, protein ve lipid gibi hücresel yapılarda, çevresel etkenler ve yetersiz tamir mekanizmaları sonucu, hataların pasif birikiminden kaynaklandığını ileri sürmektedir (1, 58, 59).

Genetik olarak düzenlenme teorileri

Bu teori yaşlanmaya;

- 1) kodon sınırlaması,
- 2) çok kopyalı (multicopy) deoksiribonükleik asid (DNA) dizilerinin inaktivasyonu,
- 3) telomerlerin kısalması,

4) terminal farklılaşma
gibi etkenlerin yol açtığını ileri sürmektedir (1).

Hata Teorisi

1) Metabolik oran: Düşük metabolik orana sahip hayvan türlerinin daha uzun yaşaması ve metabolik oran ile serbest radikaller arasında güçlü bir ilişki olduğunun saptanması bu hipotezi destekleyen bulgular olmuştur (1, 3):

2) Somatik mutasyonlar: Hücrenin çekirdeğinde bulunan bazların, spontan mutasyonlar oluşturabilecek veya DNA'da daha ciddi hasarlara yol açabilecek fiziksel ve/veya kimyasal etkilere sürekli maruz kaldığı ifade edilmiştir. Yaşlanmayla birlikte DNA hasarının ve mutasyonların arttığı gösterilmiştir (1, 4, 60).

3) Çapraz bağlar: Yaşlanma sonucu hücre içi ve hücre dışı makromoleküler çapraz zincirlerin arttığı saptanmıştır (1, 58, 59).

4) Protein sentezindeki hatalar: Protein sentezi aşamasında transkripsiyona göre daha fazla hata görülür. Sentezlenen bu proteinlerin enzim olması durumunda, hücre yaşlanmasına neden olan fonksiyonel değişikliklerin artacağı belirtilmiştir (4).

5) Protein yıkımının değişmesi: Bütün organizmalarda yaşa bağlı olarak protein yıkımının azalması, anormal proteinlerin hücrede birikmesine neden olur. Bu da genetik manipulasyonları etkiler (1).

6) Bağışıklık sisteminin zayıflaması: Yaşlanmayla birlikte; i) immün cevabın zayıflamasından dolayı bulaşıcı hastalıklara yakalanma olasılığının artması, ii) tanıma işleminde özgülüğün azalmasından dolayı, otoimmün hastalıklara bağlı hasarın artması sonucu kendini tahrip olgusuna rastlandığı bildirilmiştir (4).

7) Homeostatik regülasyonun bozulması: Merkezi metabolik süreçlerde homeostatik regülasyonun ileri derecede kaybının, yaşlanmanın potansiyel nedeni olduğu ileri sürülmüştür (4).

8) Toksik metabolitlerin birikmesi: Bu hipoteze göre; vücutta oluşan toksik metabolitlerin hücre ve doku fonksiyonlarında yaşa bağlı değişikliklere neden olduğu ifade edilmiştir (1, 4).

9) Serbest radikaller: Birçok araştırmacının bulguları ile desteklenen “serbest radikal” teorisi yaşlanmanın etyolojisini açıklayan en güncel ve önemli teorilerden biridir. Yaşlanmanın mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte; bu teoriye göre, serbest radikallerin DNA'da yol açtığı hasarların birikmesi sonucu yaşlanmanın oluştuğu savunulmaktadır(1, 2, 4).

Serbest radikallerin hedefleri içerisinde nükleik asitler, proteinler, karbohidratlar ve lipidleri yer almaktadır. Ancak biyolojik membranlarda lipid oranı yüksek olduğundan, serbest radikallerden en çok bu yapılar etkilenecektir. Bu da doğrudan membranın yapısını etkileyerek fonksiyonunda önemli değişikliklere yol açar. Lipid peroksidasyonu, biyolojik membranların fosfolipidlerindeki veya trigliseridlerdeki doymamış yağ asitlerinin serbest oksijen radikaline maruz kalmasının karakteristik bir sonucudur. Lipid peroksidasyonun son-ürünleri olan “ceroid” ve “lipofuscine” pigmentlerinin, yaşlanmanın biyolojik belirteçleri olduğu ileri sürülmektedir(4). Lipid peroksidasyonun kimyasal indeksi olan malondialdehid (MDA)'in de, yaşlanmayla arttığı bulunmuştur (2, 61, 62). Yaşa bağlı olarak , doymamış yağ asitlerinin peroksitlenme özelliklerinin artması ve antioksidan savunma sistemlerinin aktivitelerinin azalması sonucu lipid peroksidasyonun arttığı ileri sürülmüştür (1, 2, 63, 64).

2.3. SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller bağımsız olarak bulunabilen, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip ve genellikle oldukça reaktif kimyasal türlerdir. Bu kimyasal yapılar, rastlantısal bir şekilde metabolizmanın yan ürünleri olarak veya belli bir amaca yönelik olarak(Ör. Fagositoz), hücre içerisinde sürekli üretilirler. Serbest radikaller üç yoldan oluşabilirler; (i) normal bir molekülün kovalent bağının homolitik ayrılmasıyla, (ii) normal bir molekülün bir elektron kaybetmesiyle, (iii) normal bir moleküle bir elektron eklenmesiyle (5).

Süperoksid Anyonu (O_2^-)

Süperoksid (O_2^-), oksijenin 2p orbitallerinden birine bir elektron girdiği zaman oluşur. Bu molekül güçlü bir indirgeyicidir ve

sitokrom c ve ferrik-EDTA gibi çeşitli demir komplekslerini indigeyebilmektedir.

Süperoksid anyonu enzimatik olmayan spontan dismutasyonun yanısıra, süperoksid dismutaz enzimi aracılığıyla enzimatik yoldan da ortamdan temizlenmektedir (6, 65, 66).



Süperoksid anyonu hücre membranlarından, -muhtemelen iyon kanallarını kullanarak- çok az çıkarsa da membranları kolay geçemediği için zararı en az olan radikaldir (2). Çoğunlukla indirgeyicidir. Süperoksid, hidrojen peroksid kaynağı olarak görev yapar.

Hidrojen Peroksid (H₂O₂)

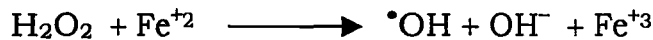
Hidrojen peroksid geçiş grubu metal iyonları yokluğunda, göreceli olarak kararlı bir yapıya sahip olan, zayıf bir indirgeyici ve yükseltgeyicidir. Molekül yüksüz bir kovalent yapıya sahiptir. Düşük elektriksel yükü ve non-iyonize özelliklerinden dolayı hücre membranlarından hızlı bir şekilde geçer. Geçiş grubu metal iyonlarının varlığında yüksek derecede reaktif serbest radikalleri oluşturabilmesi, evrimsel olarak bir savunma sistemini gerekli kılmıştır (2, 6, 67). Hidrojen peroksid katalaz, glutatyon peroksidaz (selenyum içeren), ve belli bazı peroksidazlar gibi enzimlerin aktivitesiyle hücrelerden temizlenir (5, 6, 68).

Hidroksil Radikali(•OH)

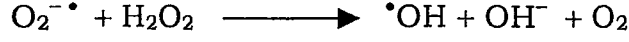
Hidroksil radikali, ilk olarak 1934 yılında Haber ve Weiss adlı araştırmacılar tarafından saptanmıştır. Hücre içerisinde uzak mesafelere diffüze olamamasına ve yarılanma süresi çok kısa olmasına karşın, olduğu yerin çevresinde büyük zararlara yol açmaktadır Çünkü bu molekül son derece reaktif, oksidan bir radikaldir (5, 6, 69).

Hidroksil radikali hücrede çeşitli yollardan oluşmasına karşın, önemli iki biyolojik kaynağı vardır;

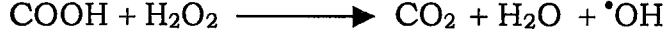
Fenton reaksiyonu



Haber – Weiss reaksiyonu



Bunların dışında, radikal tepkimeleri sonucu oluşmuş bir organik radikal de, hidrojen peroksit ile tepkimeye girerek $\cdot\text{OH}$ radikali oluşumuna neden olabilir (2).

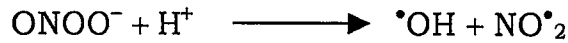


Ozon (O₃)

Soluk mavi renkte bir gaz olan ozon, stratosferde solar radyasyona karşı önemli bir koruyucu kalkan (global antioksidan) sağlar. Fakat, toprak seviyesinde toksik ve istenmeyen bir kirleticidir. Akciğerleri son derece tahrip ettiği, proteinler, DNA ve lipidleri hızlı bir şekilde oksitlediği ileri sürülmektedir (6, 70).

Nitrojen Oksitleri

Nitrik oksid (NO^\cdot) ve nitrojen dioksit (NO_2^\cdot) eşleşmemiş tek sayıda elektronlar içermektedirler. Bu yüzden ikisi de serbest radikaldir. Koyu kahverengi zehirli bir gaz olan nitrojen dioksit, güçlü bir oksidandır. Bunun yanında nitrik oksid, renksiz bir gaz ve zayıf bir indirgeyici ajandır(6, 64, 67, 71).



2.3.1. Serbest Radikallerin Hücrelere Etkisi

Serbest radikaller hücrenin temel yapı taşları olan lipidler, proteinler ve karbohidratlara zarar vermektedir. Bunun yanında serbest radikallerin DNA'da ciddi hasarlara sebep olduğu belirtilmiştir.

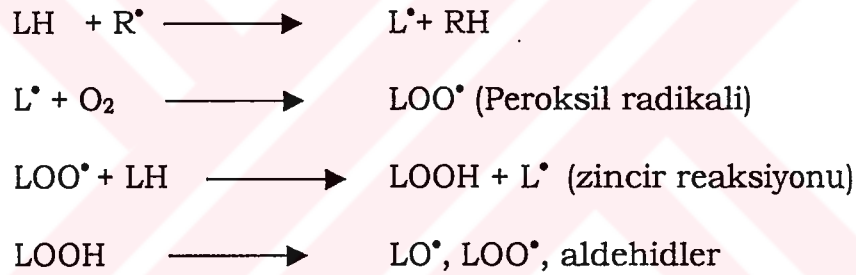
Serbest Radikallerin Proteinlerle Reaksiyonu

Peptid ve protein makromoleküllerinin yapı taşları olan aminoasitler de, serbest radikallerin hedefleri içerisinde.

Aminoasidlerin oksidasyonu proteinlerde de fiziksel değişikliklere neden olmaktadır. Bu fiziksel değişiklikler üç gruba ayrılabilir; fragmentasyon, agregasyon ve proteolitik yıkıma duyarlılık (2, 72, 73, 74).

Serbest Radikallerin Lipidlerle Reaksiyonu

Poliansature yağ asitlerinin (PUFAs) oksidatif yıkımı olan lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin poliansature yağ asitlerinin (LH) yan zincirindeki metilenik karbonlardan hidrojen atomu koparmasıyla başlar. PUFA'nın oksidasyonu, bir oksijen alarak çabucak peroksil radikaline (LOO[•]) dönüşebilen yağ asidi radikalinin (L[•]) oluşmasına yol açar. (5, 75, 76). Bu peroksil radikali, membrandaki komşu yan zincirlerden hidrojen atomlarını koparıp peroksidatif zincir reaksiyonunu yaymaktadır. Yan zincirlerden hidrojen atomlarının çıkarılması ile lipid hidroperoksidleri (LOOH) oluşmaktadır. Peroksidasyon bir kere başladıktan sonra otokatalitik olarak yayılabilmektedir(5, 75, 76, 77, 78).



Lipid hidroperoksidler de (LOOH) yıkılarak LO[•], LOO[•] gibi radikaller ve aldehidlerin oluşmasına neden olurlar. Lipid hidroperoksid yıkım ürünleri membran komponentlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmalarına neden olmakta ve deformabilite, iyon transportu, enzim aktivitesi, hücre yüzey determinantlarının agregasyonu gibi iç membranın bazı özelliklerini değiştirmektedir. Ayrıca, diffüze olabildiklerinden, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girmekte ve mutajenik, genotoksik ve karsinojenik etki göstermektedirler (78, 79, 80).

Karbohidratların Peroksidasyonu

Yapılan çalışmalarda, α-hidroksialdehid yapıya sahip karbohidratların, metal iyonlarının varlığında hızlı bir şekilde otooksidasyona uğradıkları ve bunun sonucunda dikarbonil bileşikleri ve hidrojen peroksit oluşturdukları belirtilmiştir(2, 81).

Genomik ve Hücresel Yapıların Modifikasyonu

Deoksiribonükleik asid hasarı, radyasyon ve kimyasallar gibi dış etkenlerin yanında, oksijen kaynaklı serbest radikaller gibi iç etkenlerin neden olduğu birçok faktörden kaynaklanmaktadır (2, 66, 82, 83).

2.4. ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ

Serbest radikallerin potansiyel zararlı etkilerini ortadan kaldıran maddelere genel olarak, antioksidan savunma sistemi denmektedir. Oksidatif strese karşı hücrel savunmadan sorumlu antioksidan sistemler, serbest radikaller kadar çeşitlidir (2, 84). Hücrelerin radikallerin zararlı etkilerinden korunması için, antioksidan savunma sistemi öğelerinin ortaklaşa çalışmaları gerekmektedir. Ayrıca bu savunma sisteminin öğeleri en etkin korumayı sağlamak için, stratejik olarak hücre içinde organellerde, yerleşmişlerdir. Örneğin süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidan enzimler sadece sitozolde değil hücre içi serbest radikallerin çoğunluğunun üretildiği yer olan mitokondride de lokalize olmuştur. Ayrıca, bu hücre içi antioksidan enzimler hücre dışı kompartmandaki antioksidan öğelerle de ilişki içerisindedir. Böylece hem hücre içi hem de hücre dışı radikal tehlikesi bu sistem öğelerinin birbirleriyle koordinasyonu sonucu ortadan kaldırılır (2,85,86,87,88).

Araştırmacılar antioksidan savunma sistemini genel olarak aşağıdaki gibi sınıflandırmışlardır;

I. Primer savunma:

1. Antioksidan enzimler : SOD, CAT ve peroksidazlar.
2. Antioksidan bileşikler : Vitamin E, vitamin C, vitamin A, glutatyon, ürik asit, bilirubin, v.s.

II. Sekonder savunma:

1. Lipolitik enzimler; fosfolipazlar.
2. Proteolitik enzimler; proteazlar, peptidazlar.
3. DNA tamir enzimleri; endonükleaz ekzonükleaz, ve ligaz (2, 89, 90, 91).

I. Primer savunma

i) Antioksidan Enzimler:

Süperoksit dismutaz (SOD)

Oksijenli solunum yapan tüm canlılarda bulunur ve temel görevi dismutasyon reaksiyonunu katalizlemektir.



Süperoksit dismutazlar yapılarında bulundurdukları metal iyonuna göre 3 sınıfa ayrılmıştır (2).

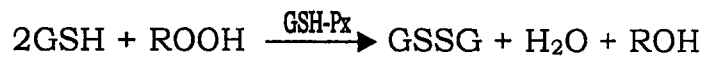
a) Bakır/çinko süperoksit dismutaz (Cu/Zn-SOD): Ökaryotik hücrelerin sitozolünde ve eritrositlerde bulunur. Mitokondrinin matriksi dışında hücrenin her organelinde bulunabilir (92, 93, 94, 95, 96).

b) Mangan süperoksit dismutaz (Mn-SOD): Mitokondri matriksinde lokalize olmuştur (66, 89).

c) Demir süperoksit dismutaz (Fe-SOD): *E.coli* gibi bakterilerde saptanmıştır.

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)

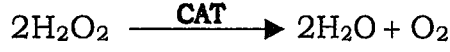
Birçok canlıda bulunan bu enzim, hücre içinde mitokondrial matriks ve sitozolde bulunur. Glutatyon peroksidaz organik hidroperoksidlerin ve hidrojen peroksid'in indirgenme reaksiyonlarını katalizler (2, 97).



Selenyuma bağımlı ve bağımsız olan iki tipinin bulunduğu belirtilmiştir (2, 78).

Katalaz (CAT)

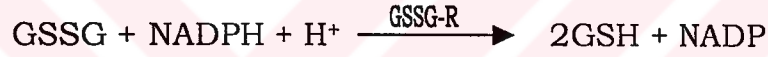
Primer savunma sistemin önemli bir enzimi olan katalaz, temelde H₂O₂'in suya ayrışmasını katalizler. (5).



H₂O₂ seviyesinin düşük olduğu durumlarda organik peroksidler tercihen peroksidaz tarafından katalizlenirken, H₂O₂ konsantrasyonunun yüksek olduğu koşullarda katalaz tarafından metabolize edilirler (2, 98, 99).

Glutatyon redüktaz (GSSG-R)

Glutatyon redüktaz yükseltgenmiş glutatyonu (GSSG) NADPH (β-nikotinamid adenin dinükleotid)'a bağımlı olarak indirgenmiş glutatyonla katalizleyen bir flavoprotein'dir (84, 100).



ii) Antioksidan Bileşikler:

Bu bileşiklerin, [•]OH, RO[•], RO₂[•] ve reaktif oksijen türleriyle reaksiyona girerek, lipid peroksidasyonun başlamasını ve ilerlemesini önlediği belirtilmiştir (6). Bu antioksidan savunma enzimatik olmayan moleküller tarafından sağlanır.

Vitamin C (Askorbik asit): Hidrofilik bir molekül olan askorbik asit, sıvı ortamda daha etkin bir antioksidandır. Bir indirgeyici ve antioksidan ajan olarak, O₂^{-•}, [•]OH ve çeşitli lipid hidroperoksidleriyle doğrudan reaksiyona girer. Buna ek olarak, yükseltgenmiş vitamin E'nin antioksidan özelliklerini yenilemesi en önemli fonksiyonudur (2, 5, 64, 68, 101).

Vitamin A (Karotenoidler): Karotenoidler serbest radikalleri ve başta tekil oksijen olmak üzere, reaktif oksijen türlerini temizleyerek lipidleri peroksidasyona karşı korurlar. Özellikle ksantin oksidaz sisteminin oluşturduğu lipid peroksidasyon ürünlerini yakalayarak etkili bir biyolojik antioksidan rolü oynar (2).

Glutasyon (GSH) : $O_2^- \cdot$, H_2O_2 ve $\cdot OH$ gibi birçok elektrofilik ve yükseltgeyici bileşikle etkileşime girerek etkili bir indirgeyici görevi görür. Redükte glutasyon doğrudan süperoksit anyonu, hidroksil radikali ve çeşitli organik radikaller ile reaksiyona girip yükseltgenbildiği gibi, vitamin A gibi çeşitli antioksidanların yükseltgenmiş formdan indirgenmiş forma geçmesinde görev alarak antioksidan etkinlik gösterir (2, 102, 103).

Ürik asit : Ürik asit süperoksit anyonu, hidroksil radikali, oksidehemler ve peroksil radikallerini temizlemekte ve çeşitli geçiş metalleri (demir, bakır gibi) bağlayarak, vitamin C'nin oksidasyonunu engellemektedir(2, 84).

Bilirubin : Hemoprotein katabolizmasının bir ürünüdür. Zincir kırıcı antioksidan olarak ve serbest radikallerle doğrudan reaksiyona girerek etkinlik gösterir (2).

Transferrin ve Ferritin : Bu proteinler Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarında katalizör olarak görev yapan serbest metal iyonlarını bağlayarak, dokuları lipid peroksidasyonuna karşı koruyan etkin bir antioksidan savunma sağlarlar(2).

Seruloplazmin : Bakır bağlayıcı bir glikoproteindir. Ekstraselüler bölgede serbest radikal metabolizmasını düzenleyen ve süperoksit radikalinin temizlenmesinde rol oynayan bir proteindir. Bakır bağlayabilme kapasitesinden ve glutasyon peroksidazın aktif bölgesinde yer almasından dolayı önemli bir antioksidandır. Hücre çekirdeğinde yaygın olarak bulunur (2, 104).

Selenyum : Selenyum'un antioksidan özelliği, temel olarak glutasyon peroksidazın aktif bölgesinde yer almasından kaynaklanmaktadır. Selenyumun hücre düzeyinde prekarsinojenlerin karsinojenlere enzimatik dönüşümünü engellediği ileri sürülmektedir(2, 105, 106).

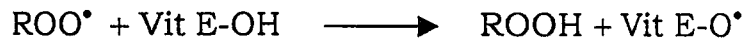
Vitamin E : Vitamin E (vit E) doğada en yaygın olarak bulunan lipide eriyebilir antioksidandır. Bu terim tokoferol'ün 8 izomeri için kullanılan genel bir isimdir. Bunların arasında α -tokoferol en iyi bilinen izomer ve antioksidan aktivitesi en yüksek olanıdır. Tokoferol molekülünün lipofilik özelliğinden dolayı, vit E en önemli zincir kırıcı antioksidandır. Adipoz doku, adrenal bezler, kalp, iskelet kası, testisler ve karaciğer gibi memeli dokularında yüksek

oranlarda bulunur. Tüm hücre lipid membranlarında, hücre içi organellerden membran lipid içeriği fazla olan endoplazmik retikulum ve mitokondri membranlarında bol miktarda bulunur. Bu yüzden, tokoferol lipid peroksil ve alkoksil radikalleriyle reaksiyona girerek membran lipid peroksidasyonuna karşı korumada daha yüksek bir antioksidan etki göstermektedir (2, 5, 6).

α -Tokoferol merkezi ve periferik sinir sistemlerinde eşit bir dağılım göstermemektedir. Medulla, spinal kordon ve serebellumda diğer bölgelere göre daha az miktarda vit E bulunmaktadır. Vit E'nin nörolojik rolü ilk olarak 1928'de tespit edilmiştir. Yapılan deneylerde, vit E eksikliğinin sinir sistemi ve iskelet kaslarının dejenerasyonuna neden olduğu gözlenmiştir (107). Kronik vit E eksikliği spinoserebellar dejenerasyonun yanında; halsizlik, ataksi, proprioseptif kayıp, refleks zayıflaması, retinal pigmentasyon, göz hareketlerinin bozulması (ophthalmoplegia) ve miyopati gibi birçok fonksiyon bozukluğuna yol açmaktadır. Ancak çoğunlukla emilim bozukluğu sonucu gelişen bu hasarların, vit E verildiğinde büyük oranda düzelme kaydettiği gözlenmiştir (15, 16, 108, 109, 110). Yapılan deneylerde vit E eksikliğinin insanda bilateral olarak P100 latensini uzattığı gözlenmiş ancak, tedaviden sonra latenslerin düştüğü, görme keskinliğinde ise herhangi bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir (110, 111, 112).

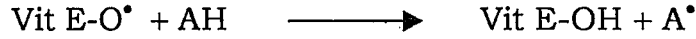
Vit E eksikliğinde gözlenen nöromusküler sendromun altındaki patofizyolojik mekanizmalar kesin olarak bilinmemekle birlikte; poliansatüre yağ asitlerinin neden olduğu serbest radikal oksidan hasarına karşı, sinir ve kas dokularında antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalmasına bağlı olduğu ileri sürülmektedir (15, 107, 109). Nitekim, sıçanlarda yapılan deneylerde vit E eksikliğinin çubukların (rods) yıkılmasına ve lipofuscin granüllerinin pigment epitelinde birikmesine yol açtığı gözlenmiştir (16, 113).

Vit E'nin biyolojik membranlarda serbest radikal hasarının ilerlemesini engelleyen zincir-kıran antioksidan fonksiyonu birçok çalışmada gösterilmiştir (5, 68, 114). Vit E plazma lipoproteinlerindeki ve biyolojik membranların fosfolipidlerindeki poliansatüre yağ asitlerini (PUFAs) koruyan güçlü bir peroksil radikali temizleyicisidir. Lipid hidroperoksidlerinin yükseltgenmesiyle oluşan peroksil radikalleri (ROO^{\bullet}), PUFA' lardan (RH) 1000 kat daha hızlı bir şekilde vit E (Vit E-OH) ile reaksiyona girmektedir (68). Tokoferolün fenolik hidroksil grubu organik peroksil radikali ile reaksiyona girerek, organik hidroperoksid ve tokoferoksil radikali oluşturur:



Böylece, vit E lipidlerin otooksidasyonunu engelleyerek zincir-kıran bir antioksidan fonksiyonu üstlenmektedir.

Membranlarda oluşan tokoferoksil radikali (Vit E-O^{*}) lipid çift tabakadan çıkarak sıvı kısma geçer. Burada, vitamin C veya diğer indirgeyicilerle (AH) reaksiyona girer. Vitamin C yükseltgenirken kendisi indirgenmiş haline döner;



Yükseltgenen vitamin C daha sonra metabolik süreçlerden geçerek indirgenir. Bu olgu bir vit E döngüsüne yol açarak antioksidan aktivitenin sürekliliğini sağlar.

Parkinson ve Alzheimer gibi yaşa bağlı birçok nöronal hastalığın nedenlerini açıklamaya çalışan hipotezlerden biri de oksidatif stres hipotezidir. Yapılan çalışmalar, Alzheimer hastalığı sırasında biriken amiloid beta peptid (A β) plaklarının doğrudan oksidan stresi tetiklediğini ve oksidatif reaksiyonları başlatabildiğini ortaya koymuştur. Ancak vit E verildiğinde oksidan strese bağlı nöron ölümünün azaldığı gözlenmiştir (114).

Doz aşımı durumunda vit E'nin *in vivo* herhangi bir yan etkisine rastlanmamıştır. Ancak bazı *in vitro* deneylerde, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL)'lerin oksidasyonuna yol açtığı bulunmuştur (115).

II. Sekonder Savunma

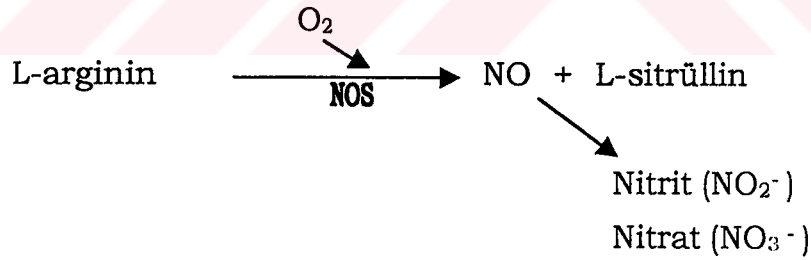
Sekonder savunmanın temel görevi oksidan stresin yarattığı hasarlı ve fonksiyonu bozulmuş çeşitli yapıları ortadan kaldırarak hücrede birikmesini engellemektir. Başlıca; lipolitik ve proteolitik enzimler olmak üzere iki gruba ayrılır (2, 116).

2.5. NİTRİK OKSİD

İlk olarak 1987 yılında Furchgott ve arkadaşları, daha önce endotel kaynaklı vazodilatör faktör olarak bilinen ve kan damarlarının gevşemesine sebep olan gizemli molekülün nitrik oksid (NO) olduğunu ortaya çıkarmışlardır (117). Nitrik oksid, memeli hücrelerinin çoğunda L-arginin aminoasidinden üretilen paramagnetik bir molekül, serbest radikal ve suda eriyebilen bir

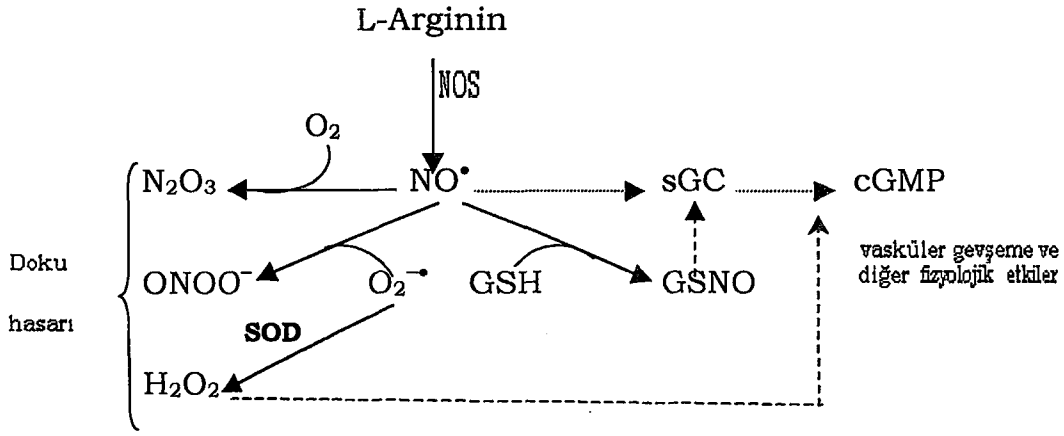
gazdır. Küçük bir molekül olan NO'nun plazmadaki biyolojik aktif konsantrasyonunun 1-100 nM arasında değiştiği ve 3-10 sn'lik bir yarı ömrü olduğu tespit edilmiştir (118, 119, 120). Buna karşın, sitrüllinin hücre içinde kalıp, NOS tarafından substrat olarak kullanılmak üzere tekrar arginine dönüştürülmektedir. Ayrıca substrat sağlamak için arginini hücre içine taşıyan transport mekanizmaları da vardır. NO ise, çözünebilir bir gaz olduğundan komşu hücrelere, bakterilere ve virüslere difüzyonla kolayca girer. Bu molekül hemoglobin, metilen mavisi ve süperoksit anyonuyla kısa sürede nötralize edilir.

NO yapımında görev alan nitrik oksid sentaz (NOS) enzimi, L-argininin uçtaki guanidin grubunu NO'ya dönüştürür (Şekil 2.7). Tüm NOS'lar homodimeriktir ve her monomerde redüktaz ve oksijenaz protein grubu (domain) içerirler. Redüktaz grubu NOS'un kofaktörleri olan FAD, NADPH ve FMN'yi bağlarken, oksijenaz grubu ise hem ve tetrahidrobiopterin (BH₄)'i bağlamaktadır. Bu iki grup da kalmodulin aracılığıyla birbirine bağlanır. Bu reaksiyon sırasında ω-hidroksil-L-arginin ara bileşiği oluşur. Ayrıca NOS, substratı son ürünler olan NO ve L-sitrülline oksidize etmek için moleküler oksijeni kullanır (118, 119, 121). NOS'un L-N^G-monometil-arginin (L-NMMA), N^G-nitro-L-arginin- metil ester (L-NAME) ve N^G-nitro-L-arginin (L-NNA) gibi kompetitif inhibitörleri vardır.



Şekil 2.7. Nitrik oksid sentezi.

Nitrik oksidin en iyi bilinen efektörleri guanilat siklaz ve cGMP olmasına rağmen, G proteinleri, çeşitli enzimler, transkripsiyon faktörleri, taşıyıcılar (transporter) ve iyon kanalları da hedefleri arasında yer almaktadır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Nitrik oksidin biyolojik reaksiyonları.

Vücutta NOS'un iki izoformu bulunur: indüklenbilir (i) NOS ve yapısal (constitutive) NOS. Yapısal (c)NOS da, endotel (e) NOS ve nöronal (n) NOS olmak üzere ikiye ayrılır. iNOS kalsiyumdan bağımsız olarak aktive olurken, cNOS'un aktif olması için Ca^{+2} konsantrasyonunun artması gerekmektedir.

İndüklenbilir (i) NOS sentezi, bakteriyel lipopolisakkaridlerin (LPS) veya sitokinlerin (IL-1, IL-2, IL-6, TNF) immün hücrelerinin, özellikle makrofaj ve diğer hücrelerin (endotel hücreleri) yüzeyindeki reseptörleri uyarması ile aktif hale gelir (119, 121). Bu, birkaç saat içerisinde başlayan, 18 saatte maksimum değerine ulaşan ve 24 saatte düşen yüksek düzeyde NO salınmasına yol açan uzun süreli bir etkiye sahiptir. Bu enzim, bütün izoformları için gerekli olan kalsiyum ve kalmodulini içinde barındırdığından, sentezlenir sentezlenmez aktif hale gelir. iNOS'un uyarılmasından sonra salınan NO hedef hücrelere diffüze olup, o hücrelerdeki enzimlerin demir-sülfür merkezleriyle birleşir. Bu reaksiyon sonucunda, mitokondrinin solunum zinciri enzimlerini ve DNA sentez enzimlerini inhibe ederek, viral ve bakteriyel istilacıların, aynı zamanda hücrenin kendisinin de ölümüne sebep olur.

Endotel (e) NOS vasküler endotelyumda bulunan yapısal bir enzimdir. Damarların parasempatik innervasyonla kolinerjik stimülasyonu intraselüler serbest kalsiyum konsantrasyonunu arttırarak, eNOS'u aktif hale getirir. Oluşan NO, diffüzyon ile düz kaslara geçer ve sGC'yi aktif hale getirir. Salınan cGMP intraselüler kalsiyumu düşürür. Düz kasların gevşemesini sağlar ve platelet agregasyonunu inhibe eder. Kısa süreli bir etkisi vardır (119, 121).

Enzimin üçüncü izoformu olan nöronal (n) NOS, eNOS gibi yapısal bir enzim olup merkezi sinir sistemindeki (MSS) ve otonom sinir sistemindeki birçok nöronda bulunur. Serebellum, serebral korteks ve hipokampusta yüksek konsantrasyonda, hipotalamusta (özellikle paraventriküler ve supraoptik nöronlarda) ise çok yüksek

konsantrasyonda bulunur. Enzimin bu formu, eNOS gibi, kalmodulin ile birleşen intraselüler kalsiyumun artmasına yol açan sinaptik girişle aktif hale gelir. Bu da enzimi çalıştırarak, NO'nun oluşmasını sağlar. Oluşan NO guanilat siklazı aktif hale getirip cGMP salınmasına yol açar. nNOS'un beyinde öğrenmeyi ve hafıza oluşumunu düzenlediği ve nörodejeneratif hastalıklarda rol oynadığı bildirilmiştir (117, 119, 121).

NO'nun birçok hipotalamik peptidin ve nörotransmitterin fizyolojik salınmasının kontrolünde kilit rolü oynadığı bildirilmiştir. Paraventriküler çekirdekte (PVN) kortikotropin-salınma hormonu (CRH)'nin nöronlar tarafından salgılanmasını kontrol ettiği gösterilmiştir (119). Buna ek olarak, luteinleştirici hormon (LH) salgısının NO aracılığıyla olduğu, büyüme hormonunun (GH) salgısının ise NO'nun GHRH salgısını uyarmasıyla gerçekleştiği ifade edilmiştir. IL-1 uyarımlı prolaktin salgısının da NO aracılığıyla olduğu ve bu işi büyük olasılıkla oksitosin gibi, NO-uyarımlı prolaktin salgılayan peptidlerinin yerine getirdikleri ileri sürülmektedir (119). Bütün bu sonuçlar, fizyolojik koşullar altında NO'nun hipotalamustaki nörotransmitter ve nöropeptid salınmasının kontrolünde önemli bir görevi olduğunu göstermektedir.

NO sadece birçok hipotalamik peptidin salınmasını uyarmakla kalmayıp, inhibitör nörotransmitter olan gamma amino butirik asid (GABA)'in de salınmasını uyarmaktadır. Buna ek olarak NO, medial bazal hipotalamustan norepinefrin ve dopamin salınmasını da inhibe etmektedir (119).

Epifizdeki yüksek iNOS indüksiyonunun bu bezdeki kademeli fonksiyon azalmasına katkıda bulunabileceği ve yaşlanmayla oluşan nokturnal melatonin seviyesindeki azalmada ve bezin kalsifikasyonunda etkili olabileceği ileri sürülmektedir (119). Bu, antioksidan olan melatonin hormonunun salgısında azalmaya yol açar.

Nitrik oksidin nörodejeneratif hastalıklarda da yer aldığı ve nigrostriatal dopaminerjik sistemin nöronlarının kaybından dolayı ortaya çıkan Parkinson hastalığında önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir. Ayrıca ensefalitik semptomlarla karakterize olan influenza, substantia nigra bölgesinde büyük oranda NO oluşumuna sebep olmakta ve dopaminerjik nöronların kaybına ve erken yaşlarda Parkinson gelişimine neden olmaktadır. Parkinsonizm'in yaşlanmayla birlikte görülmesi, büyük ihtimalle bu bölgede normal hastalarda bile gözlenen dopaminerjik nöronlardaki azalmaya bağlıdır. Bu azalma, enfeksiyonlar esnasında NO üretiminin artmasından da kaynaklanabilir. Bunun yanında NO'nun Alzheimer'da, Huntington Kore'de veya MSS'deki herhangi bir enflamasyon alanının çevresindeki hücre ölümünde yer alabileceği ileri sürülmektedir (119). Buna örnek olarak multiple skleroz veya beyin travması

akabinde oluşan enflamasyonlar verilebilir. Deneysel çalışmalar NO'nun NMDA reseptör-aracılı nörotoksisitede ve fokal serebral iskemiden sonra görülen nöron ölümünde de yer aldığını göstermiştir. Aşırı miktardaki NO nöronları öldürdüğünden, yaşlanmayla birlikte muhtemelen yüksek düzeyde NO üretilmekte, bu da yaşlanmanın yanında birçok nörolojik hastalığın etiyolojisinde rol oynayan nöronal hücre tahribi ve kaybına yol açmaktadır (47). Yine yapılan deneylerde, spinal kord travmasından sonra dorsal boynuz nöronlarında yüksek düzeyde NOS'a rastlanmıştır. NOS'un inhibisyonu kesilen aksonlarda motonöronal ölümü azaltmaktadır. Bu sonuçlar NO'nun yaralanmadan sonra görülen nöronal ölümden sorumlu olduğunu göstermektedir (48).

Moleküler serbest radikal olan NO, oksijen varlığında NO^{*}₂ ve N₂O₃ gibi çeşitli reaktif nitrojen oksid türleri (RNOS) oluşturmaktadır. NO/O₂ reaksiyonundan oluşan arabileşikler DNA ve enzimlerin oksidasyonuna ve hatta zincir kırılmalarına sebep olmaktadır (121, 122). Otooksidasyondan oluşan bu reaktif türlere ek olarak NO, oksijen radikalleri ve süperoksitle reaksiyona girip, güçlü bir oksidan olan ve birçok biyolojik molekülü modifiye edebilen peroksinitrit (ONOO⁻)'i oluşturabilmektedir. Fakat, SOD konsantrasyonu yüksek ise ONOO⁻ reaksiyonu azalmaktadır. Eğer ortamda SOD bulunmuyorsa ve glutatyon (GSH) varsa, NO'nun depo formu olan s-nitrosoglutatyon'un oluştuğu ve bunun da cGMP oluşumunu sağladığı tespit edilmiştir. Ayrıca ortamda BH₄ bulunmuyorsa ve NOS arginine doymuşsa ürünün yine cGMP oluşumunu uyaran H₂O₂ olacağı ileri sürülmektedir (121).

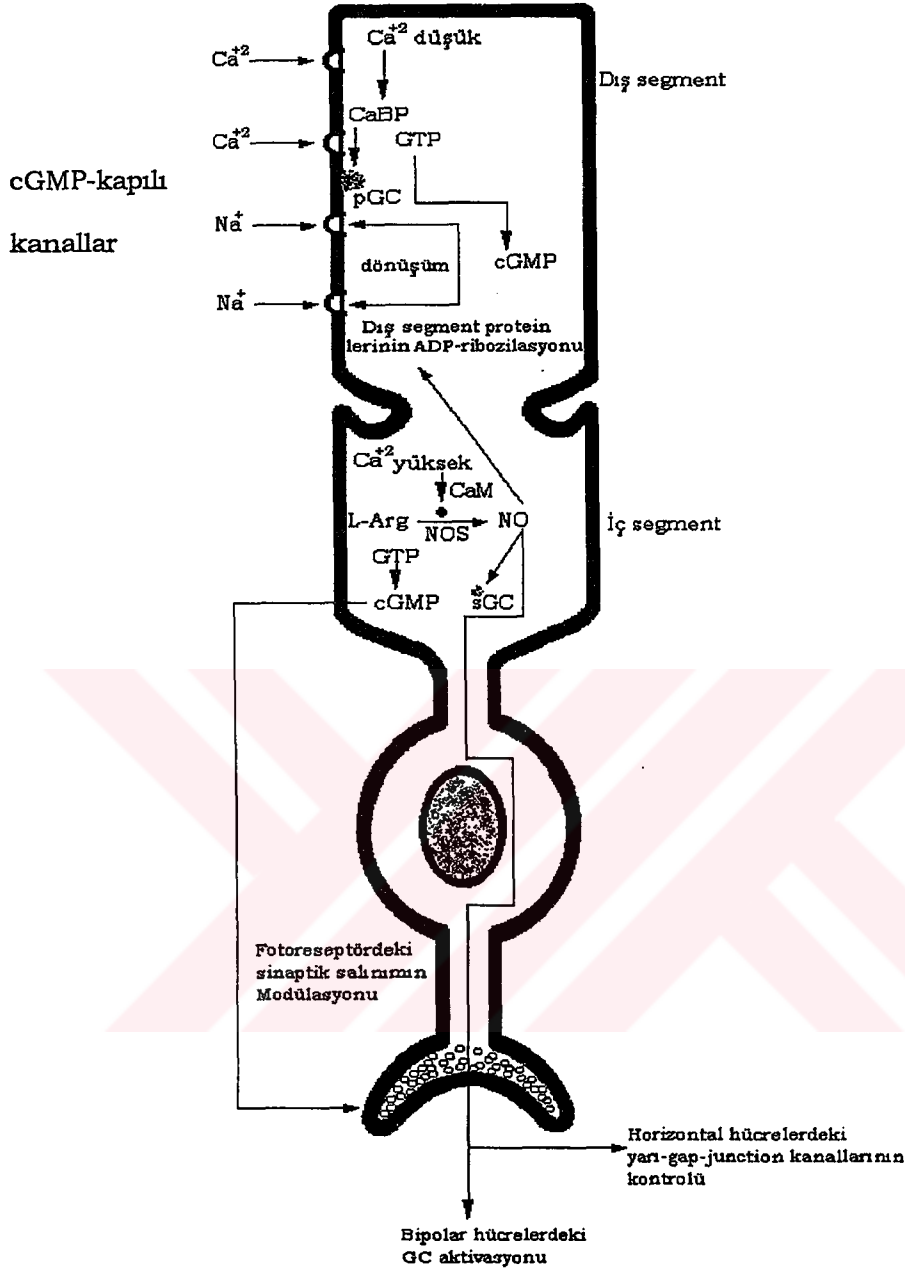
O₂ ve O₂⁻ ile reaksiyonundan oluşan RNOS'un zararlı etkilerine karşın, NO'nun antioksidan etkileri de olduğu bildirilmiştir (11, 122, 123). NO hemoproteinlerin hidrojen peroksid tarafından tahribini engellemenin yanısıra, DNA'da tek veya çift zincir kırılmalarına sebep olan fenton tipi oksidasyon reaksiyonlarını ortadan kaldırmaktadır. Dolayısıyla NO lipid peroksidasyon reaksiyonlarında zincir-kıran antioksidan olmasının yanında, hücreleri peroksidlerin ve reaktif oksijen türlerinin yıkıcı etkisinden korumaktadır. Ancak bu etkinin NO ile O₂⁻ arasındaki orana bağlı olduğu tespit edilmiştir (11, 122, 123). Bir başka deyişle, NO : O₂⁻ oranı birden küçük ise NO üretiminin artması lipid peroksidasyonu arttırmaktadır. Buna karşın, oran eşit veya birden büyük olursa NO oksidasyonu engellemekte, dolayısıyla antioksidan etki göstermektedir. Bunun yanında, NO'nun α-tokoferol'den 10⁴ - 10⁵ kat daha etkili bir peroksil radikali temizleyicisi ve lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarının terminatörü olduğu öne sürülmektedir (9, 11). Bu özelliğinden dolayı α-tokoferol'ün oksidan strese maruz kalarak tükenmesini engellemektedir.

Bu karşıt bulgular nitrik oksidin iki tarafı keskin bir kılıç gibi değerlendirilmesine neden olmuştur. NO'nun farklı etkilerinin NOS'un izoformlarından kaynaklandığını veya oksidatif stres, reaktif oksijen arabileşiklerinin oluşması ve antioksidan sistemin yetersiz kalması gibi durumlarda ortaya çıktığını iddia eden araştırmalar bulunmaktadır (121, 123). Birinciler; eNOS tarafından sentezlenen NO'nun fizyolojik etkilere sahip olduğunu, buna karşın iNOS ve nNOS aracılığıyla sentezlenen NO'nun patolojik olabileceğini ileri sürmüşlerdir (121). İkinciler ise, NO'nun etkileri arasındaki farkın bu molekülün farklı redox-ilişkili (redox-related) türlerine ve farklı kimyasal aktivitelerine bağlı olduğunu savunmuşlardır. Bu görüşe göre, NO fizyolojik ortamda bir serbest radikal olan nitrojen monoksit (NO^\bullet) veya nitrozonyum katyonu (NO^+) formunda bulunur. Eğer dokuda NO^\bullet oluşumu daha baskın olursa nitrik oksit nörotoksik bir etki göstermekte; fakat, ortamda NO^+ oluşumu daha fazlaysa nöroprotektif bir etki gözlenmektedir. Nitrozonyum katyonu koruyucu etkisini NMDA reseptörlerini nitrozilleyerek ve inaktif hale getirerek göstermektedir. Böylece NMDA-aracılı nörotoksisiteyi inhibe etmektedir (123, 124).

Ayrıca, diğer bir grup araştırmacı NO'nun oksidatif etkisinin farklı nitrik oksit donörleri kullanmaktan kaynaklandığını ve bunların bazılarının fizyolojik koşullardaki nitrik oksit salınmasını temsil edemeyeceğini ileri sürmüştür. Örneğin, SIN-1 (3-morpholino-sydnonimine) ve SNP (sodium nitroprusside)'nin önemli ölçüde NO salınmasına yol açmadıkları gibi toksik bir etkiye de sahip oldukları ifade edilmiştir. Ayrıca SIN-1 nitrik oksidin yanında önemli ölçüde süperoksit radikali üretimine yol açmaktadır (10, 14, 122).

Nitrik oksit görsel sistem de dahil, insan fizyolojisinin hemen her sisteminde rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda, farklı memelilerin horizontal, amakrin ve ganglion hücrelerinde nNOS bulunduğu belirlenmiştir Bunun yanında insan retinal dokularının da yapısal NOS ve iNOS'un mRNA'larını sentezleyebildiği belirlenmiştir (123).

NO'nun fotoreseptörlerde iki fonksiyonun olduğu ileri sürülmektedir: Işık cevaplarının modifikasyonu ve fotoreseptörlerden bipolar ve horizontal hücrelere sinaptik iletimin modülasyonu (123, 124). Dış segmentlerde, ışık uyarını sonucu oluşan Ca^{+2} konsantrasyonundaki düşüş partiküler guanilat siklaz (pGC)'in aktivasyonuna yol açar. pGC'nin aktivasyonu kalsiyum bağlayıcı protein (CaBP) tarafından düzenlenir. GTP'den cGMP oluşması ışığa bağlı cevabın yenilenmesini sağlar. İç segmentlerde, Ca^{+2} konsantrasyonundaki artış ve kalmodulin (CaM)'in etkisiyle NOS aktif hale gelir. Sonuçta oluşan NO'nun çözünebilir (soluble) guanilat siklaz (sGC)'in uyarılması ve fotoreseptördeki sinaptik iletimin modülasyonu gibi birçok etkisi vardır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. NO'nun fotoreseptördeki etki mekanizması

NO'nun komşu hücelere diffüzyonu bipolar hücreleri etkileyebilir (GC aktivasyonu) veya horizontal hücrelerdeki yarı-gap-junction kanallarını kontrol edebilir. Bunun yanında, dış segmentlere diffüze olup dış segment proteinlerinin ADP-ribozilasyonunu uyarabilir (124). Nitrik oksid, görsel sistemin tüm yolağında yer almaktadır. Histolojik çalışmalarda dLGN'ta ve kortikal bölgelerin tüm tabakalarında NOS aktivitesine rastlandığı bildirilmiştir (123).

Yapılan bazı çalışmalarda, NO⁺'un retinada NMDA-kaynaklı akımları düşürdüğü ve nöroprotektif bir etki gösterdiği bildirilmiştir (124). Diğer yandan, başka bir grup araştırmacı nNOS'un retinadaki ekzitotoksistide önemli bir rol oynadığını, buna karşın eNOS'un herhangi bir etkisinin olmadığını ortaya koymuşlardır (125). Bunun yanında, NO'nun dejeneratif retinal hastalıklarda ve retinal iskemide patofizyolojik bir rol üstlendiği ve anlamlı olmamakla birlikte VEP latensini uzattığı gözlenmiştir (126). Wang ve Hakanson (127) NO'nun oküler inflamasyonda önemli bir rolü olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, sıçanlarda NO inhibisyonunun endotoksin kaynaklı uveitis'i engellediği gözlenmiş ve buna dayanarak insanda da uveitis oluşumunda NO'nun rolü olabileceği ileri sürülmüştür (128).



GEREÇLER VE YÖNTEMLER

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik, Fizyoloji, Biyokimya ve Nöroloji Anabilim Dalları laboratuvarlarında gerçekleştirilen bu çalışmada 80 adet erkek albino sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar yaşlarına göre genç (3 aylık) ve orta-yaşlı (12 aylık) olmak üzere iki eşit gruba bölünmüştür. Her grup ise herbirinde 10'ar hayvan olmak üzere dört alt gruba ayrılmıştır. Böylece;

1. Genç kontrol (GK)
2. Orta-yaşlı kontrol (OK)
3. L-Arginin alan genç grup (GA)
4. L-Arginin alan orta-yaşlı grup (OA)
5. L-NAME alan genç grup (GN)
6. L-NAME alan orta-yaşlı grup (ON)
7. Vitamin E alan genç grup (GE)
8. Vitamin E alan orta-yaşlı grup (OE)

olmak üzere 8 grup oluşturulmuştur.

Sekiz haftalık deney süresince her kafeste birer hayvan olmak üzere sıçanlar, ticari sıçan yemi ve musluk suyu ile beslenmişlerdir. Bu süre boyunca günlük yem tüketimleri ve vücut ağırlıklarındaki haftalık değişiklikler kaydedilmiştir. Deney süresince; i) GA ve OA gruplarına 160 mg/kg/gün L-Arginine, ii) GL ve OL gruplarına 10 mg/kg/gün L-NAME intraperitoneal iii) GE ve OE gruplarına 30 mg/kg/gün vitamin E intramusküler iv) kontrol gruplarına serum fizyolojik intraperitoneal olarak injekte edilmiştir. 24 saat açlığı takiben eter anestezisi verilerek görsel uyarılma potansiyelleri kayıtlarına geçilmiştir.

3.1. GÖRSEL UYARILMA POTANSİYELLERİNİN KAYDEDİLMESİ

Görsel uyarılma potansiyelleri hafif eter anestezisi altında hayvanların kafalarına yerleştirilen iğne elektrotları (NE-223S, 5mm Nihon Kohden) ile Neuropack four cihazında kaydedilmişlerdir. Aktif ve referans elektrotlar bregmanın 0.5 cm arkasına ve önüne yerleştirilmiştir . Toprak elektrodu ise hayvanların kuyrukları üzerine

konulmuştur. Flaş uyarıcısı, Nihon Kohden SLS 2141 uyarıcısı ile hayvanların pupillalarının tümü aydınlatılacak şekilde 15 cm mesafeden uygulanmıştır. Flaş uyarısı saniyede bir kere ve en düşük şiddette (0.63 J) olacak şekilde ayarlanmıştır.

Flaşla oluşturulan görsel uyarılma potansiyelleri (FVEP) sağ ve sol göz olmak üzere monooküler uyarılarak kaydedilmiştir. Deney süresince flaş verilmeyen diğer göz bir pamuk ve karbon kağıdı yardımıyla kapatılmıştır. Bu esnada hayvanların vücut sıcaklıkları ısıtıcı yardımıyla 37 ile 38.5 °C arasında tutulmuştur (36).

Çalışmada kullanılan cihazın amplifikatörünün frekans limitleri 1-100 Hz, kazancı 20 μ V/bölme, analiz zamanı 300 ms olarak ayarlanmıştır. FVEP'ler 100 kez ortalama alınarak kayıtlanmıştır. FVEP'lerin tekrarlanabilirliğini sağlamak amacı ile her kayıt en az iki kez yapılmıştır. izoelektrik çizginin üzerindeki potansiyel tepeleri (pikleri) negatif (N), altındakiler pozitif (P) kabul edilmiştir. Tepe latensleri stimulus artifaktından itibaren milisaniye (ms) birimiyle, birbirini izleyen ters polaritedeki dalgaların genlikleri tepeden-tepeye mikrovolt (μ V) birimiyle hesaplanmıştır.

3.2. KAN BASINCI ÖLÇÜMÜ

Sıçanların kan basınçları MP100 Data Acquisition sistem ile carotid arter kanülasyonu yapılarak kaydedilmişlerdir.

3.3. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER

Hayvanlar 1 g/kg üretan verilerek anestezi edildikten sonra, thiobarbitürik asit reaktif ürünleri (TBARS) ve nitrit ölçümleri için beyin dokuları çıkarılarak deneye son verilmiştir. Üç kez serum fizyolojikle yıkandıktan sonra hemen nitrit ve TBARS tayini için kullanılmıştır.

3.3.1. Dokuların Homojenizasyonu

TBARS ve nitrit ölçümü yapılan dokular aynı gün küçük parçalara ayrıldıktan sonra, 5 mM fosfat tamponunda (pH:7.4; 0.5 M KH_2PO_4 + 0.15 M NaCl) sonikasyon işleminden geçirilmiştir.

3.3.2. Doku Thiobarbitirik Asit Reaktif Ürünlerinin (TBARS) Ölçümleri

1 ml distile su içeren tüpe 50 µl doku süpernatantı konulduktan sonra, 1 ml 2-thiobarbitirik asit (TBA, 29 mmol/L) eklenmiştir. Tüp iyice karıştırıldıktan sonra, 1 saat süreyle 95-100°C arasında kaynatılmıştır. Numuneler soğutulduktan sonra 25 µl HCl (5 mol/L) ve 3.5 ml n-bütanol eklenerek 5 dakika süresince vortekslenmiştir. Bu işlemden sonra; 3000xg'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, bütanol fazı ayrılmıştır. Bütanol ekstraktının floresansını ölçmek için, eksitasyon dalga boyu 525 nm, emisyon dalga boyu 547 nm olarak spektrofloreometre'de (Shimadzu RF-5000) okunmuştur. 1,1,3,3-tetra-metoksi-propan standardı aynen numune gibi çalışılarak numunelerin içermiş olduğu TBARS miktarı, standart grafiğinden yararlanılarak hesaplanmıştır (129).

3.3.3. Nitrit Tayini

Dokular homojenize edildikten sonra +4 °C ve 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmişlerdir. 1 ml süpernatant alınarak üzerine 0.5 ml 4-hidroksikumarin (% 0.04) ilave edilmiştir. Karışım 5 dakika buz banyosunda bekletildikten sonra 50 µl sodyumthiosülfat (% 8) eklendi ve 5 dakika oda ısısında beklenmiştir. Daha sonra, 0.5 ml NaOH (1.5 M) eklenerek numuneler yine oda ısısında 10 dakika bekletilmişlerdir. 347 nm eksitasyon ve 453 nm emisyon dalga boyları kullanılarak, numunelerin floresansı spektrofloreometrede ölçülmüştür (130, 131).

3.3.4. Protein Tayini

Protein tayini, albümin standard olarak alınıp Lowry yöntemine (132) göre yapılmıştır.

3.4. İSTATİSTİKSEL İŞLEM

İstatistiksel değerlendirme SPSS paket programı kullanılarak yapılmıştır. Parametrelerin sağ-sol, yaş ve grup farklılıkları "Varyans Analizi (ANOVA)" ile incelenmiştir. İkili grupların karşılaştırılmasında ise, "Tukey's HSD" testi kullanılmış ve sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

BULGULAR

4.1. GENEL GÖRÜNÜM

Kontrol (K), L-arginin (A) ve L-NAME (N) gruplarını oluşturan hayvanların görünüm ve davranışlarında herhangi bir değişikliğe rastlanmamakla birlikte, vitamin E (E) grubunu oluşturan hayvanların tüylerinin parlak olduğu ve daha sağlıklı bir görünüm kazandıkları gözlenmiştir.

4.2. BESİN TÜKETİMİ

8 haftalık deney süresi boyunca kontrol ve deney gruplarının haftalık yem tüketimleri takip edilmiş, sonuçlar 100 gram vücut ağırlığı esas alınarak g/gün ve olarak değerlendirilmiştir.

ON grubundaki hayvanların besin tüketimlerinin OK'ya göre anlamlı olarak azaldığı fakat, diğer gruplarda herhangi bir fark olmadığı saptanmıştır. Bunun yanında orta-yaşlı gruplarda gençlere göre yem tüketiminin arttığı gözlenmiştir (Tablo 4.1).

4.3. AĞIRLIK DEĞİŞİMİ

Deney grubundaki hayvanların ağırlık değişimleri ile kontrol gruplarının ağırlık değişimleri arasında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Ancak, hem deney hem de kontrol gruplarında deney süresince ağırlıkların önemli bir artış gösterdiği, bu artışın da genç gruplarda daha belirgin olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.1, Şekil 4.1).

4.4. KAN BASINCI

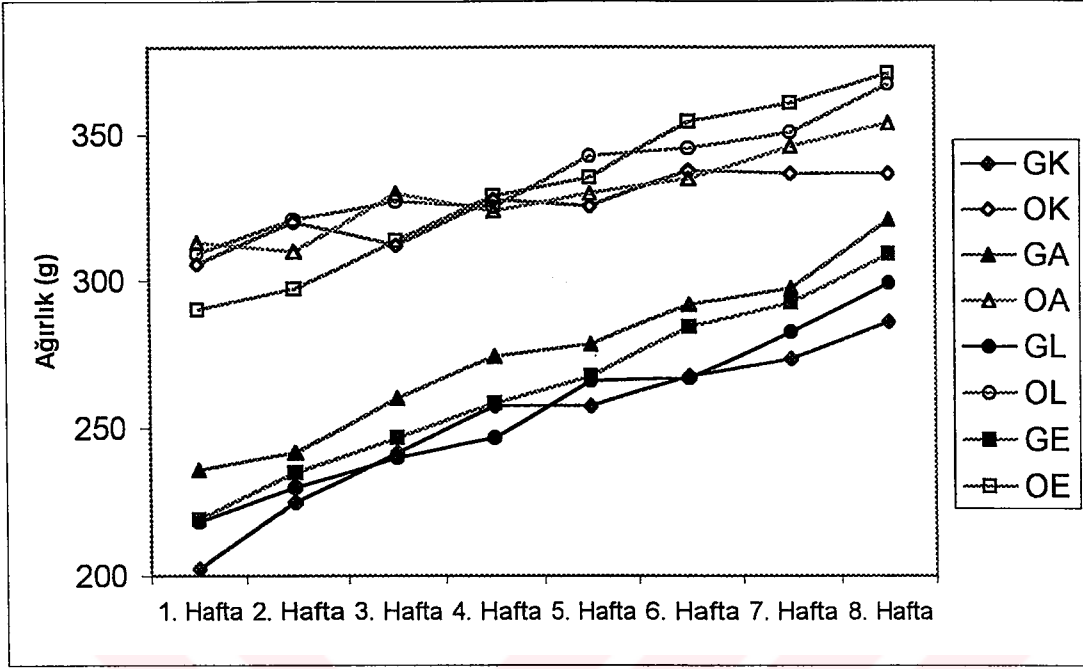
GK, GN, OK ve ON gruplarının kan basıncı değerleri sırasıyla, 100.34 ± 7.02 , 102.18 ± 7.82 , 99.54 ± 7.10 , 101.83 ± 4.78 bulunmuş ve L-NAME gruplarının kan basıncı değerlerinde kontrollerine göre önemli bir fark gözlenmemiştir.

Tablo 4.1. Kontrol ve deney grubu hayvanlarının ağırlık değişimi ve yem tüketimi.

GRUPLAR	Başlangıçtaki Vücut Ağırlığı (g)	Son Vücut Ağırlığı (g)	Günlük Yem Tüketimi (g/gün/100g)
Genç Kontrol (GK)	202.50±23.79	285.83±25.39	7.64±1.48
Orta-yaş Kontrol (OK)	305.56±25.55	336.67±25.98	9.27±0.88 * p<0.01
Genç L-arginin (GA)	235.83±19.29	320.83±28.75	7.03±0.91
Orta-yaş L-arginin (OA)	313.00±31.99	354.00±32.04	9.07±0.53
Genç L-NAME (GN)	218.33±25.52	299.17±23.14	7.46±0.80
Orta-yaş L-NAME (ON)	309.09±30.15	367.27±29.01	7.06±0.81 ** p<0.01
Genç Vit-E (GE)	219.17±32.32	309.17±21.93	7.89±1.13
Orta-yaş Vit-E (OE)	290.00±25.30	370.91±27.37	8.65±0.86

*Genç gruplar - Orta-yaşlı gruplar

**Deney grupları - Kontrol grupları



Şekil 4.1. Grupların haftalık ağırlık değişimi.

4.5. DOKU THİOBARBITÜRİK ASİT REAKTİF ÜRÜNLERİ (TBARS) ve NİTRİT SONUÇLARI

4.5.1. Beyin TBARS ve Nitrit Sonuçları

Beyin TBARS ve nitrit değerleri Tablo 4.2, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te gösterilmiştir.

TBARS ve nitrit düzeylerinin orta-yaşlı grupta genç gruba göre anlamlı olarak arttığı saptanmıştır (Tablo 4.2). GN ve ON gruplarında kontrollerine göre beyin TBARS düzeylerinin arttığı ve bu artışın anlamlı olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte GA, OA, GE ve OE gruplarında beyin TBARS seviyesinin azaldığı fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur.

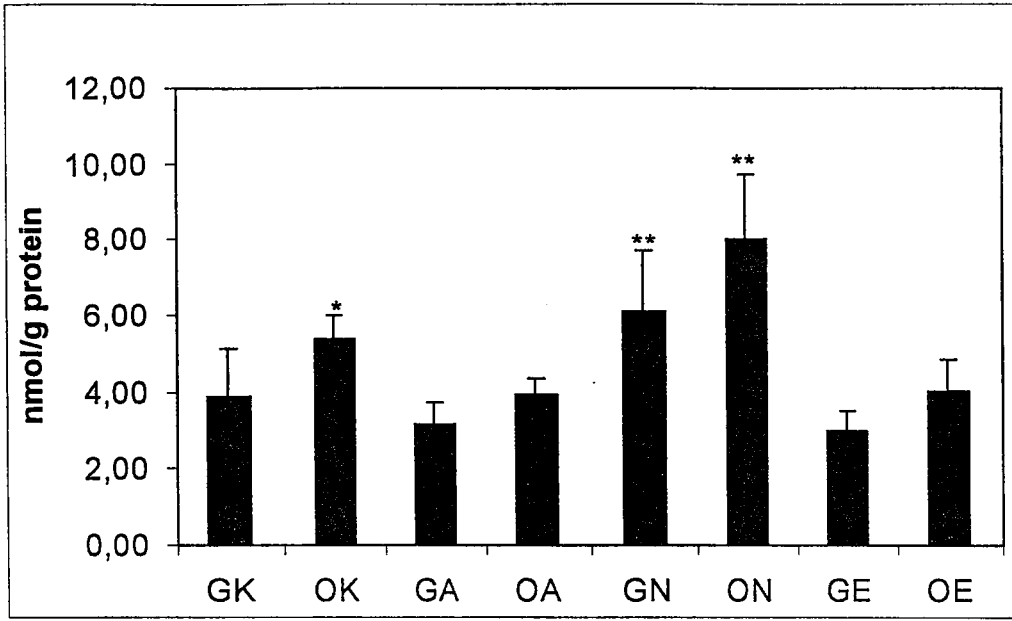
Kontrollerine göre, OA grubunda beyin nitrit seviyesinin artarken, ON grubunda ise beyin nitrit seviyesinin azaldığı ve bu bulguların anlamlılık taşıdığı tespit edilmiştir. Bunun yanında Vitamin E'nin GE ve OE gruplarında kontrollerine göre beyin nitrit seviyesini anlamlı düzeyde düşürdüğü gözlenmiştir.

Tablo 4.2. Beyin TBARS ve nitrit değerleri.

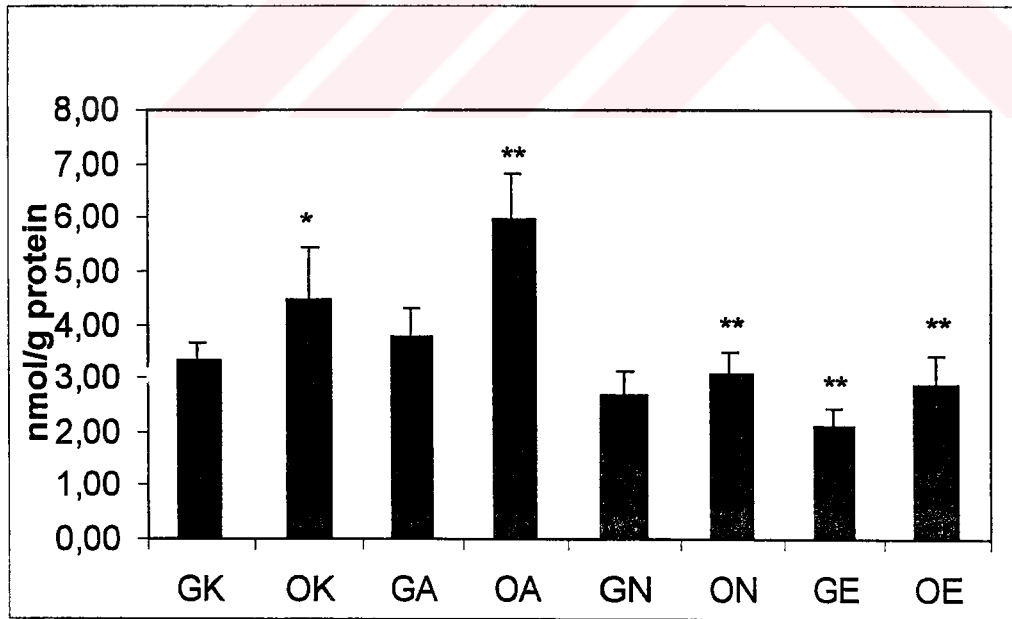
GRUPLAR	TBARS (nmol/g prot.)	Nitrit (nmol/g prot.)
Genç Kontrol (GK)	3.87±1.27	3.34±0.31
Ort-yaş Kontrol (OK)	5.36±0.62 * p<0.05	4.47±0.99 * p<0.01
Genç L-arginin (GA)	3.14±0.56	3.76±0.54
Orta-yaş L-arginin (OA)	3.91±0.42	5.96±0.87 ** p<0.01
Genç L-NAME (GN)	6.10±1.62 ** p<0.001	2.67±0.44
Orta-yaş L-NAME (ON)	8.04±1.71 ** p<0.001	3.10±0.39 ** p<0.01
Genç Vit E (GE)	3.00±0.54	2.13±0.30 ** p<0.01
Orta-yaş Vit E (OE)	4.04±0.84	2.90±0.50 ** p<0.01

*Genç gruplar - Orta-yaşlı gruplar

**Deney grupları - Kontrol grupları



Şekil 4.2. Beyin TBARS düzeyleri.



Şekil 4.3. Beyin nitrit düzeyleri.

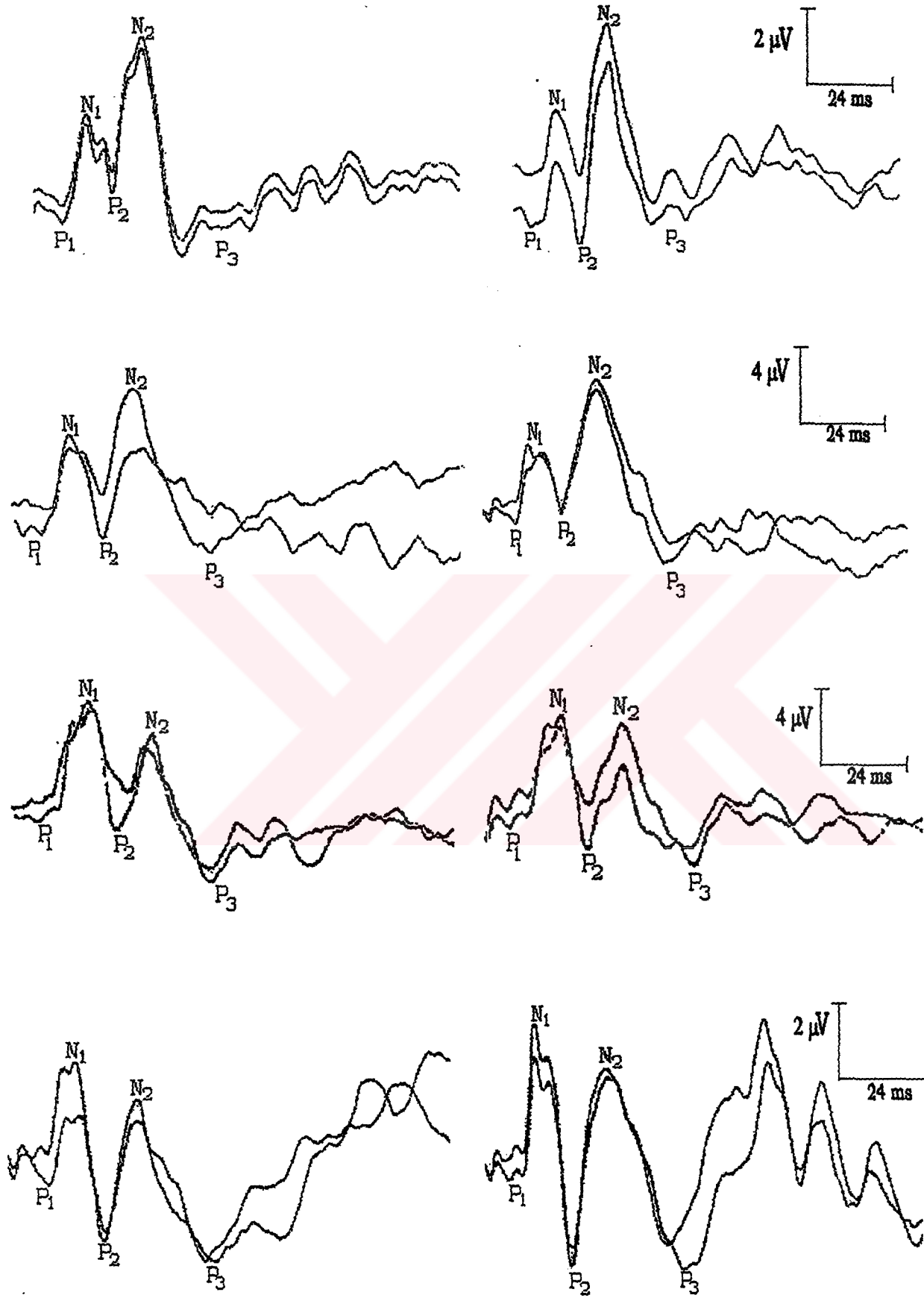
4.6. VEP SONUÇLARI

VEP'ler sağ ve sol gözler flaş uyararı ile ayrı ayrı uyarılarak monoküler olarak kaydedilmiştir. Sekiz grup için elde edilen VEP'lere ait birer örnek Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te sunulmuştur.

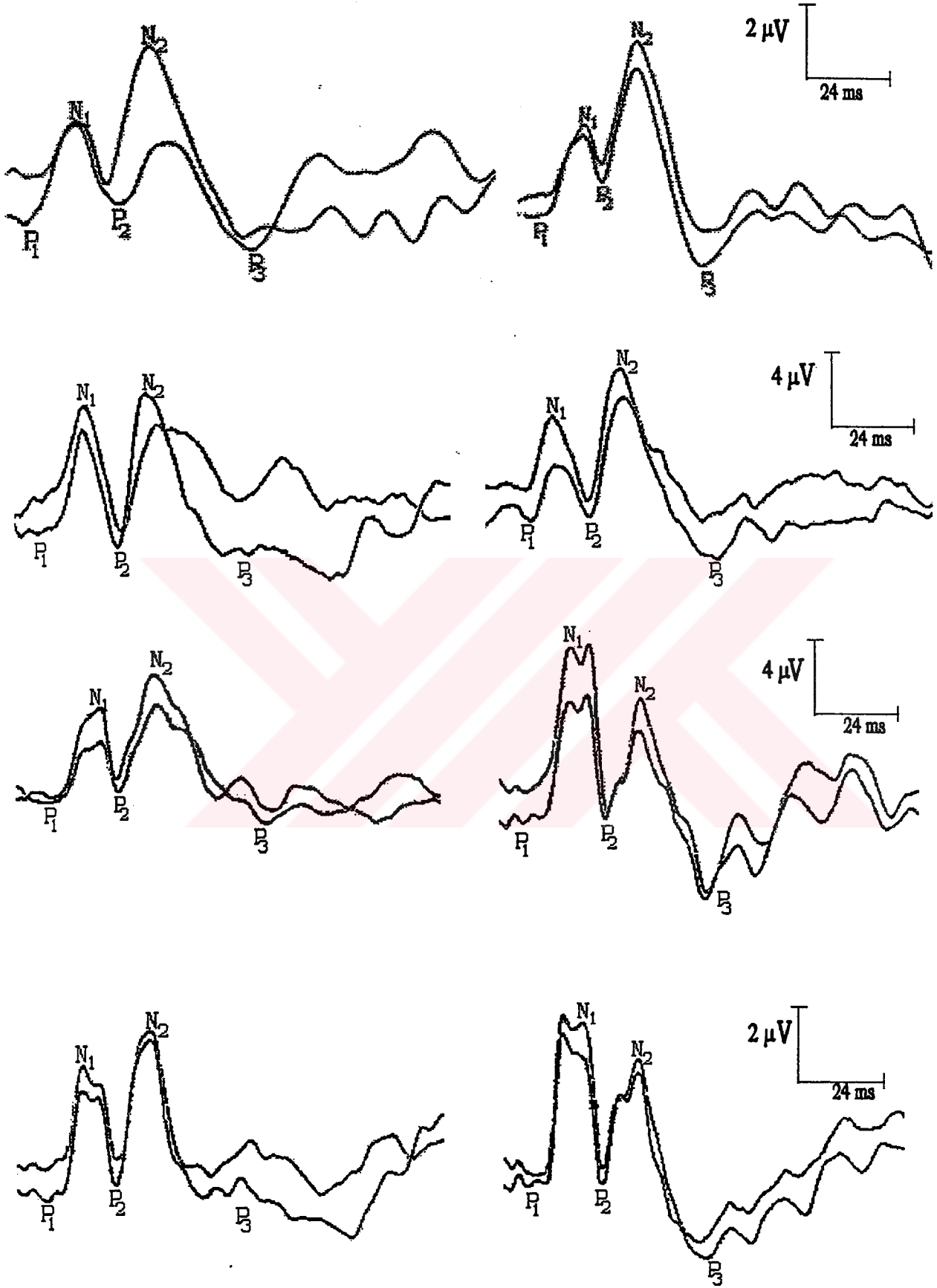
VEP parametrelerinin sağ-sol ve grup farklılıkları varyans analizi (one-way ANOVA) ile değerlendirilmiştir. VEP'lerin latens ve genlikleri karşılaştırıldığında aynı grup için sağ ve sol VEP'ler arasında fark gözlenmemiş, ancak gruplar arasında farklar olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, daha sonraki istatistiksel analizler sağ ve sol gözden kaydedilen VEP parametrelerinin ortalaması alınarak yapılmış ve değerlendirilmiştir.

VEP'lerin latens ve genliklerinin ortalama değerleri, standart sapmaları ve Tukey testi sonuçları Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'te görülmektedir. Bu sonuçlara göre, genç gruplarla karşılaştırıldığında, tüm orta-yaşlı gruplarda P_1 , N_1 , P_2 , N_2 ve P_3 tepe latenslerinin arttığı gözlenmiştir. Ancak, bu artışın yalnızca OK grubunun P_3 bileşeninde anlamlılık taşıdığı tespit edilmiştir. GN grubunda P_1 , ON grubunda P_1 , P_2 , N_2 bileşenlerinin tepe latenslerinin kontrollerine göre anlamlı ölçüde uzadığı saptanmıştır. Ancak diğer gruplar arasında önemli bir farklılığın olmadığı görülmüştür.

Tepeden-tepeye genlik değerleri incelendiğinde; P_2N_2 ve N_2P_3 genliklerinin, ON ve OE gruplarında OK'ya göre önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Diğer gruplarda ise genliklerde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.



Şekil 4.4. Genç gruplardan kaydedilen sol ve sağ VEP'ler ve bileşenleri (Yukarıdan aşağıya doğru GK, GA, GN, GE).



Şekil 4.5. Orta-yaşlı gruplardan kaydedilen sol ve sağ VEP'ler ve bileşenleri. (Yukarıdan aşağıya doğru OK, OA, ON ve OE grupları).

Tablo 4.3. Sekiz grup için gözlenen görsel uyarılma potansiyellerindeki piklerin latens değerlerinin ortalama ve standart sapmaları, Tukey post-hoc testi sonuçları.

GRUPLAR	P ₁ (ms)	N ₁ (ms)	P ₂ (ms)	N ₂ (ms)	P ₃ (ms)
Genç Kontrol (GK)	19.68±2.44	35.72±3.47	52.44±3.95	72.17±3.03	108.41±5.58
Orta-yaş Kontrol (OK)	21.66±3.36	38.04±4.67	52.84±3.87	72.42±6.20	124.60±8.80 * p<0.01
Genç L-arginin (GA)	22.13±3.47	37.68±2.38	53.52±1.58	74.94±5.90	117.24±7.76
Orta-yaş L-arginin (OA)	24.67±5.93	41.20±9.03	57.93±9.89	77.72±11.11	126.72±16.03
Genç L-NAME (GN)	24.63±3.85 ** p<0.01	40.51±4.87	58.85±7.70	78.21±7.29	110.34±8.18
Orta-yaş L-NAME (ON)	25.56±5.58 ** p<0.05	42.18±7.78	62.94±13.23 ** p<0.01	81.48±14.05 ** p<0.01	121.74±12.30
Genç Vit E (GE)	19.98±3.80	37.55±2.79	54.63±1.60	71.18±3.61	111.84±7.15
Orta-yaş Vit E (OE)	20.28±3.20	37.86±2.23	55.32±3.92	69.80±4.57	122.86±11.03

*Genç gruplar - Orta-yaşlı gruplar

**Deney grupları - Kontrol grupları

Tablo 4.4. Sekiz grup için gözlenen görsel uyarılma potansiyellerindeki pikten-pike genlik değerlerinin ortalama ve standart sapmaları, Tukey post-hoc testi sonuçları.

GRUPLAR	P₁N₁ (μV)	N₁P₂ (μV)	P₂N₂ (μV)	N₂P₃ (μV)
Genç Kontrol (GK)	4.53±1.87	5.01±2.46	7.83±3.28	8.86±3.21
Ort-yaş Kontrol (OK)	5.69±2.84	5.74±3.62	8.01±5.10	11.48±6.70
Genç L-arginin (GA)	4.85±2.20	6.78±3.87	7.76±4.49	10.26±2.81
Orta-yaş L-arginin (OA)	5.40±2.40	6.56±2.65	7.76±3.03	9.50±3.81
Genç L-NAME (GN)	6.71±3.47	6.67±2.44	5.60±2.03	7.94±4.08
Orta-yaş L-NAME (ON)	7.32±3.77	5.98±3.78	3.83±2.16 ** p<0.05	7.08±4.05 ** p<0.05
Genç Vit E (GE)	6.65±2.79	7.48±3.21	6.04±2.54	9.70±4.22
Orta-yaş Vit E (OE)	4.95±2.36	5.86±3.80	4.15±2.21 ** p<0.05	5.78±2.23 ** p<0.05

*Genç gruplar - Orta-yaşlı gruplar

**Deney grupları - Kontrol grupları

TARTIŞMA

Hayvanların yaşlara göre sınıflandırılması daha önceki yayınlara (62, 133) uygun olarak yapılmıştır. Buna göre; 3 aylık hayvanlar genç, 12 aylık hayvanlar orta-yaşlı grubu oluşturmuşlardır.

Yaşlılığın mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte bu güne kadar yapılan çalışmalar, yaşlılığının ve birçok hastalığın mekanizmasında lipid peroksidasyonun rolü olduğunu ortaya koymuşlardır (2, 134). Lipid peroksidasyona yol açan birçok ajan içerisinde oldukça reaktif ve kararsız bir gaz olan NO'da yer almıştır. Sinyal iletiminden hücre ölümüne kadar birçok biyolojik fonksiyonda yer alan NO'nun biyolojik etkilerinin moleküler mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak NO'nun bir takım fizyolojik bozuklukların olduğu durumlarda serbest radikal oluşturmada daha etkin rolünün olduğu, normal fizyolojik koşullarda ise protektif etkisinin olduğu ileri sürülmüştür (9). Nitrik oksidin hipokampus, korteks, striatum gibi bölgelere ilaveten görsel sistemde de bol miktarda bulunması yaşa bağlı görsel sistem değişikliklerinde rolünün olabileceğini düşündürmektedir. Literatürde henüz açıklığa kavuşmamış bu soruyu aydınlatmak amacıyla planlanan çalışmamızda, NO yapımını indükleyici ve inhibe edici ajanlar verilerek yaşlanmayla ortaya çıkan görsel sistem değişikliklerinde NO'nun rolünün olup olmadığı araştırılmıştır. Bunun için, NO sentez aminoasidi olan L-arginin 160 mg/kg/gün olarak uygulanmıştır. Literatürde L-arginini daha yüksek dozda kullanan araştırmacılar da söz konusudur (127, 135). Ancak Santamaria ve ark. (136) yaptıkları çalışmada L-argininin prooksidan olduğunu ve lipid peroksidasyonu arttırdığını ortaya koymuşlardır. Dolayısıyla, çalışmamızda L-argininin dozu bu bulgu ve literatürdeki diğer çalışmalar (137) göz önüne alınarak seçilmiştir.

Diğer yandan, NO sentezini inhibe etmek amacıyla L-NAME verilmiştir. Daha önceki çalışmalarda (138), kronik NOS inhibisyonunun hipertansiyon ve glomeruloskleroz'un yanısıra merkezi sinir sistemi hasarlarına da yol açtığı saptanmıştır. Örneğin 6 ay L-NAME alan gruplarda inme(stroke)'nin görülme sıklığının %100 olduğu ve 11 ay alan gruplarda ise %79 oranında motor fonksiyon bozukluklarının geliştiği gözlenmiştir (138). Literatürde daha yüksek dozda kullananlar da bulunmakla birlikte(127, 135), bu bulgular ve önceki deneysel çalışmalara (127, 139) dayanarak L-NAME'in dozu 10 mg/kg/gün olarak seçilmiştir. Nitekim, yapılan kan basıncı ölçümlerinde bu dozun sıçanlarda hipertansif bir etki göstermediği saptanmıştır.

Yaşlılığın mekanizmasında lipid peroksidasyonun önemli rolü olduğunu ifade eden çalışmaların (96, 140) ışığı altında, lipid peroksidasyonun yaşlanmanın oluşturduğu görsel sistem değişikliklerini önlemek amacıyla 30 mg/kg/gün dozunda antioksidan vitamin E kullanılmıştır. Seçtiğimiz dozaj bazı araştırmacılarla (141, 142) uygunluk içerisinde olmakla birlikte, 150-300 mg/kg/gün gibi yüksek dozda vitamin E kullanılan çalışmalar da mevcuttur.

Deney grupları kontrol grupları ile karşılaştırıldığında besin tüketiminin L-NAME alan orta-yaşlı grupta anlamlı olarak azaldığı fakat diğerlerinde herhangi bir fark olmadığı gözlenmiştir (Tablo 4.1). Bu bulgumuz, L-NAME'in henüz bilinmeyen bir mekanizma ile besin alımını azalttığını vurgulayan diğer bir çalışma (143) ile uygunluk göstermektedir. Deney süresince tüm gruplarda vücut ağırlıklarının arttığı ve bu artışın genç gruplarda daha fazla olduğu saptanmıştır (Tablo 4.1).

Yaşa bağlı olarak TBARS seviyesinde oluşan artışın serbest radikallerin yaşlanmaya etkisinin önemli belirteçlerinden biri olduğu birçok çalışmada vurgulanmıştır. Yarı ömürlerinin kısa, konsantrasyonlarının düşük ve reaktif olmaları serbest radikallerin *in vivo* şartlarda ölçülmesini zorlaştırmaktadır. Bu yüzden, oksidan stresin oluşturduğu ikincil ürünlerin ölçülmesine dayanan dolaylı yöntemler geliştirilmiştir. Lipid peroksidasyon indeksi olarak kabul edilen malonil dialdehid (MDA)'i ölçmeye dayalı yöntem kullanılmakla birlikte, biyolojik örnekler üzerine uygulanması bazı sorunlar teşkil etmektedir. Çünkü, tiobarbitürik asit lipid peroksidasyon son ürünü olan MDA dışında diğer bileşiklerle de (aminoasitler, şekerler, lipid oksidasyon ürünleri) etkileşime girmektedir. Dolayısıyla, birçok araştırmacı tarafından peroksidasyon indeksi olarak MDA yerine tiobarbitürik asit reaktif ürünleri (TBARS) adının kullanılması önerilmektedir (70, 144). TBARS yöntemi, ölçülen ürünlerin çoğunluğunu MDA teşkil ettiği için ve çok basit ve hızlı olması nedeniyle tercih edilen bir yöntemdir (145, 146).

Beyin vücutta oksijen tüketiminin en fazla olduğu aerobik bir organdır. Dolayısıyla beynin tükettiği oksijenin çoğu CO₂ ve suya dönüşmekle birlikte, normal koşullarda oksijenin bir kısmı O₂⁻, H₂O₂ ve OH^{*} gibi serbest radikaller oluşturmaktadır. Ayrıca, beyinde serbest radikallerin hedefleri içerisinde yer alan poliansatüre yağ asitlerinin bol miktarda bulunması da beyni oksidatif hasara daha duyarlı hale getirmektedir. Bu nedenle de, serbest radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldıracak çeşitli antioksidan mekanizmalar söz konusudur. Ancak yaşlanmayla birlikte antioksidan savunma sisteminde oluşan azalma ve mitokondrideki elektron transfer zincirinde oluşan değişiklikler serbest radikal oluşumunu arttırarak beyin yaşlanmasına neden olmaktadır. Beyin yaşlanmasının biyokimyasal yapısı henüz tam olarak bilinmemekle birlikte,

yaşlanmanın sinaptozomlardaki, mitokondrideki ve mikrozomlardaki enzim aktivitelerini düşürdüğü bilinmektedir. Bu azalmanın özgül enzimatik proteinlerin dönüşümündeki değişiklikler veya membranların enzim substratlarına karşı geçirgenliğinin değişmesi gibi nedenleri olabilir. Sonuç olarak, TBARS değerlerinin yaşa bağlı olarak artması beyin yaşlanmasında lipid peroksidasyon artışının önemli olduğunu vurgulayan çalışmalarla uygunluk içerisinde (1, 2, 147, 148, 149, 150).

GN ve ON gruplarında kontrollerine göre TBARS seviyesinin arttığı bulunmuştur. NOS inhibitörü olan L-NAME'in lipid peroksidasyonu arttırdığı ve bu artışın orta-yaşlı gruplarda daha fazla olduğu saptanmıştır. Bunun yanında, L-arginin verilen gruplarda da anlamlı olmamakla birlikte TBARS seviyesinin düşmesi NO'nun antioksidan bir etkisi olduğunu ve L-NAME'in NO sentezini inhibe ederek bu etkiyi ortadan kaldırdığını göstermiştir. L-arginin'in anlamlı bir etki göstermemesi uygulanan dozun yetersiz olmasından kaynaklanmış olabilir. Bu bulgularımız birçok araştırmacının yaptıkları çalışmalar (9, 10, 12, 13, 14, 126, 151, 152) ile uyum içerisinde. NO'nun paradoksal etkisi bu molekülün redoks durumuyla açıklanmaktadır. Fizyolojik ortamda NO serbest radikal olan nitrojen monoksit (NO^*) veya nitrozonyum katyonu (NO^+) şeklinde bulunabilmektedir. Eğer dokunun redoks durumu NO^* oluşumuna uygun ise nörotoksik bir etki oluşurken, NO^+ oluşumuna elverişli olması NMDA reseptör aktivitesini baskılayarak nöroprotektif bir etki göstermektedir (124, 126). Diğer yandan, bazı araştırmacılar da NO'nun lipid peroksidatif etkisinin patolojik koşullarda ortaya çıktığına işaret etmiştir. Zira ortamda çok fazla süperoksit iyonu bulunması halinde NO'nun lipid peroksidasyona neden olduğu, süperoksit iyonunun az olduğu durumlarda antioksidan etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu etkinin NO ile O_2^- arasındaki oranla ifade edilebileceği, bu oranın birden küçük olması durumunda NO'nun oksidan, bire eşit veya büyük olduğu durumlarda antioksidan gibi davrandığı öne sürülmüştür (11, 122, 123, 153).

Diğer yandan, vitamin E verilen gruplarda lipid peroksidasyonun azaldığı gözlenmiş fakat, bu azalma anlamlı bulunmamıştır. Daha yüksek dozlarda vitamin E kullanılarak bu etkinin belirgin hale gelebileceği düşünülmektedir.

NO oksijen aracılığıyla kolaylıkla nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-)'a yükseltgenen yarı ömrü çok kısa olan bir moleküldür. Bu nedenle biyolojik dokularda doğrudan ölçülmesi zordur. Son yıllarda anında ölçüm yapan sensörler geliştirilmesine rağmen, NO yıkım ürünü olan nitriti ölçmeye dayanan dolaylı yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Biz de çalışmamızda NO indeksi olarak nitrit'i kullandık. Yapılan deneyler sonucunda yaşla birlikte nitrit seviyesinin anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. Nitrit düzeyinin L-arginin verilen gruplarda önemli ölçüde arttığı gözlenirken, L-NAME

verilen gruplarda nitrit düzeyinin azaldığı saptanmıştır. Literatürle de (47, 136, 154, 155) uyumlu olan bu bulgularımız nitrit tayininin NO seviyesini belirlemede uygun bir yöntem olduğunu göstermektedir. Vitamin E verilen gruplarda ise nitrit seviyesinin azaldığı, fakat bu azalmanın orta-yaşlı grupta daha önemli olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışmalar antioksidan bir bileşik olan vitamin E'nin, oksidan bir serbest radikal olan NO₂'i ortamdan temizlediğini ortaya koymuşlardır (150, 155, 156, 157). Dolayısıyla, bulgumuz bu çalışmalarla uygunluk içerisindedir.

Çeşitli kimyasal ajanların ve toksik maddelerin görsel sistem üzerindeki etkilerini inceleyen birçok araştırma yapılmıştır (43, 44, 45, 158). Ancak, görsel sistemde bol miktarda bulunan ve görsel mekanizmanın her aşamasında önemli bir rolü olduğu bilinen NO'nun görsel sistem üzerindeki etkisi konusunda çok az çalışılmış olmasının yanında, konuyu NO'nun yaşlanmayla ilişkisi yönünden inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla; NO'nun yaşlanmayla birlikte görsel sistemde ortaya çıkan değişikliklerdeki rolünü araştırmak için planlanan bu projemizde, elektrofizyolojik parametrelerden biri olarak görsel uyarılma potansiyelleri tercih edilmiştir. VEP'ler görsel sistemin fonksiyonel araştırılmasında ve optik yol patolojilerinin değerlendirilmesinde kullanılan duyarlı ve güvenilir bir yöntemdir. Özellikle P₁₀₀ latensinin optik yol patolojisine paralel olarak uzadığı dolayısıyla bu parametrenin klinik amaçla kullanılabilceği birçok çalışmada gösterilmiştir (40). Sıçanların görsel sisteminde yapılan çalışmalarda, kaydedilen bu potansiyellerin insan görsel sisteminin incelenmesi yönünden iyi bir model olduğu vurgulanmıştır (40).

Orta-yaşlı grupta genç kontrole göre P₃ latensinin uzadığı diğer bileşenlerin ise önemli düzeyde değişmediği gözlenmiştir. Orta-yaşlı grupta P₃ latensinin uzaması yaşlanmanın görsel sistem üzerine önemli etkisi olduğunu vurgular. Zira; bu bileşen optik yoldaki değişiklikleri erken gösteren bir parametre olarak kabul edilmektedir (35, 159).

L-NAME'in orta-yaşlı grupta genç gruba göre daha fazla VEP değişikliklerine neden olduğu görülmüştür. Genç grupta lipid peroksidasyon artışının, orta-yaşlı grupta ise lipid peroksidasyon artışına paralel olarak nitritin azalmasının bu değişikliklere neden olduğu söylenebilir. Ayrıca, L-NAME'in görsel uyarılma potansiyellerinde yol açtığı bu değişiklikler nörotoksik etkisine bağlanabilir. Literatürde bu konu ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmadığından bu sonucumuz detaylı olarak tartışılmamıştır.

L-Argininin VEP bileşenlerini uzattığı ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. Bu bulgumuz Oku ve ark.'nın (126) çalışması ile uygunluk içerisindedir.

Çalışmamızın sonuçları şu şekilde özetlenebilir:

1. Yaşlanmanın görsel sistemi etkilediği gözlenmiştir.
2. Yaşlanmada oksidan stresin ve lipid peroksidasyonun önemli olduğunu vurgulayan çalışmaları desteklemiştir.
3. NO'nun oksidan hasarı engelleyen önemli bir antioksidan olduğunu göstermiştir.
4. NO'nun görsel sistem ve yaşlanma üzerindeki etkilerini incelemiştir.
5. Yaşlanmanın ve L-NAME'in VEP'lerin farklı bileşenlerini etkilemesi etki mekanizmalarının farklı olabileceğini ima etmiştir.



KAYNAKLAR

1. Dice, J.F.: Cellular and molecular mechanism of aging. *Physiol. Rev.*, 73(1): 149-159, 1993.
2. Pal Yu, B.: Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol.Rev.*, 74 (1): 139-162, 1994.
3. Kenneth, B.B. and Ames, N.B.: The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.*, 78(2): 547-581, 1998.
4. Schmidt, K.: Physiology and pathophysiology of senescence. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 69 (3): 150-153, 1999.
5. Cheeseman, K.H., Slater, T.F.: An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.*, 49(3): 481-493, 1993.
6. Gutteridge, J.M.C.: Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-Biol. Interact.*, 91: 133-140, 1994.
7. Groot, H., Hegi, U., Sies, H.: Loss of α -tocopherol upon exposure to nitric oxide or sydnonimine SIN-1. *FEBS.*, 315(2): 139-142, 1993.
8. Escames, G., Guerrero, J.M., Reiter, R.J., Garcia, J.J., Munoz-Hoyos, A., Ortiz, G.G., Oh, C.S.: Melatonin and vitamin E limit nitric oxide induced lipid peroxidation in rat brain homogenates. *Neurosci. Lett.*, 230: 147-150, 1997.
9. Hogg, N. and Kalyanaraman, B.: Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1411: 378-384, 1999.
10. Wink, D.A., Cook, J.A., Pacelli, R., DeGraff, W., Gamson, J., Liebmann, J., Krishna, M.C., Mitchell, J.B.: The effect of various nitric oxide-donor agents on hydrogen peroxide toxicity: A direct correlation between nitric oxide formation and protection. *Arch. Biochem. Biophys.*, 331(2): 241-248, 1996.
11. O'Donnell, V.B., Chumley, P.H., Hogg, N., Bloodsworth, A., Darley-Usmar, V.M., Freeman, B.A.: Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: Kinetics of reaction with lipid peroxy radicals and comparison with α -tocopherol. *Biochemistry.*, 36: 15216-15223, 1997.
12. Lancelot, E., Revaud, M.L., Boulu, R.G., Plotkine, M., Callebert, J.: A microdialysis study investigating the mechanisms of hydroxyl radical formation in rat striatum exposed to glutamate. *Brain Res.*, 809: 294-296, 1998.
13. Ho, F.M., Liu, S.H., Liao, C.S., Huang, P.J., Shiah, S.G., Lin-Shiau, S.Y.: Nitric oxide prevents apoptosis of human endothelial

- cells from high glucose exposure during early stage. *J. Cell. Biochem.*, 75(2): 258-63, 1999.
14. Van der Veen, R.C., Roberts, L.J.: Contrasting roles for nitric oxide and peroxyxynitrite in the peroxidation of myelin lipids. *J. Neuroimmunol.*, 95: 1-7, 1999.
 15. Satya-Murti, S., Howard, L., Krohel, G., Wolf, B.: The spectrum of neurologic disorder from vitamin E deficiency. *Neurology*, 36: 917-921, 1986.
 16. Morrow, J.M.: Neurologic complications of vitamin E deficiency: Case report and review of the literature. *Bull. Clin. Neurosci.*, 50: 53-60, 1985.
 17. Chiappa, K.H.: *Evoked potentials in clinical medicine*. New York: Raven Press; 1983.
 18. La Marche, J.A., Dobson, W.R., Cohn, N.B., Dustman, R.E.: Amplitude of visually evoked potentials to patterned stimuli: Age and sex comparisons. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 65(2); 81-85, 1986.
 19. Diaz, F., Amenedo, E. Ageing effects on flash visual evoked potentials (FVEP) recorded from parietal and occipital electrodes. *Neurophysiol. Clin. Nov*; 28(5): 399-412, 1998.
 20. Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. : Part 5, Central visual pathway. *Principles of Neural Science*, pp: 702-748 Appleton & Lange, 1991.
 21. Vander, A.J., Sherman, J.A., Luciano, D.S.: Part 2.9, The sensory systems. *Human Physiology*, pp: 249-257, 1996.
 22. Carbe, C., Arnaud, F., Bolzinger, C.J.: Effect of a dopaminergic agonist, piribedil (Trivastal 50 mg LP) on visual and spatial integration in elderly subjects. *J.Neurol.* 239 (Suppl. 1): 22-27, 1992.
 23. Guyton, A.C.: Section 9, The Nervous system, *Textbook of Medical Physiology.*, 1996.
 24. Darnell, J.: Sensory transduction: The visual and olfactory systems. *Molecular Cell Biology.*, pp: 971-978, 1995.
 25. Demonasterio, F.M., Schein, S.J., McCrane, E.P.: Staining of blue-sensitive cones of the macaque retina by a fluorescent dye. *Science.* 213(4513):1278-81, 1981.
 26. Ganong, W.F. : Section 3, Vision, pp: 287-354, *Review of Medical Physiology*, 1996.
 27. Gouras, P.: Identification of cone mechanism in monkey ganglion cells. *J. Physiol. Lond.*199(3): 533-47, 1968.

28. Livingstone, M., Hubel, D.: Segregation of form, color, movement, and depth : Anatomy, physiology, and perception. *Science*. 240(4853): 740-9, 1988.
29. Hendrickson, A.E., Hunt, S.P., Wu, J.Y.: Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in monkey striate cortex. *Nature*. 292(5824) : 605-7, 1981.
30. Horton, J.C., Hubel, D.H.: Regular patchy distribution of cytochrome oxidase staining in primary visual cortex of macaque monkey. *Nature*. 292 (5825): 762-4, 1981.
31. Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M.: Section VI, Perception, pp: 365-385, *Essentials of Neural Science and Behavior*. Appleton & Lange, 1995.
32. Barlow, J.S.: An electronic method for detecting evoked responses of the brain and reproducing their average waveform. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 9: 340-343, 1957.
33. Dawson, G.E.: A summation technique for the detection of small evoked potentials. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 6: 65-84, 1954.
34. Sokol, S.: Visually evoked potentials: Theory, techniques and clinical applications. *Sur. Ophthalmol.*, 21: 18-43, 1976.
35. Halliday, A.M.: Visually evoked responses in optic nerve disease. *Transactions of the ophthalmological society of United Kingdom*. 96 (3): 372-376, 1976.
36. Hetzler, B.E., Boyes, W.C., Creason, J., Dyer, R.S.: Temperature dependent changes in visual evoked potentials of rats. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 70:137-54, 1988.
37. Dyer, R.S., Clark, C.C., Boyes, W.K.: Surface distribution of flash-evoked and pattern-reversal evoked potentials in hooded rats. *Brain Res. Bull.*, 18: 227-234, 1987.
38. Dyer, R.S.: The use of sensory evoked potentials in toxicology. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 5: 24-40, 1985.
39. Dyer, R.S., Jensen K.F., Boyes, W.K.: Focal lesions of visual cortex: Effects on visual evoked potentials in rats. *Exp. Neurol.*, 95(1): 100-115, 1987.
40. Hudnell, H.K., Boyes, W.K., Otto, D.A.: Rat and human visual evoked potentials recorded under comparable conditions: A preliminary analysis to address the issue of predicting human neurotoxic effects from rat data. *Neurotoxicol. and Teratol.*, 12: 391-398, 1990.
41. Halliday, A.M., McDonald, W.L., Mushin, J.: Delayed visual evoked response in optic neuritis. *Lancet.*, 1: 982-985, 1972.

42. Boyes W.: Testing visual system toxicity using visual evoked potentials. In vulnerable brain. Vol: 1 (Malnutrition and Toxins). R. Isaasson and K. Jensen EDS. Pleauin. New York. 1991.
43. Xintaras, C., Johnson, B.L., Ulrich, C.E., Terril, R.E., Sobecki, M.F.: Application of evoked response technique in air pollution toxicology. *Toxicol. App. Pharmacol.*, 8: 77-87, 1966.
44. Otto, D.A., Hudnell, H.K., Boyes, W.K., Janssen, R., Dyer, R.: Electrophysiological measures of visual and auditory function as indices of neurotoxicity. *Toxicology.*, 49: 205-18, 1988.
45. Otto, D.A., Hudnell, H.K.: The use of visual and chemosensory evoked potentials in environmental and occupational health. *Environ. Res.*, 62:159-171, 1993.
46. Brin, M.F., Pedley, T.A., Lovelace, R.E., Emerson, R.G., Gouras, P., MacKay, C., Kayden, H.J., Levy, J., Baker, H.: Electrophysiologic features of abetalipoproteinemia: functional consequences of vitamin E deficiency. *Neurology.*, 36(5): 669-73, 1986.
47. Yamada, K.: No changes in cerebrospinal fluid levels of nitrite, nitrate and cyclic GMP with aging. *J Neural Transm.*, 104(8-9):825-31, 1997.
48. Kanda, K.: Expression of neuronal nitric oxide synthase in spinal motoneurons in aged rats. *Neurosci. Lett.*, 219: 41-44, 1996.
49. Brody, H.: The aging brain. *Acta Neurol. Scand.*, 137: 40-44, 1992.
50. Giacobini, E.: Cholinergic receptors in human brain: Effects of aging and Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.*, 27(4): 548-560, 1990.
51. Mc Entee, W.J., Crook, T.H.: Serotonin, memory and aging brain. Memory assesment. *Psychopharmacol.*, 103(2): 143-149, 1991.
52. Mc Entee, W.J., Crook, T.H.: Glutamate: Its role in learning, memory and the aging brain. *Psychopharmacol.*, 111(4): 391-401, 1993.
53. Penzes, L., Fischer, H.D., Noble, R.C.: Some aspects on the relationship between lipids, neurotransmitters and aging. *Z. Gerontol.*, 26(2): 65-69, 1993.
54. Pokras, R.S.: A possible role of glutamate in the aging process. *Med. Hypotheses.*, 42(4): 253-256, 1994.
55. Mc Entee, W.J., Crook, T.H.: Age-associated memory impairment: A role for catecholamines. *Neurol.*, 40: 526-530, 1990.

56. Carlson, A.: Brain neurotransmitter in aging and dementia: Similar changes across diagnostic dementia groups. *Gerontol.*, 33: 159-167, 1987.
57. Czeptia, D., Daw, N.W., Reid, S.N.M.: Glycine at the NMDA receptor in cat visual cortex: Saturation and changes with age. *J. Neurophysiol.*, 75(1): 311-317, 1996.
58. Hayflick, L.: Current theories of biological aging. *Federation Pro.*, 34: 9-13, 1975.
59. Hayflick, L.: Recent advances in the cell biology of aging. *Mech. Aging Dev.*, 14: 59-79, 1980.
60. Rattan, S.I.S.: DNA damage and repair during cellular aging. *Int. Rev. Cytol.*, 116: 47-88, 1989.
61. Laganiere, S. and Pal Yu, B.: Effect of chronic food restriction in aging rats. I. Liver subcellular membranes. *Mech. Aging Dev.*, 48: 207-219, 1989.
62. Schumacher, D.L, Vessey, D.A., Wang, R.K., James, J.L. and Maloney, A.: Age-dependent alterations in the physicochemical properties of rat liver microsomes. *Mech. Aging Dev.*, 27: 207-217, 1984.
63. Witting, L.A. and Horwitt, M.K.: Effect of degree of fatty acid unsaturation in tocopherol deficiency-induced creatinuria. *J. Nutr.*, 82: 19-23, 1964.
64. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Cross, C.E.: Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* 19(6): 598-620, 1992.
65. Butler, J., Koppenol, W.H., Margoliash, E.: Kinetics and mechanism of the reduction of ferricytochrome c by the superoxide anion. *J. Biol. Chem.*, 257(18): 10747-50, 1982.
66. Hassan, H.M., Fridovich, L.: Chemistry and biochemistry of superoxide dismutases. *Eur. J. Rheumatol. Inflamm.*, 4(2): 160-72, 1981.
67. Auroma, O.L., Halliwell, B., Gajewski, E., Dizdaroğlu, M.: Copper ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, 273(Pt 3): 601-4, 1991.
68. Traber, M.G.: Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants. *Miner. Electrolyte Metab.*, 23: 135-139, 1997.
69. Sadrzadeh, S.M., Graf, E., Panter, S.S., Hallaway, P.E., Eaton, J.W.: Hemoglobin and biologic fenton reagent. *J. Biol. Chem.*, 259(23): 14354-6, 1984.

70. Gutteridge, J.M.C.: Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.*, 41(12): 1819-28, 1995.
71. Gutteridge, J.M.C., Stocks, J.: Caeruloplasmin : Physiological and Pathological Perspectives. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 14(4): 257-329, 1981.
72. Marx, G., Chevon, M.: Site-specific modification of albumin by free radicals. Reaction with copper (II) and ascorbate. *Biochem.J.*, 236(2): 397-400, 1986.
73. Wolff, S.P., Dean, R.T.: Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis, *Biochem.J.*, 234(2): 399-403, 1986.
74. Zoppini, G., Targher, G., Monaune, T., Faccini, G., Pasqualini, E., Martinelli, C., Zenari, M., Muggeo, M.: Increase in circulating products of lipid peroxidation in smokers with IDDM. *Diabetes Care.*, 19(11): 1233-36, 1996.
75. Gutteridge J.M.C., Halliwell, B.: The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends. Biochem. Sci.*, 15(4):129-135, 1990.
76. Koster, J.F., Biemond, P., Stam, H.: Lipid peroxidation and myocardial ischaemic damage: cause or consequence? *Basic. Res. Cardiol.*, 82 Suppl 1: 253-60, 1987.
77. Clemens, M.R., Waller, H.D.: Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem. Phys. Lipids.*, 45(2-4): 251-68, 1987.
78. Freeman, B.A., Crapo, J.D.: Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, 47(5): 412-26, 1982.
79. Frank. L., Massaro. D.: Oxygen Toxicity. *Am. J. Med.*, 69: 117-126, 1980.
80. Winyard, P., Lunec, J., Brailsford, S., Blake, D.: Action of free radical generating systems upon the biological and immunological properties of caeruloplasmin. *Int. J. Biochem.*, 16(12): 1273-8, 1984.
81. Sagone, A.L., Greenwald, J., Kraut, E.H., Bianchine., J, Sing, D.: Glucose : a role as a free radical scavenger in biological systems. *J.Lab.Clin.Med.*, 101: 97 97-104, 1983.
82. Kasai, H., Crain, P.F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Dotsuyama, A., Tanooka, H.: Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis.*, 7(11): 1849-51, 1986.
83. Kasai, H., Nishimura, S., Kurokawa, Y., Hayashi, Y.: Oral administration of the renal carcinogen, potassium bromate, specifically produces 8- hydroxydeoxyguanosine in rat target organ DNA. *Carcinogenesis.*, 8(12): 1959-61, 1987.

84. Ji, L.L., Stratman, F.W., Lardy, H.A.: Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise. *Arch. Biochem. Biophys.*, 263(1): 150-60, 1988.
85. Lawrence, R.A., Parkhill, L.K., Burk, R.F.: Hepatic cytosolic non selenium-dependent glutathione peroxidase activity : its nature and the effect of selenium deficiency. *J.Nutr.*, 108(6): 981-7, 1978.
86. Leung, H.W., Morrow, P.E.: Interaction of glutathione and ascorbic acid in guinea pig lungs exposed to nitrogen dioxide. *Res.Comm.Chem.Pathol. Pharmacol.*, 31(1): 111-8, 1981.
87. Leung, K.H., Post, G.B., Menzel, D.B.: Glutathione S-sulfonate a sulfurdioxide metabolite, as a competitive inhibitor of glutathione S-transferase, and its reduction by glutathione reductase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 77(3): 388-94, 1985.
88. Leung, H.W., Vang, M.J., Mavis, R.D.: The cooperative interaction between vitamin E and vitamin C in suppression of peroxidation of membrane phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta.*, 664(2): 266-72, 1981.
89. Collins, A.R., Dusinska, M., Gedik, C.M., Stetina, R.: Oxidative damage to DNA: Do we have a reliable biomarker ? *Environ.Health.Perspec.*, 104(3): 464- 469, 1996.
90. Davies, K.J., Godberg, A.L.: Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. *J. Biol. Chem.*, 262(17): 8227-34, 1987.
91. Davies, K.J., Goldberg, A.L.: Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 262(17): 8220-6, 1987.
92. Cand, F. and Verdeti, J.: Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats. *Free Radical Biol. Med.*, 7: 59-63, 1989.
93. Mizuno, Y. and Ohta, K.: Regional distribution of thiobarbituric acid-reactive products, activities of enzymes regulating the metabolism of oxygen free radicals and some of the related enzymes in adult and aged rat brain. *J. Neurochem.*, 46: 1344-1352, 1986.
94. Barja de Quiroga, G., Perez-Campo, R., Lopez-Torres, M.: Changes on cerebral antioxidant enzymes, peroxidation on the glutathione system of frogs after aging and catalase inhibition. *J. Biochem.*, 272: 247-250, 1990.
95. Devasagayam, T.P.A.: Decreased peroxidative potential in rat brain microsomal fractions during aging. *Neurosci. Lett.*, 103: 92-96, 1989.

96. Geremia, E., Baratta, D., Giordano, Z.R., Pinizotto, M.R., L'Rosa, M.G., Garazzo, A.: Antioxidant enzymatic systems in neuronal and glial cells enriched fractions of rat brain during aging. *Neurochem. Res.*, 15(7): 719-723, 1990.
97. Wendel, A., Cikryt, P.: The level and half-life of glutathione in human plasma. *FEBS-Lett.*, 120(2): 209-11, 1980.
98. Cheng, L., Kellogg, E.W., Packer, L.: Photoinactivation of catalase. *Photochem. Photobiol.*, 34(1):125-9, 1981.
99. Thomas, C.E., Aust, S.D.: Rat liver microsomal NADPH-dependent release of iron from ferritin and lipid peroxidation. *J. Free. Radic. Biol. Med.*, 1(4): 293-300, 1985.
100. Lopez-Torres, M., Perez-Campo, R., Fernandez, A., Barba, C., Barja de Quiroga, G.: Brain glutathione reductase induction increases early survival and decreases lipofuscin accumulation in aging frogs. *J. Neurosci. Res.*, 34(2): 233-42, 1993.
101. Buettner, G.R.: Ascorbate autoxidation in the presence of iron and copper chelates. *Free. Radic. Res. Commun.*, 1(6): 349-53, 1986.
102. Al-Turk, W.A., Stohs, S.J., El-Rashidy, F.H., Othman, S., Shaheen, O.: Changes in glutathione reductase and glutathione-S-Transferase as a function of cell concentration and age. *Pharmacology.*, 34(1): 1-8, 1987.
103. Al-Turk, W.A., Stohs, S.J.: Hepatic glutathione content and aryl hydrocarbon hydroxylase activity of acetaminophen-treated mice as and function of age. *Drug. Chem. Toxicol.*, 4(1): 37-48, 1981.
104. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.: Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol.*, 186: 1-85, 1990.
105. Flone, L., Gunzler, W.A., Schock, H.H.: Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS-Lett.*, 32(1):132-4, 1973.
106. Combs, G.F.Jr., Noguchi, T., Scott, M.L.: Mechanisms of action on selenium and vitamin E in protection of biological membranes. *Fed. Proc.*, 34(11): 2090-5, 1975.
107. Sokol, R.J.: Vitamin E deficiency and neurologic disease. *Ann. Rev. Nutr.*, 8: 351-73, 1988.
108. Brin, M.F., Fetell, M.R., Green, P.H.A., Kayden, H.J., Hays, A.P., Behrens, M.M., Baker, H.: Blind loop syndrome, vitamin E malabsorption, and spinocerebellar degeneration. *Neurology*, 35: 338-342, 1985.
109. Muller, D.P.R., Lloyd, J.K., Wolff, O.H.: Vitamin E and neurologic function. *Lancet*, 1:225-228, 1983.

110. Kaplan, P.W., Rawal, K., Erwin, C.W., D'Souza, B.J., Spock, A.: Visual and somatosensory evoked potentials in vitamin E deficiency with cystic fibrosis. *Electroencephal. Clin. Neurophysiol.*, 71: 266-272, 1988.
111. Messenheimer, J.A., Greenwood, R.S., Tennison, M.B., Brickley, J.J., Ball, C.J.: Reversible visual evoked potential abnormalities in vitamin E deficiency. *Ann. Neurol.*, 15: 499-501, 1984.
112. Larsen, P.D., Mock, M.D., O'Connor, P.S.: Vitamin E deficiency associated with vision loss and bulbar weakness. *Ann. Neurol.*, 18: 725-727, 1985.
113. Robison, W.G., Kuwabara, T., Bieri, J.G.: Vitamin E deficiency and the retina: photoreceptor and pigment epithelial changes. *Invest. Ophthalmol. Visuai Sci.*, 18(7): 683-690, 1979.
114. Behl, C.: Vitamin E and other antioxidants in neuroprotection. *Int. J. Nutr. Res.*, 69(3): 213-219, 1999.
115. Frei, B., Keaney, J.F., Retsky, K.L., Chen, K.: Vitamins C and E and LDL oxidation. *Vitamins and Hormones.*, 52: 1-34, 1996.
116. Rivett, A.J.: High molecular mass of intracellular proteases. *Biochem. J.*, 263(3): 625-33, 1989.
117. Hölscher, C.: Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci.*, 20(7): 298-303, 1997.
118. Rodeberg, D.A., Chaet, M.S., Bass, R.C., Arkovitz, M.S., Garcia, V.F.: Nitric oxide: An Overview. *The Am. J. Surgery.*, 170: 292-303, 1995.
119. McCann, S.M.: The Nitric oxide hypotesis of brain ageing. *Exp. Gerontol.*, 32(4/5): 431-440, 1997.
120. Moncada, S., Higgs, A.: The L-arginine-nitric oxide pathway. *The N. Eng. J. Med.*, 30:2002-2012, 1993.
121. Green, I.C. and Chabrier, P.E.: Nitric oxide: from basic research to clinical application. *DDT.*, 4(2): 47-49, 1999.
122. Wink, D.A., Cook, J.A., Pacelli, R., Liebmann, J., Krishna, M.C., Mitchell, J.B.: Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species. *Toxicol. Lett.*, 82/83: 221-226, 1995.
123. Cudeiro, J., Rivadulla, C.: Sight and insight-on the physiological role of nitric oxide in the visual system. *Trends Neurosci.*, 22: 109-116, 1999.

124. Goldstein, I.M., Ostwald, P., Roth, S.: Nitric oxide: A review of its role in retinal function and disease. *Vision Res.*, 36(18): 2979-2994, 1996.
125. Vorwerk, C.K., Hyman, B.T., Miller, J.W., Husain, D., Zurakowski, D., Huang, P.L., Fishman, M.C., Dreyer, E.B.: The role of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in retinal excitotoxicity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 38: 2038-2044, 1997.
126. Oku, H., Yamaguchi, H., Sugiyama, T., Kojima, S., Ota, M., Azuma, I.: Retinal toxicity of nitric oxide released by administration of a nitric oxide donor in the albino rabbit. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 38: 2540-2544, 1997.
127. Wang, Z.Y., Hakanson, R.: Role of nitric oxide (NO) in ocular inflammation. *Br. J. Pharmacol.*, 116: 2447-2450, 1995.
128. Parks, D.J., Cheung, M.K., Chan, C.C., Roberge, F.G.: The role of nitric oxide in uveitis. *Arch. Ophthalmol.*, 112: 544-546, 1994.
129. Wasowicz, W., Jean, N., Peratz, A.: Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum. Importance of extraction pH and influence of sample, preservation and storage. *Clin. Chem.*, 39(12): 2522-2526, 1993.
130. Sandercock, P., Williams, H.: Medical treatment of acute ischemic stroke. *The Lancet.*, 339-49, 1992.
131. Scatton, B.: Excitatory aminoacid receptor antagonists. A novel treatment for ischemic cerebrovascular diseases. *Science*, 55: 25-6, 1994.
132. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Far, A.L., Randel, R.J.: Protein measurement with folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
133. Vatassery, G.T., Angerhofer, C.K., Knox, C.A.: Effect of age on vitamin E concentrations in various regions of the brain and a few selected peripheral tissues of the rat, and on the uptake of radioactive vitamin E by various regions of rat brain. *J. Neurochem.*, 43: 409-412, 1984.
134. Baynes, J.W.: Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes.*, 40: 405-412, 1991.
135. Yamada, K., Nabeshima, T.: Simultaneous measurement of nitrite and nitrate levels as indices of nitric oxide release in the cerebellum of conscious rats. *J. Neurochem.*, 68: 1234-1243, 1997.
136. Santamaria, A., Santamaria, D., Diaz-Munoz, M., Espinoza-Gonzalez, V., Rios, C.: Effects of N ω -nitro-L-arginine and L-

- arginine on quinolinic acid-induced lipid peroxidation. *Toxicol. Lett.*, 93: 117-124, 1997.
- 137.** Catanzaro, O.L., Marina-Pendes, M.G., Hope, S.I., Zucollo, A., Dominguez, A.: Streptozotocin-induced hyperglycemia is decreased by nitric oxide inhibition. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 27: 2043-2047, 1994.
- 138.** Zatz, R., Baylis, C.: Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension*, 32(6): 1-14, 1998.
- 139.** Yamada, K., Noda, Y., Nakayama, S., Komori, Y., Sugihara, H., Hasegawa, T., Nabeshima, T.: Role of nitric oxide in learning and memory and in monoamine metabolism in the rat brain. *Br. J. Pharmacol.*, 115: 852-858, 1995.
- 140.** Ceballos-Picot, I., Nicole, A., Clement, M., Bourre, J.M., Sinet, P.M.: Age-related changes in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in brains of control and transgenic mice overexpressing copper-zinc superoxide dismutase. *Mutation Res.*, 275: 281-293, 1992.
- 141.** Rose, G.P., Dewar, A.J., Stratford, I.J.: Protection against misonidazole-induced neuropathy in rats: a biochemical assessment. *Toxicol. Lett.*, 17(1-2): 181-5, 1983.
- 142.** Suzuki, J., Abiko, H., Mizoi, K., Oba, M., Yoshimoto, T.: Protective effect of phenytoin and its enhanced action by combined administration with mannitol and vitamin E in cerebral ischaemia. *Acta Neurochir (Wien)*, 88(1-2): 56-64, 1987.
- 143.** Morley, J.E., Kumar, V.B., Mattammal, M.B., Farr, S., Morley, P.M.K., Flood, J.F.: Inhibition of feeding by a nitric oxide synthase inhibitor: Effect of aging. *Eur. J. Pharmacol.*, 311: 15-19, 1996.
- 144.** Bonnefont, D., Legrand, A., Peynet, J., Emerit, J., Delattre, J., Galli, A.: Distribution of thiobarbituric acid-reactive substances in lipoproteins and proteins in serum. *Clin. Chem.*, 35: 2054-2058, 1984.
- 145.** Esterbauer, H., Cheeseman, K.: Determination of aldehydic lipid-peroxidation products malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods. Enzymol.*, 186: 407-421, 1990.
- 146.** Holley, A.E., Cheeseman, K.H.: Measuring free radical reactions in vivo. *Br. Med. Bull.*, 49(3): 494-505, 1990.
- 147.** Vanella, A., Villa, R.F., Gorini, A., Campisi, A., Giuffrida-Stella, A.M.: Superoxide dismutase and cytochrome oxidase activities in light and heavy synaptic mitochondria from rat cerebral cortex during aging. *J. Neurosci. Res.*, 22: 351-355, 1989.
- 148.** Castorina, C., Campisi, A., Di Giacomo, C., Sarrenti, V., Russo, A., Vanella, A.: Lipid peroxidation and antioxidant enzymatic

systems in rat retina as a function of age. *Neurochem. Res.*, 17(6): 599-604, 1992.

149. Sawada, M., Carlson, J.C.: Changes in superoxide radical and lipid peroxide formation in the brain, heart and liver during the life time of the rat. *Mech. Ageing Dev.*, 41: 125-137, 1987.
150. Meydani, M., Macauley, J.B., Blumberg, J.B.: Influence of dietary vitamin E, selenium and age on regional distribution of α -tocopherol in the rat brain. *Lipids.*, 21(12): 786-791, 1986.
151. Gupta, M.P., Evanoff, V., Hart, C.M.: Nitric oxide attenuates hydrogen peroxide-mediated injury to porcine pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol.*, 272(16): L1133-L1141, 1997.
152. Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M., Freeman, B.A.: Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. *The J. Biol. Chem.*, 269(42): 26066-75, 1994.
153. Kashii, S., Mandai, M., Kikuchi, M., Honda, Y., Tamura, Y., Kaneda, K., Akaike, A.: Dual actions of nitric oxide in N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity in cultured retinal neurons. *Brain Res.*, 711: 93-101, 1996.
154. Gorbunov, N., Esposito, E.: Activation of glutamate receptors stimulates the formation of nitrite in synaptosomes from rat cerebellum. *J. Neurochem.*, 62: 2205-2211, 1994.
155. Grisham, M.B., Ware, K., Gilleland, H.E., Gilleland, L.B., Abell, C.L., Yamada, T.: Neutrophil-mediated nitrosamine formation: Role of nitric oxide in rats. *Gastroenterology.*, 103: 1260-66, 1992.
156. Chow, C.K., Hong, C.B., Reese M.E., Gairola, C.: Effect of dietary vitamin E on nitrite-treated rats. *Toxicol. Lett.*, 23: 109-117, 1984.
157. Mergens, W.J.: Efficacy of vitamin E to prevent nitrosamine formation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 393: 61-69, 1982.
158. Febert, C.S.: Multisensory evoked potentials in experimental neurotoxicology. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 5: 659-671, 1983.
159. Celesia, G.G.: Evoked potentials techniques in the evaluation of visual function. *J. Clin. Neurophysiol.*, 1: 55-76, 1984.

ÖZGEÇMİŞ

03.06.1973 tarihinde Hatay'ın Antakya merkez ilçesine bağlı Kuzeytepe beldesinde dünyaya gelen Semir ÖZDEMİR, ilk öğrenimini Kuzeytepe Köyü Atatürk İlkokulunda tamamladı. Orta öğrenimini Oğlakören Köyü Ortaokulunda tamamladıktan sonra, Antakya Merkez Lisesi'nden 1991 yılında mezun oldu. Aynı yıl Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde üniversite öğrenimine başladı. 1997 yılında lisans diploması almaya hak kazanarak Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizce'dir. Bekardır.

