

49717

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİR MONOAMİN OKSİDAZ İNHİBİTÖRÜ OLAN
DEPRENİLİN YAŞLANMADA SIÇAN KARACİĞER
VE BÖBREK DOKULARINA ETKİLERİ**

Biyokimya Programı

DOKTORA TEZİ

Yüksek Kimyager A. Mert Özgönül
Danışman Öğretim Üyesi: Prof.Dr. Biltan Ersöz

İzmir-1996

TEŞEKKÜR

Doktora tezimin oluşmasının her aşamasında bilgi ve deneyimlerini büyük bir özveri ile ortaya koyan çok sevdiğim, saydığım sayın hocam Prof.Dr.Biltan ERSÖZ'e öncelikle teşekkür etmek istiyorum.

Her konuda verdikleri destek için sayın hocam Prof.Dr.Gülriz MENTEŞ'e, anabilim dalımızdaki diğer hocalarıma ve çalışma arkadaşım Dr.Ferhan GİRGİN'e teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

BÖLÜM I	Sayfa No
- GİRİŞ ve AMAÇ	1
- GENEL BİLGİLER	2
- YAŞLANMA	2
- Yaşlanma teorileri	3
- Yaşlanma teorilerinin tarihçesi.	5
- Yaşlanmada serbest radikal teorisi.	6
- Yaşlanmada gözlenen değişimler.	9
- Biojen aminler ve yaşlanma.	10
- Biojen amin metabolizması ve monoamin oksidaz (MAO) etkinliği.	11
- MAO İNHİBİTÖRLERİ	14
- Deprenil	14
- SERBEST RADİKALLER-OKSİDAN STRES	15
- Reaktif oksijen metabolitlerinin kaynakları	17
- Reaktif oksijen metabolitlerinin biyolojik aktiviteleri ve hücre hasarı	20
- Biyolojik sistemlerde lipid peroksidasyonu	24
- ANTİOKSİDAN SAVUNMA	28
- Doğal antioksidanlar	29
- Antioksidan aktiviteyi arttıran ilaçlar	30
- Enzimatik antioksidan savunma sistemleri	31
- Süperoksit dismutaz (SOD)	31
- Katalaz	32

BÖLÜM II

- ARAÇ, GEREÇ ve YÖNTEMLER	33
- Araç	33
- Kimyasal maddeler	34
- Çalışma materyalleri	38
- Çalışmada kullanılan yöntemler	39
- İstatistiksel analiz	43

BÖLÜM III

- BULGULAR	44
------------------	----

BÖLÜM IV

- TARTIŞMA ve SONUÇ	57
---------------------------	----

BÖLÜM V

- ÖZET	65
- SUMMARY	67

BÖLÜM VI

- KAYNAKLAR	69
-------------------	----

GİRİŞ

Sağlık bilimleri ile ilgili olarak son yüzyılda görülen hızlı gelişmeler insanın sağlıklı bir şekilde yaşamasına ve insan ömrünün uzatılmasına yönelik çabaları da beraberinde getirmiştir.

Sağlıklı organizmalarda yaşlanma olgusu, tek başına, hücresel ve fizyolojik aynı zamanda da türe özgü bazı intrensek değişikliklerin bir karışımıdır; çevresel faktörler de bu intrensek işleyiş ile etkileşim halindedir. Hücre düzeyinde bunun sonucu olarak da organizma düzeyinde görülen yaşlanma evrensel bir olgudur. Drosophila düzeyinden başlayarak daha gelişmiş canlılarda bu evrensel olgunun nedenleri üzerinde yoğunlaştırılan çalışmalar yaşlanma ile ilgili çeşitli teorileri ve bunlara dayanan çözüm önerilerini ortaya koymuştur. Bütün bu çabalara rağmen insan yapısında gözlenen fizyolojik yaşlanma tam olarak aydınlatılabilmemiş değilse de bugün biyojen amin metabolizması gibi organizma düzeyinde geniş etkileri olan bazı metabolizma olaylarının yaşlanmaya olan katkıları kesin olarak ortaya konmuştur.

Yine günümüzde yaşlanma oluşumunu açıklamaya yönelik sağlam verilere dayalı çeşitli savlar öne sürülmüştür. Yaşlanmanın türlere özgü spesifik genlerle düzenleme sonucu oluştuğunu ortaya koyan bir savın yanı sıra, organizmada birçok fizyolojik olayla bağlantılı oluşan serbest radikallerinde yaşlanmadan sorumlu olduklarını vurgulayan apayrı bir sav da mevcuttur. Doğal olarak organizmada serbest radikalleri oluşturan mekanizmalar aydınlatıldıkça mevcut fizyolojiyi bozmaksızın bu ürünlerin invivo azaltılmasına yönelik çalışmalar da yakın bir gelecekte gerçekleştirilebilecektir.

Bu çalışmada yaşlanmada sıçan karaciğer ve böbrek dokularında oksidan stres ve antioksidan savunma sistemleriyle, biyojen amin metabolizmasında anahtar enzim olan monoamino oksidaz (MAO) enzimi arasındaki olası ilişkinin belirlenmesi ve ardından da bir MAO inhibitörü olan deprenil kullanılarak olası değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Yaşlanma

Bilim ve teknolojinin hızla geliştiği çağımızda bu gelişmelerin çoğu hastalıkları azaltmaya ve insan yaşamının süresini ve kalitesini arttırmaya yönelmiştir. Yaşam süresinin artması ve doğum hızının azalması ile 65 yaş ve üstü yaş grubu gittikçe artmaktadır. Günümüzde sağlık problemi olan olguların 1/3'ünü yaşlılar teşkil etmekte ve gelecek yüzyılda bu sayının % 50'yi geçeceği düşünülmektedir (1). Toplumdaki yaşlı insanların ve sağlık problemlerinin artışı, özellikle bu yaş grubuna yönelik koruyucu önlemlerin ve yeni tedavi olanaklarının araştırılmasına neden olmuştur.

Organizmanın mental gelişim ve metabolik işlemlerinin bir sonucu olarak görülen yaşlanma; hem ilerleyen yaşa eşlik eden bir seri değişimden, hem de hastalanma ve ölüm olasılığının giderek artan bir şekilde ilerlemesinden sorumlu olan değişikliklerin toplamıdır. Bu değişikliklerin oluşumunda doğuşsal ve çevresel yaşlanma süreçleri etkilidir. Diğer bir deyişle yaşlanma, ilerleyen yaşa eşlik eden bir dizi değişimin birikiminden sorumlu olan değişikliklerin toplamı ve hastalık ve ölüme yakalanmada gittikçe artan bir eğilimin sonudur (27).

Organizmada yaşlanma ile beraber iki fenomen gelişmektedir: Fizyolojik işlemlerde bir gerileme ve hastalık sayısında artma... Bu her iki proses birbirini etkilese de fizyolojik gerileme hastalıktan bağımsız olarak da gerçekleşmektedir (1).

Yaşlanma sürecinin tüm canlılarda varolması yaşlanma ve ölümün evrensel bir olgu olduğunu gösterir. İntrensek yaşlanma süreci ve çevrenin yaşlanma değişiklikleri oluşumundaki rolü tek bir hücrede incelenecek olursa hücrenin

yaşamsal faaliyetlerinden bir ya da birkaçının sona ermesi ya da kritik düzeyin altına inmesi sonucunda hücre ölümünün yer aldığı görülebilir.

Benzer şekilde çok hücreli düzeyde; yaşlanmanın; tüm hücreleri etkileyen doğuşsal yaşlanma sürecinin, çevresel faktörlerin, yaşlanan hücrelerin birbirini etkilemesinin ve hastalıklarla oluşan değişikliklerin sonucunda meydana geldiği kabul edilebilir. Çok hücreli yaşamın ölümü, solunum merkezi hücreleri ya da kalp hücreleri gibi yaşamsal işlevlerle ilişkili hücrelerin bir bütün olarak disfonksiyonu ya da ölümüyle ortaya çıkar (27).

Yaşlanma Teorileri

Yaşlanma üzerine geliştirilen teoriler genelde 2 temel değişikliğe dayanırlar: Moleküllere olan hasarlanmanın artması ya da spesifik genlerin düzenlenimi..

Organizmada DNA hem ekzojen ajanlara, hem de intrinsik işlemlere karşı yanıt olarak devamlı bir değişime uğramaktadır. Stabilitesi, spesifik tamir enzimlerinin bu değişimleri onarmasına olanak veren çift iplikli yapısıyla idame ettirilir. Biyolojik yaşlanmanın somatik mutageneze dayandığı, ve sonuçta mutageneze yatkınlığın artmasından ya da tamir mekanizmalarındaki eksikliklerden kaynaklandığı öne sürülmüştür. Gerçekten de değişik türlerin yaşam uzunluğu DNA tamir enzimleri ile koreledir. Ancak insanda spontan mutagenez hızı, oluşan değişikliklerin derecesini açıklayabilecek düzeyde olmadığı gibi tamir mekanizmalarındaki bir yetmezliğin yaşlanmaya neden olduğuna dair bir veri de yoktur (1).

Yaşlanma sürecinin nedenleri üzerinde çok sayıda teori geliştirilmiştir; Bjorksten tarafından 1968'de ileri sürülen bir teoriye göre yaşlanma prosesi moleküler çapraz bağlanmalarla açıklanmaya çalışılmıştır. Bu teoriye göre çapraz bağlı kollajen ve elastinin birikimi konnektif dokuda ve deride meydana gelen yaşa bağlı katılaşmayı ve yaşlı hücrelerde altüst olan membran permeabilitesini kısmen açıklamaktadır (26). Walford 1969'da immünolojik fonksiyondaki değişimler nedeniyle yaşlanmanın ortaya çıktığını

öne sürmüştür (26). 1986'da Harman serbest radikal reaksiyonlarını yaşlanma prosesinin nedeni olarak göstermiş Harman ve Hayflick de 1987'de DNA'daki yaşlanma genlerinin yaşlanmadan sorumlu olduğunu bildirmiştir (60). Her hücrenin dokular yaşlandıkça sıralı bir şekilde kendini işlev dışı bırakan spesifik programlı ölüm genlerinin varlığına dayanan programlı ölümü, hücresel DNA ve RNA genetikleri üzerinde temellenir. Bugün için yaşlanmaya dair en geniş biçimde kabul gören anlayış, yaşlanmanın spesifik genlerle ortaya çıkan bir süreç olduğuna ilişkin olmaktadır. Bu hipotezi destekleyen bulguların çoğu invitro koşullarda elde edilmiştir (74). Tüm memeli türlerinde o türün hayat uzunluğundan bağımsız olarak ortak bir yaşam uzunluğu belirleyici genler topluluğu bulunur. Bu belirleyici genler ekspresyon içeriklerini ve zamanlamalarını değiştirerek yaşlanma hızına etki ederler (11). Herhangi bir türün yaşlanma hızı; bu belirleyici genler topluluğunun yanı sıra normal ve gerekli biyolojik işlemlerin yan etkilerine karşı gelişen savunma ve korunma işlemleri ile de kontrol edilir (10,11).

Yaşlanmanın nedeninin önemi fonksiyonel ömür uzunluğu açısından pratik bir anlam getirmesiyle birlikte düşünülmelidir. Bu yüzden yaşlanmanın serbest radikal teorisi daha ümit vericidir: Yaşlanma olgusunu bütün canlılarda, yaşlanma ve ölümün sorumlusu olarak tek bir ortak nedene bağlayan bu teori serbest radikal reaksiyonlarının kimyasal doğası ve bunların tüm canlı sistemlerde görülmesi temeline dayanmaktadır (26,27).

Enzim ve protein sentezinin artan bir şekilde hataya eğilimli hale gelmesi ve hücresel metabolizmayı devam ettiremeyecek moleküllerin oluşması, DNA transkripsiyonundaki hataların tamir işleminin durması ya da pituiter bezin ürettiği katil hormonun normal hücre fonksiyonunu haraplaması da yaşlanma prosesini açıklamaya yönelik diğer teoriler arasında yer almaktadır (1,26,27,63,82,84)

Yaşlanma Teorilerinin Tarihçesi

Kaliforniya Üniversitesi'nden Michael R.Rose, yaptığı çalışmalarda bir takım genetik değişmeler sonucu uzun ömürlü meyve sinekleri (*Drosophila melanogaster*)'ni üretmeyi başarmıştır. Bu "süper sinekler" her yaşta son derece güçlü ve dışarıdan gelecek etkilere karşı dirençliydirler. Yaşlandıklarında bile pek çoğu normal sineklerin gençlerinden bile daha güçlüydüler. Rose ve grubu, bu değişikliğe neden olan genleri tanımaya çalışmış ve sineklerle yürüttükleri bu çalışmanın, insanların niçin yaşlandıklarını açıklamak için yapılan çalışmaların bir parçası olduğunu ileri sürmüşlerdir. Yapılmaya çalışılan; kaza, savaş ve enfeksiyon dışında ölüme neden olabilecek yaşlanma süreçlerini kontrol altına almaktır. Bu amacın gerçekleşmesi kanser, kalp hastalığı ve benzeri gibi ilerleyen yaşlarda önemi artan hastalıkların önlenmesi sonucunu da beraberinde getirecektir (26,33,43).

Jawzinski, bir maya türü olan "*S.cerevisia*" (ekmek mayası) üzerinde çalışmış ve mayanın ömrünü uzatan birçok gen tanımlamıştır. Bu genler arasında en iyi tanınmış olanı "*LAG 1*" (*longevity assurance gene 1*) olup, genç hücrelerde yaşlılarınkinden daha aktiftir. Yaşlı hücrelere ekstra *LAG 1* ilave edildiğinde ömürleri 1/3 kadar uzamaktadır. En önemlisi ekstra aktif geni taşıyan yaşlı maya hücrelerinin ölümsüzleştirilmemeleri, ancak daha uzun süre genç kalmalarıdır (33,43).

1956 yılında Harman yaşlanmada "serbest radikal tepkimelerinin" önemini vurgulayan teoriyi ortaya atmıştır. Harman'a göre yaşlanma normal yaşam süresince üretilen "serbest oksijen radikallerini" içeren moleküllerin neden olduğu yıkımların sonucudur (26,27).

Yaşlanmada Serbest Radikal Teorisi

Harman'ın ileri sürdüğü yaşlanmanın serbest radikal teorisi, yaşlanma olayının serbest radikal reaksiyonları ile meydana geldiğini postüle etmektedir. Bu reaksiyonlar yaşlanma sırasında gözlenen çevresel ve hastalıklara bağlı değişiklikler ile intrinsek yaşlanma sürecini kapsar. Yaşlanmanın serbest radikal hipotezinin temel varsayımı, aerobik hücrelerin endojen antioksidan savunma mekanizmalarının yetersizliği ve normal fizyolojik koşullarda bile rezidüel prooksidanların belirli derecede oksidatif stres oluşturabileceğidir (26,27). Teorinin öngörüsü bir organizmanın ömür uzunluğunun, rastgele serbest radikal reaksiyonlarının başlama hızının yavaşlatılması ve/veya bu reaksiyonların zincir uzunluklarının azaltılması yoluyla artırılabilir. Rastgele serbest radikal reaksiyonlarının oluşmasının önlenmesi, besinlerde kolayca okside olabilen bileşenlerin kısıtlanması, kalori alımının azaltılması ve ısının düşürülmesi yoluyla başarılabilir. Zincir reaksiyonlarının uzunluklarının azaltılması ise organizmada serbest radikal inhibitörlerinin konsantrasyonlarının artırılması ile (örneğin kimyasal kompozisyonlarındaki değişikliklerle) mümkün hale getirilebilir (26).

Serbest radikal reaksiyonları, iyonizan radyasyona maruz kalmakla, non enzimatik reaksiyonlarla ve özellikle enerji kazandıran süreçler olarak canlılarda var olan 2 major yol, yani fotosentez ve O₂'in suya indirgenmesi sırasındaki enzimatik reaksiyonlarla ortaya çıkar (27). Yaşlanmada serbest radikal teorisi günümüzde genel kabule en yakın olandır ve tüm canlılarda tek bir genel sürecin yaşlanma ve ölümden sorumlu olduğunu öne sürmektedir. 1956'da Harman'ın "yaşlanma ve oksidatif hasar" ile ilgili teorisini açıklamasıyla bu alana yönelen ilgi, oksijen radikallerini saptayan uygun bir yöntem olmaması nedeni ile bir süre teoriden öteye gidememiştir.

Bu tarihten 13 yıl sonra McCord ve Fridovich SOD'un varlığını ve biyolojik fonksiyonunu ortaya koyarak yeni bir araştırma alanı başlatmışlardır (45).

Ardından Britton Chance'in grubu hücresele solunumun bir yan ürünü olarak hidrojen peroksidin biyolojik üretimini göstermiş ve aynı çalışmada mitokondrial oksijen aktivasyonunun yaşla artan bir şekilde uyarılmasının prooksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulmasına yol açtığını bildirmiştir.

Bir canlı organizmanın yaşamsal faaliyetleri sırasında bir çok biyolojik tepkime gerçekleşir ve bu tepkimelerin pek çoğunda serbest radikaller üretilir. Ksantin oksidaz, siklooksijenaz ve lipooksijenaz gibi oksidan enzimler, nötrofil, makrofaj ve eosinofil gibi immun yanıtta yer alan hücrelerin yan ürünleri, mitokondrial ve mikrozomal elektron transport zinciri gibi normal fizyolojik olaylar ya da asetaminofen gibi ilaçlar, karbon tetraklorür ve parakuat gibi toksik ajanlar, sigara içimi gibi birçok eksojen olay serbest radikal kaynağı olarak rol oynarlar (63). Serbest radikaller ortaklanmamış elektronlar içerdiklerinden son derece aktiftirler. DNA, proteinler, lipidler ve vücut içerisindeki diğer molekülleri oksidleyerek onlara zarar verirler.

Harman, oksidatif hasarın hücre ve dokularda birikimi sonucu yaşlanmanın meydana geldiğini ileri sürmektedir. Bu görüş, canlıların hücresele faaliyetleri arasındaki farklılığın yaşam sürelerini etkilediği sonucunu ortaya koymaktadır. Bu nedenle yüksek metabolik hıza sahip olan hayvanlar, oksijeni daha yavaş olarak tüketen hayvanlardan daha kısa bir yaşama sahip olacaklardır.

Cutler da insanın uzun ömürlü canlı dokularının toplam olarak daha fazla antioksidan ürettiğini ve böylelikle oksidasyona karşı daha dirençli olduğunu, sonuçta da memeli türü içinde insanın en uzun yaşam süresine sahip olduğunu ileri sürmektedir. Cutler insan ömrünün bir yerde sonlandığını, çünkü oksidasyona karşı koruyucu elemanların zamanla etkinliğini kaybettiğini ve ebediyen korunma için yetersiz olduğunu düşünmektedir (11). Bu konuda yapılan çalışmalar yaşlanma hızının metabolik hızla ya da dokuların birim ağırlık başına kullandığı oksijen miktarı ile ilişkili olduğunu göstermektedir (26,84).

Oksijen metabolizmasının hızı oksijen radikali üretim hızı ile pozitif ilişkili olduğundan bu veriler aktif oksijen türlerinin yaşlanmada bir nedensel faktör olarak önemli olabileceği görüşünü desteklemektedir. Eğer bu görüş doğruysa, aktif oksijen türlerinin toksik etkilerini azaltan stratejiler yaşam süresi üzerine arttırıcı etki gösterebilirler.

Antioksidan mekanizmaların yaşam süresi üzerine olan etkilerini incelemek üzere farklı memeli türlerindeki endojen antioksidanların miktarları incelenmiştir. Öncelikle süperoksit dismutaz (SOD) enzimi üzerindeki çalışmalarda maksimum yaşam süresi ile SOD miktarları arasında pozitif bir korelasyon saptanmıştır. Memeliler içinde en yüksek SOD aktivitesi insanda olmakla beraber yaşam süresi en az olan farede en düşük miktarlardadır.

Maksimum yaşam süresi ile benzer şekilde pozitif korelasyon gösteren diğer antioksidanlar şunlardır: Tokoferol, karotenoidler, ürat ve dokuya özgün olarak askorbik asid... Bu bulgularla paradoks oluşturan bir veri katalaz, glutatyon, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin maksimum yaşam süresi ile negatif bir korelasyon içinde olmasıdır. Bir diğer ilginç nokta oksijen radikallerinin önemli bir kaynağı olan sitokrom P450 miktarının, memeli türünün yaşam süresi arttıkça azalmasıdır (11).

Yaşlanmada serbest radikal teorisini destekleyen yukarıdaki bulguların ardından yaşlanmanın prooksidan oluşumu ve antioksidan savunma sistemleri arasında gittikçe artan bir denge bozukluğu sonucu geliştiğini destekleyen bir dizi çalışma yayınlanmıştır (3,16,47,52).

Günümüzde yaşlanmanın tek bir hipotezden çok multifaktoriyel bir süreç olduğu yolundaki görüşler ağırlık kazanmıştır. Tek başına bir olay ya da işlemin yaşlanmayı kontrol etmesi çok olası görünmemektedir (81).

Yaşlanmada gözlenen değişimler

Yaşlanma ile beraber birçok organ ve sistemlerde oluşan değişiklikler son yıllarda oldukça ilgi çekmektedir. 65 yaşın ardından hemoglobin ve hematokrit değerleri ile eritrosit sayısı hafif olarak düşme gösterir. Lökositlerde lobülasyonda bir artış ve granülasyonda bir azalış gözlenir, bu da sonuçta fagositik aktivitede bozukluğa yol açar. Fibrinojen ve diğer plazma proteinlerindeki artışa bağlı olarak eritrosit sedimentasyon hızı hafifçe yükselir. Bütün bu değişimlerin sonunda kırmızı hücre rezerv ağırlığında gelişen azalma ile beraber fizyolojik anemi gözlenir (84).

Yaşlanma ile oluşan konnektif doku değişiklikleri ise konnektif doku densesindeki artış ve konnektif doku su içeriğinde azalma ile kendini gösterir. Bu değişiklikler deri esnekliğinde azalmaya ve artmış fibröz doku nedeni ile eklem katılığına yol açar. Konnektif dokuda ayrıca kalsifikasyon meydana gelir ve bu olay da aterosklerotik değişikliklere ve dejeneratif eklem hastalıklarına neden olur. Azalmış mineral içeriğine bağlı olarak osteoporoz gibi kemik değişiklikleri meydana gelir. Kas fibrillerinin sayı ve genişliğinde oluşan azalmaya bağlı olarak kas hücre ağırlığında düşüş görülür.

Derinin tonus ve elastisitesinde meydana gelen değişiklikler sonucu subkutan yağ dokusunda azalma meydana gelir ve bu da ısı izolasyonunda kayba yol açar.

Solunum sisteminde ise alveolar büyüklükte azalma ile pulmoner fonksiyonlar etkilenir. Vital kapasite azalır, respiratuvar sili sayısında düşüş gözlenir.

Damar düz kas hücrelerinde artan kollajen ve azalmış elastik doku sonucunda vasküler kompliansta azalma meydana gelir. Ayrıca periferik dirençte oluşan artış ve vasküler kompliansta görülen azalma sonucu sistolik kan basıncında artış izlenir.

Nefron sayılarında meydana gelen azalma ile böbrek ağırlığında düşüş oluşur. Bazal membranda ve renal kan damarlarında oluşan kalınlaşma, renal konsantrasyonda ve renal perfüzyonda azalma ile birlikte seyreder.

Erkek genital sisteminde testislerde intertübüler boşluklarda fibröz doku artışı gözlenir. Ayrıca sperm üretiminde ve transportunda bozulma izlenir.

Santral sinir sisteminde ise nöral transmitterlerde azalma görülür. Monosinaptik refleks arkında oluşan gecikme sonucu reflekslerde yavaşlama saptanır. İletim hızındaki yavaşlamaya ve dejeneratif hastalıklarda artışa bağlı olarak aktivite yavaşlaması izlenir.

Ayrıca yaşlanma ile ilgili olarak gözde katarakt oluşumu, maküler dejenerasyon ve görsel reseptörlerde azalma meydana gelir; duyma komponentlerinde azalma, vestibüler fonksiyonda düşüş de görülür.

Bütün bu değişimler yaşlanma fizyopatolojisini oluşturmaktadır, bu prosesteki bozuklukları engellemeye yönelik araştırmalar ve tedavi olanaklarının sunulması tıbbın en ilgi çekici alanlarından biri haline gelmiştir.

Biyojen aminler ve yaşlanma

Yaşlanma fizyopatolojisinde mental kapasite, sinir sistemi ve ruhsal yapıda meydana gelen tüm bu değişimlerin temelinde yer alan önemli bir faktör biyojen aminlerin bu sistemlerde oynadığı role dayanmaktadır. Konunun daha iyi anlaşılması için hem fizyolojik hem de patolojik yaşlanmadan kısaca bahsetmek uygun olacaktır.

Fizyolojik yaşlanmada nörotransmitterler ve bunların sentezini yapan enzimler azalmaktadır. Özellikle kateşolaminerjik nöronlar yaşlanmadan daha çok etkilenmektedir. Oksijen kullanımı yaştan pek az etkilenmektedir (14,21).

Mental ve entellektüel kapasite, dramatik bir düşüş göstermez, bazı yeteneklerin azalması daha çok kullanılmamalarına bağlıdır. Bu kullanmama herhangi bir atrofiye yol açmamakta, egzersiz ve stimülasyonla yeniden kazanılabilmektedir (14).

Fizyolojik olarak görülen bazı değişiklikler; yakın geçmiş hafızasında azalma, karar verme süresinde artma, algılama hızında azalma, hıza bağlı bilişsel fonksiyonlarda bozulma, uyku süresinde azalma olarak sıralanabilir (14).

Patolojik yaşlanmada ise oksijen kullanımı ve glikoz metabolizması azalmıştır. Heksokinaz ve fruktokinaz aktivitelerinde düşüş söz konusudur. Nörotransmitterlerde ise kombine azalma söz konusudur. Asetin kolin ve dopamin bellekte, noradrenalin ve GABA uyanıklık ve dikkatte, yine dopamin, noradrenalin ve asetil kolin öğrenmede, asetilkolin dopamin, noradrenalin ve serotonin hep birlikte ruh halinde rol oynamaktadırlar (14,20,21). Tüm bu nörotransmitterlerin konsantrasyonlarında meydana gelen azalma patolojik yaşlanmada görülen mental ve ruhsal bozuklukları açıklamaktadır.

Biyojen Amin Metabolizması ve Monoamin oksidaz (MAO) Etkinliği

Monoamin oksidaz (MAO) (EC 1.4.3.4) psikiyatri biyolojisindeki önemi nedeni ile üzerinde yoğun olarak çalışılan bir enzimdir. Yapısında FAD içeren bu enzim mitokondri dış membranında lokalizedir.

MAO enziminin substratı olan dopamin, noradrenalin, adrenalın ve serotonin santral sinir sisteminde rol oynayan biyojen aminlerdir. Demansla birlikte giden pek çok hastalıkta ve fizyolojik yaşlılıkta düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir (9,14,21).

Bu biyojen aminlerden dopamin, santral sinir sisteminde genellikle inhibitör olarak yaygın olarak bulunur. Beyinde D₂ daha fazla olmak üzere D₁ ve D₂

adı verilen iki tip reseptörü vardır. Bellek ve duygularımızdan sorumlu olan mezolimbik sistem de dopamin açısından zengindir (14,32).

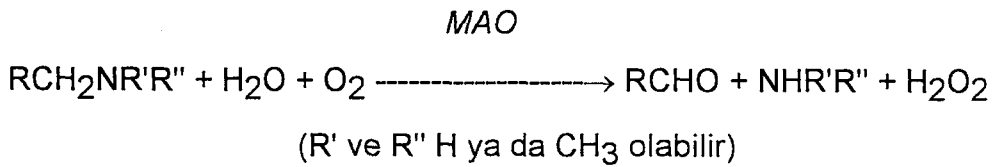
Adrenal medullanın temel ürünü adrenalindir. Medulladaki biyojen aminlerin %80'ini oluşturan adrenalini burada 1-3 mg/gr doku konsantrasyonlarında bulunur ve medulla dışı dokularda yapılmaz. Medullada sentezlenerek depolanan adrenalini, kan dolaşım yolu ile uzak organlar üzerinde etkisini gösterir. Soğuk, yorgunluk ve şok gibi akut durumlar karşısında organların sempatik yanıtını sağlamak için gereklidir (38,46).

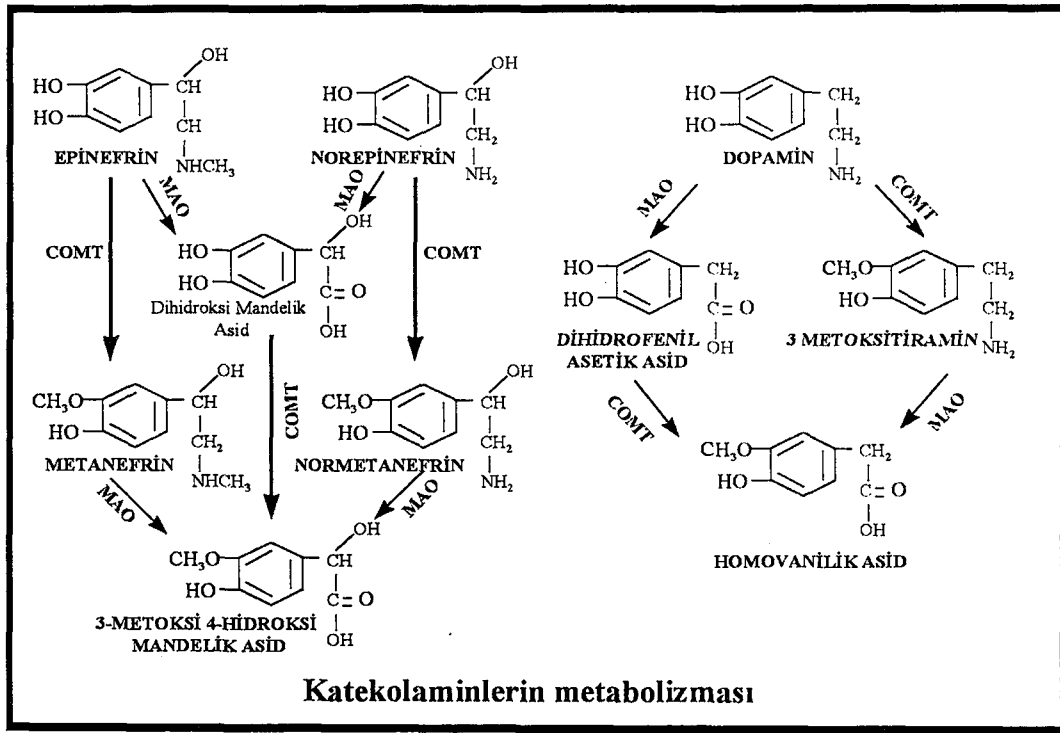
Sempatik sinir uçlarında bulunan biyojen aminlerin en önemlisi ise noradrenalindir. Postsinaptik hücrede lokal olarak bir nörotransmitter şeklinde etki gösteren noradrenalini iken, sinir hücrelerinde az miktarda adrenalini bulunur (38,46).

Serotonin hem nöromediatör, hem nöromodülatör özellikte olup, normal davranış kalıbını sürdürmede, uyku siklusunun, beslenme davranışının, endokrin fonksiyonunun düzenlenmesinde rol oynamaktadır (9,17,32).

Dopamin, adrenalini ve noradrenalinin sentezi tirozin aminoasidi ile başlamaktadır. Serotoninin öncül maddesi ise triptofandır. Hücre içindeki biyojen aminler MAO ile oksidatif olarak deaminasyonla, salgılanan biyojen aminler ise COMT ile O-metilasyona uğratarak yıkılırlar (17,32).

Biyogen amin metabolizmasında önemli rol oynayan monoamin oksidaz enzimi aşağıdaki tepkimeyi katalizlemektedir.





Şekil 1. Katekolaminlerin sentez ve yıkılımları.

Yukarıdaki tepkimeyi katalizleyen MAO monoamin nörotransmitterleri ya da putatif nörotransmitterleri, 5-hidroksitriptamin, noradrenalin, dopamin, teletetil histamin triptamin ve tiramini inhibe eder (19).

Enzim hem santral sinir sisteminde, hem de periferel dokularda lokalizedir. Dopamin, noradrenalin ve serotonin gibi monoaminerjik nörotransmitter ya da nöromodülatörlerin yanı sıra diet yoluyla absorbe olan ya da bakteriyel transformasyon sonucu oluşan tiramin gibi aminleri de metabolize eder. İnvitro enzim çalışmalarında elde edilen değişik substrat spesifikliğine ve inhibisyon özelliklerine göre MAO enzimi iki formda bulunur: 5-HT ve noradrenaline karşı aktivitesi olan ve klorgilin tarafından inhibe edilen A formu ve benzilamin ile β -feniletülenamine karşı aktivitesi olan ve klorgilin tarafından inhibisyona göreceli olarak dirençli iken deprenil tarafından inhibe edilen B formu... Bu formlar monoklonal antikolar kullanılarak immuno histokimyasal çalışmalarla ve moleküler genetik çalışmalarla da gösterilmiştir.

MAO İnhibitörleri

Bir süre önce izoniazid ve iproniazidle tedavi edilen tüberkülozlu hastaların ruhen kendilerini daha iyi hissettiklerinin gözlenmesi bu ilaçların aynı zamanda depresyon tedavisinde de kullanılmasını beraberinde getirmiştir.

Birinci jenerasyon MAO inhibitörleri bu enzimi irreversibl ve non selektif olarak inhibe etmekte, buna bağlı olarak hepatotoksik etkilerinden hipersantif krizlere kadar gidebilen olaylar oluşmaktadır. Bunun sonucunda kanda tiramin düzeyini arttırarak ölümlere yol açmaktadır. Bu yan etkilerinden ötürü kullanımları kısıtlanmıştır (19,30,32,58,62,70,71).

MAO inhibitörlerine olan ilginin yeniden artması, enzimin A ve B formu olmak üzere iki ayrı tipinin bulunmasıyla başlamıştır. MAO-A clorgylin'e, MAO-B ise deprenyl ve pargylin'e duyarlıdır (4,7,51,80).

Deprenil

Selektif bir monamin oksidaz B inhibitörü olan Deprenil ilk olarak D, L-rasemik karışım olarak elde edilmiştir. Anti-Parkinson ve antidepresif etkisi olan bir ilaçtır. Kimyasal ismi izopropifenilmetilpropargilamin, fenilizopropi-N-metilpropinilamin, N-2-dimetil-N-propinil-2-feniletilenamin, R-(-)-N-metil-N-(1-fenil-2-propil)-2-propinil-amin hidroklorid ya da N-propinil-metamfetamin olarak geçer.

L-deprenil öncelikle enzim ile reversibl, nonkovalan bir kompleks oluşturur. L-deprenilin bu kompleks içinde MAO ile tepkimeye girmesi enzim-bağlı FAD'ın redüksiyona uğramasına ve inhibitörün okside olmasına yol açar. L-deprenilin oksidasyona uğraması ile inhibitör bu kompleks içinde FAD ile N-5 pozisyonunda kovalan bağ oluşturur. Ortaya çıkan inhibisyon dializ, jel filtrasyonu ya da dilüsyon ile geri dönmez. İn vivo olarak da L-deprenilin etkilerinden kurtuluş yeni enzim sentezine gereksinim gösterir. Enzimin MAO

olması durumunda enzim dönüşümü organdan organa değişir, enzim yarı ömrü sıçan karaciğerinde ve beyinde sırasıyla 2.5-3.5 gün ve 8-13 gündür (72).

L-deprenil, in vitro ve in vivo ortamlarda 0.2-2.0 mg/kg'lık tek doz ile MAO-B'nin relatif olarak selektif inhibitörlüğüne yol açar. Yapılan çalışmalarda L-deprenilin artan dozlarda uygulanması ve uygulama sayısının artması ile MAO-B'e olan inhibitörlüğünü kaybettiği gözlenir. L-Deprenil MAO-B'nin yanı sıra nöronal amin alınımlarını da inhibe eder. Günlük deprenil enjeksiyonlarının (2.0 mg/kg) 3 haftalık bir süre ile verilmesi sıçan beyin striatum bölgesinde 10 kata kadar varan bir süperoksid dismutaz aktivite artışına yol açar. Aynı şekilde katalaz enziminde de kontrollere göre 1.7 kez bir artış izlenir (18).

Serbest radikaller ve oksidan stres

Normal koşullar altında biyolojik sistemlerde varolan moleküler oksijenin çoğu sitokrom sisteminde yer alan aerobik glikolizis sırasında ATP üretmek için tetravalan bir redüksiyona uğrayarak suya redükte olur, ancak bu sistemden kaçan % 1-2 univalan redüksiyona uğrar. Bu yol yüksek miktarda reaktif olan ürünleri oluşturur: hidrojen peroksid, süperoksid radikal ve hidroksil radikali.gibi... (6).

Anaerobik canlılar da dahil olmak üzere her canlıda toksik etkili olan doğrudan moleküler oksijen değil, oksijenin tam olmayan indirgenmesi ile oluşturulan oksijen radikalleridir. "Serbest radikal", "oksidan molekül" ya da "reaktif oksijen partikülleri" atomik ya da moleküler yapıda eşlenmemiş tek elektron içeren ve dolayısıyla reaktif özellik taşıyan moleküllerdir. Bu radikaller biyolojik sistemler için en reaktif ve toksik maddeler olup oksijenin toksik etkisinin gerçek nedenini oluştururlar. Bunlardan süperoksid anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$) hem çevresel etkenler hem de organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle en çok ve en kolay oluşan oksijen radikalidir. Bu radikaller tek elektronunu bir başka moleküle verebilir (redüksiyon) ya da

bir başka molekülden elektron alarak elektron çifti oluşturabilir (oksidasyon).

İki serbest radikalın tepkimesi sonucunda radikal özellik ortadan kalkar, ancak bir radikal radikal olmayan bir moleküle tepkimeye girerse başka bir radikal oluşur. Bir radikal dış orbitalinde eşlenmemiş iki elektron içerir (örneğin moleküler oksijen $[O_2]$). Radikal iyon ise pozitif (örneğin H_3N^+) ya da negatif (örneğin $O_2^{\bullet-}$) bir yük taşıyan serbest radikaldir. Radikal özellik taşıyan moleküllerin bu karakteristikleri radikallerin zincir tepkimelerde rol oynamasına neden olur. Her iki olayın sonunda nonradikal yapı radikal şekline dönüşür (26,54).

Canlılarda diğer radikallerin oluşumu çoğunlukla süperoksid radikallerinin birikmesine bağlıdır. Bu radikaller biriktikten sonra bir seri zincirleme tepkime eğer radikaller de oluşur.

1) Radikaller

Süperoksid radikali	(O_2^{\bullet})
Hidroksil radikali	$(^{\bullet}OH)$
Peroksil radikali	(ROO^{\bullet})
Alkoksil radikali	(RO^{\bullet})
Semikinon radikali	(HO^{\bullet})
Hemoproteine bağlı serbest radikaller	

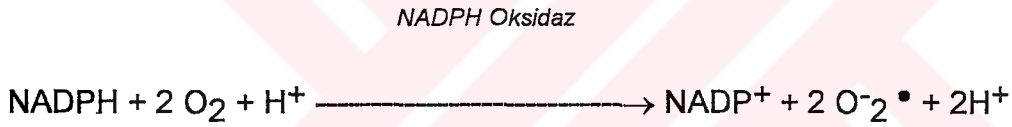
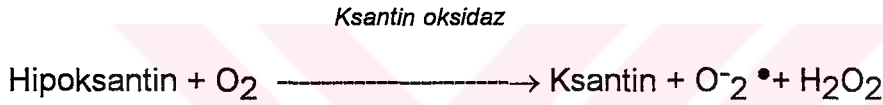
2) Non radikaller

Hidrojen peroksit	(H_2O_2)
Lipid hidroperoksit	$(LOOH)$
Hipohalöz asid	(HOX)
N halojenli aminler	$(R-NH-X)$
Singlet oksijen	$(^1O_2)$
Ozon	(O_3)
Azot dioksit	(NO_2)

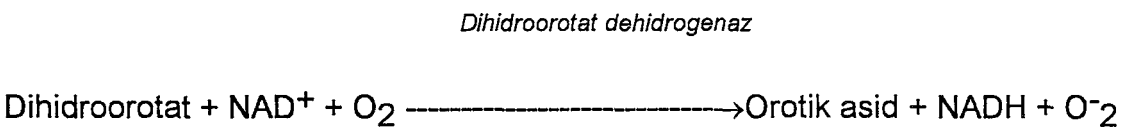
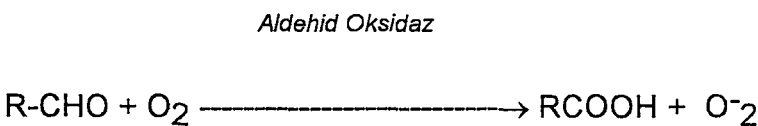
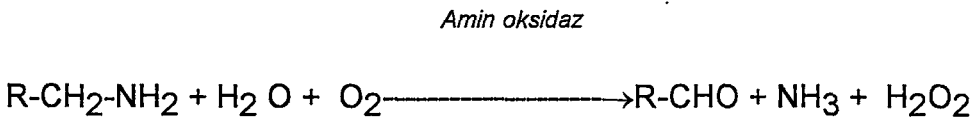
Reaktif Oksijen Metabolitlerinin Kaynakları

Bir dizi biyolojik işlevin normal yürütülebilmesi için serbest radikal reaksiyonları gereklidir. Bir çok hücrel enzim katalitik aktivitesi ve elektron transport işlemleri, ortama serbest radikal ürünleri üreten elektron transferlerini içerir. Aerobik organizmalarda elektronları her an kabul etmeye hazır moleküler oksijenin bol miktarda bulunması, oksijenden türev alan serbest radikallerin hücrel serbest radikal tepkimelerinin aracısı olmasına yol açmaktadır (15).

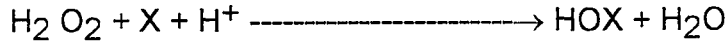
1) Enzimatik tepkimeler; Vücutta endojen olarak oluşabilen oksijen metabolitlerinin enzimatik kaynakları şunlardır (23,59):



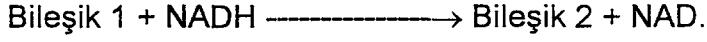
NADPH oksidaz polimorf nükleer lökositler, makrofajlar ve monositler gibi inflamatuvar hücrelerin yüzeyinde bulunur ve uygun uyaran (bakteri, mantar) ile karşılaştığında O_2 'yi $\text{O}_2^{\bullet-}$ 'e çevirir.



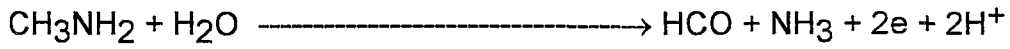
Peroksidazlar



NADH Oksidaz Tepkimesi



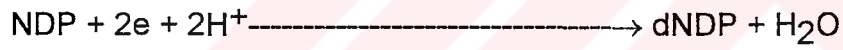
Metilamin dehidrogenaz



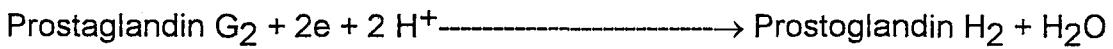
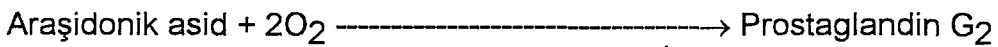
Galaktoz oksidaz



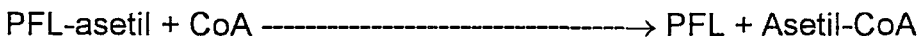
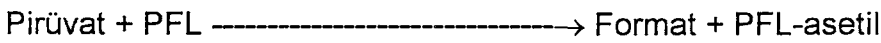
Ribonükleotid redüktaz



Prostaglandin H sentaz

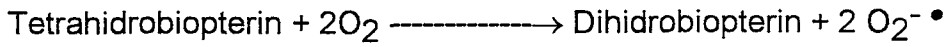
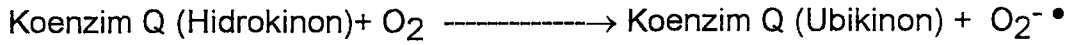
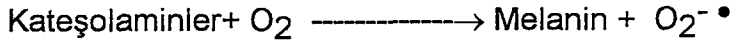
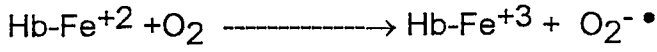
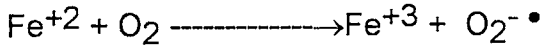


Pirüvat format lilyaz



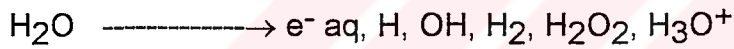
2) Nonenzimatik tepkimeler:

Otooksidasyon tepkimeleri sonucu oluşan reaktif oksijen metabolitlerinin nonenzimatik kaynakları aşağıda özetlenmiştir (23,26,59).

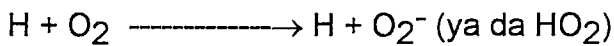


3) Dış etkenler:

◆ Radyasyon (Bütün yüksek enerjili elektromanyetik ışınlar her ortamda süperoksit anyon radikali oluştururlar. β , γ ve X ışınları sulu ortamdan geçince suyun radyolitik parçalanmasına neden olmaktadır (34).



Sulu ortam oksijen içeriyorsa aşağıdaki tepkimelerle süperoksit radikali kolaylıkla oluşmaktadır.



Organik moleküllerin bulunduğu sulu ve oksijenli ortamda radikal oluşumu iki kat artmaktadır. Canlı bir sistemde yüksek enerjili ışınların aynı etkiyi daha kolay göstereceği açıktır.

Yanı sıra ;



$\text{H}_2\text{O}^+ + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{OH} \bullet + \text{H}_3\text{O}^+$ tepkimelerinde de serbest radikaller meydana gelir.

- ◆ Hava kirliliği
- ◆ Toksik kimyasallar
- ◆ Sitostatikler (Adriamisin, Daunorubisin, Doksorubisin)
- ◆ Pestisitler
- ◆ Sigara
- ◆ Yangı (Nötrofil, eozinofil ve makrofajlar fagositoz sırasında önemli ölçüde O_2^- üretmektedirler).

Reaktif Oksijen Metabolitlerinin Biyolojik Aktiviteleri ve Hücre Hasarı

Hücrede koruyucu mekanizmaları aşacak kadar serbest radikal oluştuğunda, farklı şekillerde metabolik ve sellüler bozukluklar meydana gelmektedir. Reaktif oksijen parçacıkları ile oluşan hücre hasarını açıklamak için başlıca iki mekanizma öne sürülmüştür (54):

1) Serbest oksijen radikalleri çok sayıda hücresel hedefle tepkimeye girerek hücre ölümüne kadar giden olayları başlatmaktadır.

2) Oluşumu artan hidrojen peroksidin glutatyon peroksidaz tarafından detoksifikasyonu sırasında çözünebilir ve proteine bağlı tiyollerin oksidasyonu, hücre içi serbest kalsiyumun artmasına neden olmaktadır.

Serbest radikallerin hücresel hedefleri Tablo 1'de özetlenmiştir (15,66).

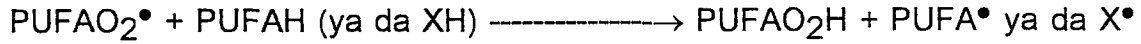
Bu etkiler sonucunda hücrede şu değişiklikler gözlenir:

1) Ekstraselüler boşluk: Serbest radikaller hücresel etkilerinin yanı sıra ekstraselüler etkilere de yol açarlar. Hücrenin göstereceği yangısal yanıt ve takip eden doku hasarının boyutunu belirlemede serbest radikaller önemli rol oynarlar. Süperoksit anyonu ve hidroksil radikali ekstraselüler matrikste "Oksidatif indirgeme depolarizasyon tepkimeleri" olarak tanımlanan bir dizi tepkime ile hyalüronik asidi ve kollajeni parçalamaktadırlar. Hyalüronik asit ve kollajenin yıkılımı yaşayan dokuların yapısal özellikleri ile membran geçirgenliklerini belirgin olarak değiştirmektedir (66). Bu durum hyalüronik asit gibi glikozaminoglikanların bol miktarda bulunduğu ekstraselüler sıvılarda (örneğin; göz vitreusu ya da sinoviyal sıvı) izlenir (6).

HEDEF	SONUÇ
Doymamış ve tiol içeren aminoasitler	Protein denatürasyonu ve çapraz bağların oluşumu, enzim inhibisyonu ve hücre membran geçirgenliğinde değişiklik
Nükleik asit bazları	Baz hidroksilasyonu, hücre döngüsünde değişiklik, mutasyon
Karbonhidratlar	Hücre membranı reseptör duyarlılığında değişiklik
Doymamış lipidler	Kolesterol ve yağ asidi oksidasyonu, lipid çapraz bağ oluşumu, organel ve hücre membran geçirgenliğinde değişiklik
Kofaktörler	Nikotinamid ve flavin içeren kofaktörlerin miktarında ve aktivitesinde azalma
Nörotransmitterler	Serotonin ve epinefrin gibi nörotransmitterlerin miktarında ve aktivitesinde azalma
Antioksidanlar	E vitamini ve β karoten ile katalaz ve SOD enzimlerinin inhibisyonu, GSH Px aktivitesinde değişiklik olmaması
Proteinler	Peptid zincirde kopma, denatürasyon
DNA	Zincir kopması, baz değişikliği
Hyalüronik asit	Sinoviyal sıvı akışkanlığında değişiklik

Tablo 1. Serbest radikallerin hücresel etkileri

2) Biyomembranlar: Memeli hücre membranları peroksidatif hasara karşı çok duyarlı olan çok doymamış yağ asidlerini (PUFA) bol miktarda içermektedir . Bu yağ asidlerinin peroksidasyonu aşağıdaki şekilde gerçekleşir (66):



PUFAO_2^{\bullet} , PUFAO_2H , metal iyonu \longrightarrow alkanlar, alkanallar, alkenaller, 4 hidroksi alkenaller

Radikal, yağ asidi ile birleşerek tepkimeleri serisini başlatır. Radikal yağ asidinin oksijenle birleşmesi sonucu lipid peroksid radikal (ROO') oluşur. Lipid peroksid radikalleri başka yağ asidi yan zincirleriyle tepkimeye girerek lipid hidroperoksitleri oluştururlar.

Üç ya da daha fazla çifte bağ içeren yağ asidlerinin peroksidasyonu malondialdehid üretimine yol açar. Bu peroksid ürünleri metal iyonları varlığında bazı enzimatik tepkimeler ile etan, pentan, malondialdehid benzeri yıkım ürünlerinin yanısıra yaşlanma pigmentleri ya da lipofüsin olarak adlandırılan, kemiluminesans ve floresans veren bileşikler de oluştururlar.

Lipid peroksidasyonu ve kükürt içeren proteinlerin oksidasyonu sonucu membran geçirgenliği ve kırılabilirliği artar. Peroksidasyon sonucu oluşan malondialdehid membran bileşiklerinde çapraz bağlanmaya ya da polimerizasyona neden olarak iyon transportu, enzim aktivitesi gibi membran özelliklerinde değişikliklere neden olur. Ayrıca diffüzyibl bir ürün olan malondialdehid DNA'nın nitrojen bazları ile de tepkimeye girer. Bunun sonucunda membran enzimlerinin aktivitesi azalırken hücreye Ca^{+2} girişi artar.

Hücre içi serbest Ca^{+2} artışı bir dizi hasar yapıcı olayı başlatır (50,66,67). Bu olaylar fosfolipaz aktivitesi ile fosfolipid kaybında artış, membran geçirgenliğinde değişiklik, akışkanlığın azalması, negatif yüzey geriliminde artma, potansiyel kaybına bağlı toksik etkide artış, proteaz aktivasyonu ile proteolitik etkinin şiddetlenmesi, katabolik enzimlerinin aktivitesinde artış ve endonükleaz aktivitesi ile DNA kırılmalarının oluşumudur.

Membran hasarı hücre zarfını etkilemesinin dışında önemli organelleri çevreleyen membranları da etkilediğinden lizozom ve mitokondri gibi organeller de etkilenir. Ortama salınan lizozomal enzimler serbest radikallerin yol açtığı hücresel hasarı artırır (6).

3) Proteinler: Oksijen metabolitlerinin saldırdığı bir bölüm de iyonların transportunda ve hücre içi iyonik homeostazında önemli rolleri olan membran proteinleridir. Serbest radikallerin sülfür içeren moleküller ve doymamış bileşiklerle reaktivitesine bağlı olarak triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin ve sistein gibi amino asitleri içeren proteinler amino asit modifikasyonuna uğrayabilirler (13). Bunların yanı sıra sitoplazma ve membrandaki proteinler ozon ve protoporfirin IX gibi okside edici ajanlarla karşılaştıklarında çapraz bağlar ya da büyük agregatlar oluştururlar.

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan aldehid ürünleri kovalan olarak proteinlere ve özellikle lizin artıklarındaki epsilon amino gruplara bağlanırlar (12).

4) Mitokondria: Normal koşullarda mitokondria, oksijeni sitokrom oksidaz sistemi ile suya indirgeyerek detoksifiye etmektedir. Elektron transport zincirinde yer alan pek çok bileşik (NAD, FAD, Koenzim Q gibi) oksijen ile tepkimeye girerek O_2^- salınımına neden olur. "Tek değerli oksijen kaçağı" olarak bilinen bu olay normal koşullarda hücrenin savunma sistemleri ile yok edilebilmektedir. Oksidan stres durumunda savunma sistemleri yetersiz kalmakta ve mitokondriada hasar oluşmaktadır. Bu hasar sonucu hücrenin

enerji sisteminin etkilenmesi ile ATP kullanımında artma ve ATP sentezinde azalma ile bağlantılı olarak hücrede ATP düzeyi hızla düşer. Gliseraldehid 3 fosfat dehidrogenazın aktivitesinin azalması iki SH grubunu kaybetmesine bağlıdır. Böyle bir moleküle NAD bağlanamayacağı için ATP sentezi ve ATP sentetaz aktivitesi inhibe olmaktadır.

Enerji üretiminden sorumlu organel olan mitokondrinin kendi DNA'sı vardır. mtDNA'nın bir özelliği mtDNA'da nükleer DNA'ya göre çok daha yüksek oranda mutasyon olması ve mtDNA mutasyonunun bireylerin yaşam süresi boyunca birikmesidir. Ayrıca mtDNA nükleer DNA'yı koruyan histonları içermediğinden oksidatif hasara karşı daha hassastır. Gen teknolojisindeki son gelişmeler mtDNA mutasyonları arasındaki ilişkileri araştırmaktadır. Bu mutasyonlar hücresel enerji metabolizmasının yıkılmasına (respiratuvar zincirde defektler) ve yaşla ilgili dejeneratif hastalıkların gelişimine yol açar (28).

5) Çekirdek: Herhangi bir nedenle oluşmuş olan serbest radikaller ve özellikle malondialdehid hücre çekirdeğinde DNA ile tepkimeye girmektedir. Nükleik asid yapısındaki baz değişimleri ya da DNA zincir kopması sonucu kromozomal yapıda oluşan değişiklikler sitotoksositeye neden olmaktadır. (Mutajenik ve karsinojenik etkiler) .

6) Sitozol: Sitoplazmada bulunan proteinlerin çoğu ile oksihemoglobin, katalaz gibi hemoproteinler serbest radikallere karşı özellikle duyarlıdırlar. Antioksidan bir enzim olan süperoksid dismütazın da katalitik aktivitesi için gerekli olan histidin kalıntısı radikallerle bloke edilerek aktivitesi inhibe edilmektedir.

Biyolojik sistemlerde lipid peroksidasyonu

Sitoplazmik yapının ve biyolojik membranların temel elemanı, organik dünyanın belki de en stabil molekülleri olan fosfolipidlerin içerdiği ansatüre yağ asidi zincirleridir. Biyolojik sistemlerde lipid peroksidasyonu büyük önem

taşıır; bazı kimyasal ajanlar ile oluşan karaciğer ve pulmoner hasarın patogeneğinde membran poliansatüre yağ asidlerinin peroksidatif yıkımı yer almaktadır (24).

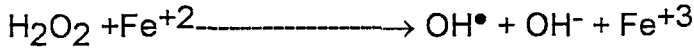
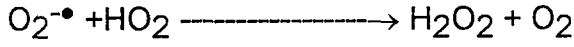
Radikallerin yol ağtığı lipid peroksidasyonu patolojik ya da fizyolojik işlemlere (prostaglandin sentezi ya da yaşlanma) eşlik edebilir

Lipid peroksidasyonu yağların özellikle poliansatüre yağ asidlerinin oksidatif oksijen bağımlı yıkılımı olarak tarif edilir ve dallanan bir zincir reaksiyonudur (61,76).

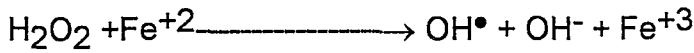
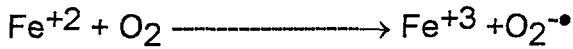
Teorik olarak üç tip radikal, peroksidasyonun başlatılmasında yer almaktadır:

- 1) Mitokondri solunum zincirindeki elektron transportunda ve endoplazmik retikulumdaki hidrosilasyon sisteminde yer alan semikinonlar
- 2) Moleküler oksijen ile bazı maddelerin otooksidasyonu esnasında ya da biyolojik sistemlerin iyonlaştırıcı veya UV radyasyonuyla başlatılan tepkimelerde oluşan organik serbest radikaller
- 3) Oksijen molekülüne ard arda elektron ilavesi ile oluşan serbest radikaller ($O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , 1O_2)

Lipid peroksidasyonunu başlatan serbest radikallerin meydana gelişinde bazı metallerin esas rolü oynadığı kabul edilmektedir. Eksperimental sistemlerde genellikle demir veya bakır tuzları kullanılmaktadır. Çeşitli vücut sıvılarından elde edilen, proteine bağlı olmayan demirin lipid peroksidasyonunu başlatabileceği gösterilmiştir. Ferritin de askorbat varlığında lipid peroksidasyonunu stimüle eder. Fe^{+3} ü Fe^{+2} 'ye indirgeyecek redükleyici bir ajan bulunduğunda, Fe^{+3} veya ferrik şelatlar lipid peroksidasyon tepkimelerini başlatabilirler. Çoğu kez ksantin oksidazın ksantin ya da hipoksantine etkisi ile oluşan süperoksid radikali redükleyici etki göstermektedir. Askorbat da bağımsız bir mekanizma ile Fe^{+3} ü indirgemektedir.



Fe^{+2} 'i bir oksidanın Fe^{+3} 'e oksidlemesiyle de lipid peroksidasyonu başlayabilir. Çoğu kez oksidan moleküller oksijen ve hidrojen peroksiddir.



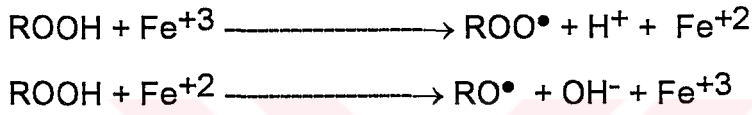
H_2O_2 ve Fe^{+2} kombinasyonuna Fenton reaktifi denilmektedir.

Lipid peroksidasyonu bir ansatüre yağ asidinin cis iki çift bağı arasındaki metilenden hidrojen atomu çıkması ile başlamaktadır. Ansatüre yağ asidi cis-cis pentadien merkezinden hidrojen ayrılması oto oksidasyonda hız sınırlayıcı basamak olarak kabul edilmektedir. Bu tepkimeler yalnızca lipid radikalleri ve oksijen içerdiğinden otooksidasyon terimi kullanılmaktadır. Ansatüre yağ asidlerinin termodinamik olarak en stabil ürünü allik radikallerdir. Poliinsatüre yağ asidlerinde ayrılmaya uygun birçok metilenik hidrojen vardır. Örneğin araşidonik asid 7, 10 ve 13. karbonlarda bulunan üç adet ikili allik kısma sahiptir. Lipooksijenaz gibi enzim katalizi etkisi ile ansatüre yağ asidi peroksidasyonunda selektif olarak spesifik metilenik karbondan aktive olmuş hidrojen çıkarılır. Oluşan lipid pentadienil radikali araşidonik asidde olduğu gibi 5, 8, 9, 12 ve 15. karbonlardaki oksijen ile reaksiyona girmektedir (61).

Singlet oksijen ve hidroksil radikalinin her ikisi de lipid peroksidasyonunu başlatabilmekte fakat peroksidasyon mekanizmaları farklı olmaktadır. Lipid radikal (lipid peroksid) zincir tepkimesinin uzunluğu ve böylece lipid peroksidasyonunun şiddeti lipid ansatürasyonunun derecesine göre artmaktadır. Hidroksil radikali ile oluşan lipid peroksidasyonunda ansatüre yağ asidinin iki allik karbonundan hidrojen atomu çıkmaktadır. Singlet oksijen

ile olanda oksijen direkt olarak olefine ilave olmaktadır. Bu farklılık sonuçta oluşan peroksidasyon ürünlerinde kendini göstermektedir. Buna örnek olarak oleik asitten hidrojen atomu çıkması ile 8 ve 11 hidroperoksid izomerleri 9 ve 11 izomerleri oluşurken, singlet oksijen etkisi ile 9 ve 10 hidroperoksidlerin oluşması verilebilir. Lipid peroksidasyonunu başlatan diğer bir ajan NO₂'dir. Hidrojen atomu çıkması ya da oleine NO₂ ilavesi ile peroksidasyon oluşmaktadır.

Peroksid zincir tepkimesi hidroperoksidlerin metallerce katalizlenen yapı değişikliği ile devam etmektedir.



Ansatüre yağ asidinden serbest radikallerin etkisi sonucu hidrojen çıkması ile konjuge dienler oluşmakta, konjuge dienlerin oksijen ile tepkimeye girmesi ile lipid peroksid meydana gelmekte, bu da son olarak lipid endoperoksida çevrilmektedir. Endoperoksid hidrokarbonlar gibi bileşiklerle tepkimeye girerek alkali radikal ve lipid hidroperoksid oluşmaktadır. Endoperoksidden malonaldehid ya da malondialdehid de oluşabilmektedir. Malonaldehid proteinlerin ε - amino grupları ile tepkimeye girerek fluorokromları (konjuge schiff bazları) meydana getirmektedir. Malonaldehid ve malondialdehid aromatik aminlerin ve fosfolipidlerin amino grupları ile tepkimeye girebilmektedir. Böylece amino-imino- propen bileşiği oluşmaktadır (77).

Peroksidasyona uğramış olan poliansatüre yağ asidlerinin, özellikle araşidonik asidin β ayrılması ile oluşan 3 karbonlu bileşik malondialdehiddir. Birçok biyolojik makromolekülle reaktivitesi olan malondialdehid yoğun olarak çalışılmalıdır. Malondialdehid araşidonik asidin yanı sıra birçok lipoksiden, hidroperoksidlerden, endoperoksidlerden, prostoglandinlerden ve tromboksanlardan oluşur. Reaktivitesinden ötürü MDA biyolojik örneklerde serbest olarak kalmaz (34).

MDA serbest olarak ya da değişik doku bileşenleri ile kompleks şekilde bulunabilir. İn vivo iyonize radyasyon ile serbest radikal üretimi sonucu bazı makromoleküllerin oksidatif yıkılımı sonucu oluşur. Prostaglandin biyosentezi de MDA oluşumuna yol açar, ancak ansatüre yağ asidlerinin peroksidasyonu ana kaynaktır. Doku lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA selüler düzeyde metabolize edilir: Karaciğer aldehid dehidrogenazı tarafından enzimatik olarak yıkılıma uğrar, CO₂'e metabolize olur, mitokondrial yolda yıkılabilir, idrarda asid ile hidrolize edilebilen formda küçük miktarlarda eksrete edilir. MDA hücre hasarında yol aldığı gibi yaşlanma pigmentleri olan lipofüsinlerin oluşumunda da etkilidir. MDA'nın mutajenik özellikleri olduğu ve kimyasal karsinojen gibi davrandığı da bilinmektedir (74).

Plazma lipid peroksid düzeylerine yaş ve cinsiyetin etkili olduğu bildirilmektedir. Yaş arttıkça lipid peroksidleri yükselmektedir (24,35). Bu yükselme VLDL ve LDL fraksiyonlarındaki lipid peroksidlerinin artışına bağlıdır. HDL lipid peroksidleri ise yaşla değişmemektedir.

Antioksidan Savunma

Hücreler oksidatif hasarı önleyen, yok eden ya da kısmen azaltan bazı mekanizmalara sahiptir. Oksidanlarla mücadelede birinci aşama risk faktörlerinin belirlenmesi ve bunlardan uzak durulmasıdır. İkinci yol ise doku hasarına yol açan olayın etkisi ile tetiklenen biyokimyasal tepkimeleri bir ya da birkaç basamakta engellemektir. Bu amaçla yapılabilecek girişimler şunlar olabilir: Na⁺ aktif girişinin engellenmesi, K⁺ girişinin aktive edilmesi, hücre içi laktik asidozun inhibisyonu, sitotoksik ve vazojenik antiödem girişimler, yeniden fosfolipid sentezi hızlandırıcıları, kalsiyum kanal blokerleri, lipid peroksidasyonu ve siklooksijenaz inhibitörleri, lökotrienlerin inhibisyonu, opiat antagonistleri, PAF inhibitörleri, H₂ reseptör antagonistleri, atrial natriüretik peptid, hipotermi...(26,50). Üçüncü aşama aktive olmuş nötrofillerin lezyon bölgesine hücumunu ve birikimini inhibe etmek için antienflamatuvarların

kullanılmasıdır. Dördüncü ve en etkin yol artmış oksidanlara doğrudan etki ederek onları yoketmektir. Direk etki ile oksidanları inaktif hale getiren maddelere "antioksidanlar" denir. Tüm antioksidanlar başlıca dört yol ile etkilerini gerçekleştirmektedir. Bu etkiler;

1) Scavenging etki; oksidanları tutma ve zayıf bir moleküle dönüştürme etkisidir. Enzimler bu şekilde etki eder.

2) Quencher etki; oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme tepkimesidir. Vitaminler, flavanoidler bu şekilde etki eder.

3) Onarma etkisi

4) Zincir koparma etkisi; Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarının önlenmesi etkisidir. Ağır mineraller, hemoglobin, seruloplazmin bu yolla etki eder.

Doğal Antioksidanlar

1) Enzimler

Süperoksid dismütaz; $O_2^{\bullet-}$ 'nin hidrojen peroksida dismütasyonunu katalizler.

Katalaz; hidrojen peroksidin dismütasyonunu katalizler.

Glutasyon peroksidaz; Hidrojen peroksid ve lipid peroksidlerinin redüksiyonunu katalizler.

Glutasyon redüktaz; GSSG'nin GSH'ye dönüşümünü sağlayarak indirekt yolla antioksidan etki gösterir.

Hidroperoksidaz

Sitokrom c oksidaz; Hücredeki oksijenin % 95'ini detoksifiye eder.

2) Ekstraselüler sıvının nonenzimatik antioksidanları

Seruloplazmin; demiri okside eder.

Transferrin; dolaşımdaki demiri bağlar.

Hemoglobin oksidanları bağlar.

E vitamini ve analogları; lipid peroksidasyon zincirini kırarlar.

C vitamini $O_2^{\bullet-}$ ve OH^{\bullet} 'i direkt olarak tutar, E vitaminini rejenere eder.

Tiyol içerenler (glutatyon, N asetil sistein, metiyonin, kaptopril); serbest radikal ve HOCl tutucusudur.

A vitamini; direkt olarak peroksillere etki eder.

Ürik asid; $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} ve peroksil tutucusudur.

Sistein $O_2^{\bullet-}$ ve OH^{\bullet} tutucusudur.

Ubikinon; serbest radikal tutucusudur.

Glikoz; hidroksil radikal tutucusudur.

Bilirubin; $O_2^{\bullet-}$ ve OH^{\bullet} tutucusudur.

Albümin; bakırı bağlar, LOOH ve HOCl tutucusudur.

Pirüvat; Hidrojen peroksid tutucusudur.

Haptoglobülin; hemoglobini bağlar.

Hemopeksin; serbest hemi bağlar.

Ayrıca hücre içi bölükleri en etkin endojen antioksidan mekanizmayı sağlarlar. Mitokondri, lizozom, peroksizom ve sitoplazma serbest radikal üreten sistemlerine karşı savaşan antioksidan savunma mekanizmaları ile eşleşmiştir (27).

Antioksidan aktiviteyi arttıran ilaçlar

Ebselen; endojen glutatyon peroksidaz aktivitesini arttırırlar.

Demir şelatörleri; deferoksamin, dimetil tioüre, serüloplazmin; serbest Fe^{+3} ü bağlarlar.

Sitokinler; TNF ve interlökin-1

Ksantin oksidaz inhibitörleri; allopurinol, oksipürinol; ksantin oksidaz tarafından süperoksid üretimini inhibe ederler.

Proteaz inhibitörleri; serin proteaz inhibitörleri, fenilmetilsülfonil florid; ksantin oksidazın ksantin dehidrogenaza dönüşümünü bloke ederler.

NADPH oksidaz inhibitörleri; adenozin, lokal anestezikler, Ca^{+2} kanal blokerleri, nonsteroidal antiinflatuar ajanlar; nötrofil ve makrofajlardaki NADPH oksidaz üretimini inhibe ederler.

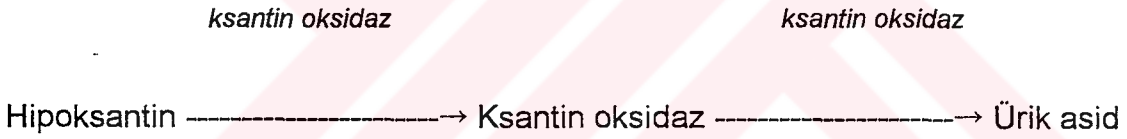
Mannitol; OH^{\bullet} radikalini tutar.

Barbitüratlar
Flavanoidler
Trimetazidin
Indepamid
H₂ reseptör blokerleri

Enzimatik Antioksidan Savunma Sistemleri

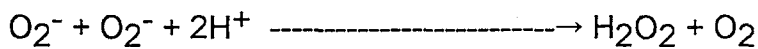
◆ Süperoksid dismütaz (süperoksid oksidoredüktaz-SOD, EC 1.15.1.1.)

Fridovich ve arkadaşları 1968 yılında daha önce alyuvarlardan saflaştırılan fakat herhangi bir enzimatik aktivitesi saptanamayan bakır içeren bir proteinin (eritroküprein) ksantin oksidaz deney sistemine eklendiğinde sitokrom C'nin indirgenmesini inhibe ettiğini bulmuşlardır. Ksantin oksidaz tepkimesinde O₂⁻ oluştuğu ve bu radikalin sitokrom c'yi indirgediği daha önce bilindiğinden aşağıdaki tepkime ifade edilmiştir:



Böylece daha önce çeşitli dokularda saflaştırılan, fonksiyonu bilinmeyen ve elde edildiği dokuya göre hemoküprein, eritroküprein, serebroküprein, hepatoküprein vb. diye adlandırılan proteinlerin birer enzim oldukları ve O₂⁻'nin dismutasyonunu katalizledikleri gösterilmiş ve enzim süperoksid dismütaz olarak adlandırılmıştır.

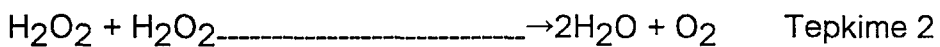
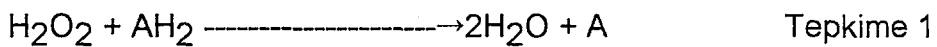
Oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunan ve süperoksidin hidrojen perokside dismütasyonunu katalizleyen bir metaloenzim olan SOD şu tepkimeyi gerçekleştirir (53)



Bugüne kadar dört farklı şekli bulunmuştur. Bunlardan biri ökaryotik hücrelerin sitozolünde ve mitokondrianın intermembran aralığında bulunur. Molekül kütlesi 31 200 Da olan bu enzim her bir dimerik protein için birer molekül bakır ve çinko içerir. Çinkonun stabiliteyi sağladığı, bakırın ise aktiviteden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Çinkonun ayrılması irreversibl iken bakır reversibl ayrılır ve tekrar bağlanabilir, ancak bağlanma yeri aynı reseptör olmayabilmektedir. Bu enzimin önemli bir örneği sığır ve insan eritrositlerinde bulunan eritrokupreindir. SOD'un iki tipi her bir molekül başına iki adet manganez içermektedir. Bu enzimlerden biri mitokondria matriksinde bulunurken diğeri E.Coli gibi bakterilerin sitozolünde bulunur. CuZn-SOD siyanür ile inhibe olurken Mn-SOD siyanür ile inhibe edilemez (78). Dördüncü tip SOD demir içerir ve E.Coli'nin periplazmik aralığında bulunur. Molekül kütlesi 40 000 Da olan bu enzim yapısal olarak Mn-SOD'a büyük benzerlikler göstermektedir.

◆ **Katalaz (EC:1.11.1.16)**

Katalaz yapısal olarak bir hemoproteindir. Sığır karaciğerinde yürütülen çalışmalarda katalazın molekül kütlesinin 248 000 Da olduğu ve non kovalan bağlı protoporfirin IX Fe (hem) grubu içerdiği ortaya konmuştur (49,68). Eritrosit dışında özellikle peroksizomlarda yoğun olarak bulunur (79). Kan, kemik iliği, karaciğer muköz membran ve böbrekte yüksek miktarlarda bulunmaktadır. Düşük hızlarda hidrojen peroksidin olduğu durumlarda ya da yüksek elektron alıcısı konsantrasyonlarda peroksidatif tepkimeyle (tepkime 1), hidrojen peroksid oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkimeyle (tepkime 2) hidrojen peroksidi suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırır.



ARAÇ-GEREÇ ve YÖNTEMLER

I-ARAÇ

1. Spektrofotometre-LKB Biochrom Ultraspec II*
2. Spektrofluorometre-Aminco Bowman*
3. Soğuk santrifüj-Hettich*
4. Homojenizatör-Braun Melsungen*
5. pH metre-Radiometer Copenhagen PHM 63 digital pH meter*
6. Su banyosu-Kottermann*
7. Hassas Terazî-Mettler H 20*
8. Derin Dondurucu-So-LOW Environmental Epu ip. CO**
9. Manyetik karıştırıcı-Heidolph*
10. Filtre kağıdı-Whatmann No.1*
11. Spektrofotometrik mikro cam küvet-Hellma*
12. Otomatik pipetler-Gillson*
13. Cam pipetler-Assistant*

Bu araştırma Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesinde Deneysel Cerrahi ve Araştırma Birimi, Biyokimya Anabilim Dalı ve Farmakoloji Anabilim Dalı olanaklarının bir arada kullanılmasıyla yürütülmüştür.

*Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

**Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı

II-KİMYASAL MADDELER

1) Reaktifler

- Sakkaroz, (Merck)
- EDTA, (Sigma)
- Kinüramin HBr, (Sigma)
- Dipotasyum hidrojen fosfat, (Merck)
- Potasyum dihidrojen fosfat, (Merck)
- 4 Hidroksikinolin (HQ), (Merck)
- Sodyum hidroksit, (Merck)
- Disodyum hidrojen fosfat, (Merck)
- Triklor asetik asit, (Merck)
- Tiobarbitürik asit, (Sigma)
- Kloroform, (Merck)
- Metanol, (Fluka)
- Sikloheksan, (Riedel-de Haen)
- Hidrojen peroksit, (Merck)
- Epinefrin, (Sigma)
- Sodyum - Potasyum tartarat, 4 H₂O , (Merck)
- Bakır sülfat, 5 H₂O, (Merck)
- Sodyum karbonat, (Merck)
- Folin chioaltea
- Sodyum molibdat 2H₂O, (Merck)
- Fosforik asit (% 85), (Merck)
- HCl (% 38), (Merck)
- Lityum sülfat, (Merck)
- Brom, (Merck)
- Sodyum klorür, (Riedel-de Haen)

2) Tamponlar ve solüsyonlar

MAO aktivitesini ölçmede yararlanılanlar:

- Homojenizat çözeltisi, 0.4 M Sakkaroz ve 0.0001 M EDTA

13.629 gr sakkaroz ve 0.0372 gr EDTA 100 ml. distile suda çözülür.

- MAO substrat çözeltisi

Kinüramin-dihidrobromür (kinüramin-2 HBr) 1×10^{-3} M konsantrasyonda kullanılır. 31.4 mg Kinüramin-2 HBr 100 ml. distile suda çözülür. pH = 8.6 olacak şekilde 0.1 N HCl ya da 0.1 N NaOH ile titre edilir.

- Fosfat tampon, 0.5 M, pH = 7.4

KH_2PO_4 17.01 g tartılıp 250 ml. distile suda çözülür.

K_2HPO_4 21.7725 g tartılıp 250 ml. distile suda çözülür.

1. çözeltiden 24 ml, II. çözeltiden 132 ml alınır ve pH = 7.4'e ayarlanır.

- 4-Hidroksikinolin trihidrat (4 HQ) çözeltisi

1×10^{-3} M konsantrasyonda kullanılır. 19.921 mg 4 HQ tartılarak 100 ml. distile suda çözülür. Bu çözeltiden kullanılacağı zaman 1 ml alınarak 100 ml'ye distile su ile tamamlanır ve 10^{-5} M konsantrasyonda çalışma çözeltisi hazırlanır.

- 4N NaOH

160 g NaOH tartılarak 1000 ml. distile suda çözülür.

Malondialdehid ölçmede yararlanılanlar:

-% 0.9 Serum fizyolojik 9 gr.NaCl tartılıp 1000 cc suda çözülür.

-% 5 Triklor asetik asit (TCA) 5 cc. TCA alınıp 100 cc suda çözülür.

-% 0.67 Tiobarbitürik asit (TBA) 6.7 mg.tiobarbitürik asit 100 cc distile suda çözülür.

Dien konjugatları ölçmede kullanılanlar:

-Fosfat tampon (0.5M)

17.01 gr. KH_2PO_4 distile su ile 250 ml'ye tamamlanır.

21.7725 gr. K_2HPO_4 distile su ile 250 ml'ye tamamlanır

KH_2PO_4 (12 ml) ile K_2HPO_4 (66 ml) oranında karıştırılır, pH 7.4'e ayarlanır.

-Kloroform

-Metanol

-Sikloheksan

SOD aktivitesini ölçmede yararlanılanlar:

- Fosfat tampon, 50 mM, pH=7.0

KH_2PO_4 6.81 g tartılıp 1 lt distile suda çözülür.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 8.9 g tartılıp 1 lt distile suda çözülür.

-Karbonat tampon, 50mM, pH=10.2

Na_2CO_3 anhidr 5.3 g tartılıp 1 lt distile suda çözülür.

NaHCO_3 4.2 g tartılıp 1 lt distile suda çözülür.

- Epinefrin çözeltisi

1mM HCl içinde % 0.55'lik epinefrin çözeltisi hazırlanır.

Katalaz aktivitesini ölçmede yararlanılanlar:

- 30 mM H_2O_2

Taze olarak hazırlanır. 0.34 ml %30'luk H_2O_2 , fosfat tampon ile 100 ml'ye tamamlanır.

Protein ölçmede yararlanılanlar:

- % 2 Sodyum karbonat çözeltisi

0,1 N sodyum hidroksit içinde hazırlanır.

- Taze hazırlanmış alkali bakır çözeltisi

100 ml sodyum karbonat çözeltisine 1 ml. bakır sülfat ve 1 ml. sodyum potasyum tartarat çözeltisi konarak hazırlanır.

- Folin-Chiocalteu çözeltisi:

Bir balon içerisine 100 gr. sodyum tungstat, 25 gr. sodyum molibdat.2H₂O'lu, 700 ml. distile su, 50 ml. % 85'lik fosforik asit ve 100 ml. konsantre HCl konularak geri soğutucu altında 10 saat kaynatılır. 150 gr. lityum sülfat, 150 ml. distile su ve 1-2 damla brom eklendikten sonra geri soğutucusuz 15 dk. daha kaynatılır. Soğutulduktan sonra 1 litreye tamamlanır. Belirli bir hacim alınarak fenolfitaleine karşı 0.1 N. Sodyum hidroksit ile titre edilerek normalitesi belirlenir. Normalitesi 1 olacak şekilde 1 N. HCl ile seyreltilir.

3) Standartlar

- MAO standartı, 4 HQ 10⁻⁵ M

-Süperoksid dismütaz standardı, bovin eritrosit SOD, 3000 Ü, Sigma

-Protein standardı, Bovin Serum Albümin

200 mg/100 ml. konsantrasyonda Bovin serum albümin çözeltisi hazırlanarak 25-200 mg/dl'lik standartlar için gerekli seyreltmeler bidistile su ile yapılır.

III. ÇALIŞMA MATERYALLERİ

Bu çalışmada Swiss-Albino türü erkek sıçanlar kullanılarak 6 çalışma grubu oluşturulmuştur.

1. Grup: GENÇ SIÇAN GRUBU

(n=10)

2-3 aylık Swiss-Albino türü erkek sıçanlardan oluşturulmuştur. Sıçanlar, standard koşullarda standard diet (pelet yem) ile beslenmişlerdir.

2. Grup: YAŞLI SIÇAN GRUBU

(n=10)

16-18 aylık Swiss-Albino türü erkek sıçanlardan oluşturulmuştur. Sıçanlar, standard koşullarda standard diet (pelet yem) ile beslenmişlerdir.

3. Grup: GENÇ KONTROL GRUBU

(n=10)

2-3 aylık Swiss-Albino türü erkek sıçanlardan oluşturulmuştur. Standard koşullarda standard diet (pelet yem) ile beslenen sıçanlara 5 cc serum fizyolojik bir defada intraperitoneal olarak verildikten 1.5 saat sonra hayvanlar dekapite edilmişlerdir.

4. Grup: YAŞLI KONTROL GRUBU

(n=10)

16-18 aylık Swiss-Albino türü erkek sıçanlardan oluşturulmuştur. Sıçanlar, standard koşullarda standard diet (pelet yem) ile beslenmişlerdir. Sıçanlara 5 cc serum fizyolojik bir defada intraperitoneal olarak verilmiş ve dekapitasyon uygulanmıştır.

5. Grup: DEPRENİL UYGULANAN GENÇ SIÇAN GRUBU

(n=10)

2-3 aylık Swiss-Albino türü erkek sıçanlardan oluşturulmuştur. Sıçanlar, standard koşullarda standard diet (pelet yem) ile beslenmişlerdir. Sıçanlara bir kez 25 mg/kg Deprenil 2.5 cc serum fizyolojik içinde çözülerek intraperitoneal olarak verilmiş ve 1.5 saat sonra dekapitasyon uygulanmıştır.

6. Grup: DEPRENİL UYGULANAN YAŞLI SIÇAN GRUBU

(n=10)

16-18 aylık Swiss-Albino türü erkek sıçanlardan oluşturulmuştur. Sıçanlar, standard koşullarda standard diet (pelet yem) ile beslenmişlerdir. Sıçanlara bir kez 25 mg/kg Deprenil 2.5 cc serum fizyolojik içinde çözülerek intraperitoneal olarak verilmiş ve 1.5 saat sonra dekapitasyon uygulanmıştır.

IV. ÇALIŞMADA KULLANILAN YÖNTEMLER

Çalışmadaki tüm sıçan gruplarından dekapitasyon sonucu elde edilen karaciğer ve böbrek dokularına sırası ile aşağıdaki işlemler ve analizler uygulanmıştır:

1. Karaciğer ve böbrek dokularının disseksiyonu ve homojenizasyonu
2. Karaciğer ve böbrek dokularının MAO düzeylerinin belirlenmesi
3. Karaciğer ve böbrek dokularının lipid peroksidasyon ürünlerinin (malondialdehid, dien konjugatları) belirlenmesi
4. Karaciğer ve böbrek dokularında antioksidan enzim (katalaz, süperoksid dismütaz) aktivitelerinin belirlenmesi
5. Karaciğer ve böbrek dokularında protein düzeylerinin belirlenmesi

-Dokuların disseksiyonu ve homojenizasyonu

Sıçanlar dekapite edildikten sonra karaciğer ve böbrek doku örnekleri çıkarılarak serum fizyolojik ile yıkanmış ve buz üzerine alınarak laboratuvara

ulaştırılmıştır.Laboratuvara ulaştırılan örnekler Watman kurutma kağıdının üzerine alınmış daha sonra doku örnekleri hassas terazide tartılmış ve her bir doku üç kısma bölünmüştür. Bir kısım MAO tayini için EDTA-Sakkaroz çözeltilisi ile (1/10, w/v), ikinci kısım dien, SOD ve katalaz tayini için fosfat tampon (KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50 mM, pH=7.0) ile (1/10, w/v), son kısım ise malondialdehid tayini için distile su (2/1, w/v) ve % 5 TCA ile homojenizatör tüplerinde 1000 devirde (ortalama 10 vuru) buz üzerinde homojenize edilmiştir. Her bir homojenatlar 600 g x 10 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen üst fazlardan MAO, malondialdehid,dien konjugatları, SOD ve katalaz tayinleri sırası ile belirtilmişlerdir. Tüm santrüföj işlemleri +4 C'de gerçekteştirilmiştir.Analizler aynı gün içinde uygulanmıştır.

- Monoamin oksidaz tayini

Kraml'ın doku MAO yönteminin bir modifikasyonu olup fluorometrik ölçüme dayanmaktadır (37).

MAO enzim aktivitesinin saptanması için hazırlanan homojenat 0.1 ml alınarak üzerine 2.3 ml distile su konulur. Daha sonra sırasıyla 0.3 ml fosfat tampon, 0.3 ml kinüramin 2HBr çözeltilisi eklenerek 30 dk su banyosunda (37°C) inkübasyona bırakılır. Son hacmi 3 ml olan inkübasyon çözeltilisinin içinde 50 mM fosfat tampon, 1×10^{-4} M kinüramin 2 HBr substratı, 50-100 µg enzim ve distile su vardır.

Reaksiyon substratın eklenmesi ile başlatılır. Yarım saat inkübasyondan sonra tüpler su banyosundan çıkarılarak buz üzerine alınır. Üzerlerine 1 ml NaOH eklenerek reaksiyon durdurulur. Enzim aktivitesi ile orantılı olarak oluşan 4 HQ düzeyi 385 nm eksitasyon ve 318 nm emisyon dalga boyunda Aminco Bowman spektrofluorometrede okunur. Standart seri ile her denemede hazırlanan standart grafikten 4 HQ miktarı nanomol -olarak hesaplanır. Bulunan miktar mg protein miktarına bölünerek spesifik aktivite saptanır.

-Malondialdehid tayini

MDA tayini için kullanılan yöntemin prensibi, triklor asetik asitle deproteinize edilip MDA'nın TBA ile oluşturduğu kırmızı rengin spektrofotometrik ölçümüne dayanır (55).

MDA tayini için distile su ile 2/1 oranında hazırlanan homojenata 2 misli %5'lik TCA'dan eklenir. 2000 g'de 15 dk. santrifüj edilir. Süpernatantın 1.5 ml 'sine 1.5 ml % 0.67'lik TBA eklenir. Karışım 100°C'lik su banyosunda 30 dk.ısıtıldıktan sonra buz üzerine alınarak 5 dk. soğutulur.Örnekler spektrofotometrede 532 nm'de okunur.

Hesaplama:

MDA ($\mu\text{mol/kg}$ kc dokusu)

Ekstinsiyon katsayısı 153 000/Mol/cm

-Dien Konjugatları tayini

Dien konjugatlarının tayininde kloroform ve metanol ile lipidlerin ekstraksiyonu ardından azot gazı altında uçurulan kuru kalıntının sikloheksan fazında çözünmesi ve 233 nm'de absorbansın okunması esas alınmıştır (5). Dien konjugatlarının tayini için fosfat tampon ile dokunun % 10'luk homojenatı hazırlanır(Igr. doku 10 ml.fosfat tampon ile homojenize edilir). Elde edilen homojenattan 0.5 ml alınıp 7.5 ml. kloroform/metanol karışımı (2/1) eklenir. İyice karıştırılıp Whatman filtre kağıdından süzöldükten sonra süzöntünün 2 ml.si alınıp azot gazı altında uçurulur. Kuru kalıntıya 3 ml. sikloheksan eklenerek 233 nm'de sikloheksan körüne karşı okunur.

Hesaplama: nmol hidroperoksit/mg.protein

Ekstinsiyon katsayısı: $2.52 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$

-Süperoksit dismütaz tayini

Enzim tayini için hazırlanmış homojenat karbonat tamponu ile 1/100 dilüe edildikten sonra çalışılmış ve sonuçlar doku proteinine göre değerlendirilmiştir.

SOD düzeyleri Optimum pH=10.2'de epinefrinin adrenokroma otooksidasyonu esasına dayalı kolorimetrik yöntem ile tayin edilmiştir (48).

2 ml. tampon üzerine 7 saniye içinde 0.2 ml. örnek ve 0.025 ml. epinefrinin % 0.55'lik (1mM HCl içinde hazırlanmış) çözeltisinden eklenerek absorbans artışı 15 sn. aralarla 3 dk. boyunca 480 nm'de okunur. Enzimin epinefrinin adrenokroma otooksidasyonunu inhibe etme yüzdesinin hesaplanmasından sonra standart grafikten elde edilen veriler Ü olarak değerlendirilir. 2,2 ml. tampon solüsyon ve epinefrin kullanılarak hazırlanan kör içinde aynı işlemler uygulanır.

-Katalaz tayini

Enzim tayini için homojenat fosfat tampon ile 1/100 dilüe edildikten sonra hidrojen peroksidin katalaz tarafından parçalanması temeline dayalı UV spektrofotometrik yöntem ile katalaz aktiviteleri tayin edilmiştir (2,42).

Taze hazırlanan ve 30 mM H₂O₂ içeren fosfat tampon çözeltisinden 3 ml üzerine 0.2 ml örnek eklenerek 240 nm'de absorbansın azalması 15 sn aralıklarla, 3 dk boyunca okunur ve lineer regresyonlara göre her bir analiz için en uygun absorbanslar bulunarak, k değeri aşağıdaki şekilde hesaplanır:

$$k = 2.3 / \Delta t \times \log A1/A2$$

Üniteye çevirmek için;

$$1 \text{ Ü} = 2.3 \times \log A1/A2 / t \times 6.93 \times 10^{-3} = \text{Ü}/0.1 \text{ ml.} \times 10 = \text{Ü}/\text{ml} \times 1000 \text{ (dilüsyon)}$$
$$= \text{Ü}/\text{ml}$$

-Protein tayini

Proteinlerin alkali ortamda bakır iyonları ile biüret tepkimesin vermesinden yararlanılan Lowry yöntemi ile yapılmıştır (41). İlk önce alkali solüsyonda peptid bağları bakır tuzları ile mor renkli bir kompleks oluştururlar. Daha sonra folin ilavesi ile protein yapısındaki tirozin ve triptofan aminoasitleride indirgenerek renk oluşumuna iştirak ederler.

Analiz tüpüne 0.1 ml doku homojenatı (1/1000) konularak 0.9 ml distile su ile dilüe edilir.  zerine taze hazırlanmış alkali bakır  zeltisinden 5 ml konarak karıştırılır ve oda ısısında 10 dk bekletilir. Karışımlara 1:1 oranında 1 N HCl ile dilüe edilmiş folin  zeltisinden 0.5 ml eklenerek hızla karıştırılır ve oda sıcaklığında 30 dk bekletilir. Oluşan renkli bileşik 750 nm dalga boyunda spektrofotometrede reaktif k re karşı okunur. Her deney grupları için ayrı standart serileri hazırlanarak bulunan değerler çizilen grafikten hesaplanır.

V- İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bu çalışmada bulguların istatistiksel değerlendirilmesinde MICROSTA istatistik programından yararlanılmıştır. Çoklu karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi ve ikili karşılaştırmalar için Student t testi kullanılmıştır. Ayrıca tüm değerler arasındaki korelasyonlar  iftleştirilmiş düzenli korelasyon testi ile araştırılmıştır.

BULGULAR

Normal genç ve yaşlı sıçan gruplarına, ayrıca serum fizyolojik verilen genç ve yaşlı kontrol gruplarına ve yanı sıra bir MAO inhibitörü olan deprenil uygulanan gruplara ait karaciğer dokularının MAO, malondialdehid (MDA), dien konjugatları, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz düzey ortalamaları Tablo 2,3,4' de verilmiştir. Aynı parametrelerin böbrek dokusuna ait ortalamaları ise sırası ile Tablo 5,6,7'de verilmiştir.

	Normal genç (n=10)	Normal yaşlı (n=10)
MAO(nmol/mg.protein)	68.34 ± 31.31	110.81 ± 33.67
MDA(nmol/gr.doku)	2.55 ± 0.9	15.38 ± 2.3
Dien konjugatları (nmol/mg.protein)	39.74 ± 14.32	111.14 ± 18.23
SOD(Ü/mg.protein)	7.88 ± 1.52	5.22 ± 1.40
Katalaz(Ü/mg.protein)	13.25 ± 4.5	9.24 ± 2.99

Tablo-2. Normal genç ve yaşlı sıçanlarda karaciğer MAO, MDA, Dien konjugatları, SOD ve Katalaz değerleri

	Genç serum fizyolojik (n=10)	Yaşlı serum fizyolojik (n=10)
MAO (nmol/mg.protein)	69.38 ± 28.67	106.72 ± 23.09
MDA (nmol/gr.doku)	2.67 ± 1.25	15.97 ± 2.43
Dien konjugatları (nmol/mg.protein)	38.69 ± 12.46	109.37 ± 16.35
SOD (Ü/mg.protein)	6.83 ± 1.43	4.89 ± 1.45
Katalaz (Ü/mg.protein)	12.74 ± 4.39	8.57 ± 3.45

Tablo-3. Serum fizyolojik uygulanan genç ve yaşlı sıçanlara ait karaciğer MAO,MDA, Konjuge dienler, SOD ve Katalaz değerleri.

	Genç deprenil (n=10)	Yaşlı deprenil (n=10)
MAO (nmol/mg.protein)	17.24 ± 5.45	19.34 ± 5.75
MDA (nmol/gr.doku)	1.88 ± 0.49	8.46 ± 2.8
Dienkonjugatları (nmol/mg.protein)	31.35 ± 6.52	41.19 ± 7.19
SOD (Ü/mg.protein)	6.85 ± 0.73	6.21 ± 1.39
Katalaz (Ü/mg.protein)	14.35 ± 2.44	8.60 ± 1.74

Tablo-4. Deprenil uygulanan genç ve yaşlı sıçanlara ait karaciğer MAO, MDA, Konjuge dienler, SOD ve Katalaz değerleri.

	Normal genç (n=10)	Normal yaşlı (n=10)
MAO (nmol/mg.protein)	26.07± 6.19	32.13±5.48
MDA (nmol/gr.doku)	3.14±0.49	18.67±4.18
Dienkonjugatları (nmol/mg.protein)	49.75±18.15	73.39±34.87
SOD (Ü/mg.protein)	8.31±2.16	6.51±1.68
Katalaz (Ü/mg.protein)	7.87±2.07	4.55±2.12

Tablo-5.Normal genç ve yaşlı sıçanların böbrek MAO, MDA, Konjuge dienler, SOD ve Katalaz değerleri.

	Genç serum fizyolojik (n=10)	Yaşlı serum fizyolojik (n=10)
MAO (nmol/mg.protein)	27.65±8.56	34.28±7.05
MDA (nmol/gr.doku)	4.17±1.65	18.83±5.23
Dienkonjugatları (nmol/mg.protein)	50.96±15.46	73.76±26.53
SOD (Ü/mg.protein)	7.89±1.45	6.751±1.93
Katalaz (Ü/mg.protein)	7.74±2.43	5.57±2.34

Tablo-6.Serum fizyolojik verildikten sonra genç ve yaşlı sıçanlara ait böbrek MAO, MDA, Konjuge dienler, SOD ve Katalaz değerleri.

	Genç deprenil (n=10)	Yaşlı deprenil (n=10)
MAO (nmol/mg.protein)	15.01±3.50	14.18±3.38
MDA (nmol/gr.doku)	2.45±0.97	10.75±2.66
Dienkonjugatları (nmol/mg.protein)	31.89±3.89	32.51±6.68
SOD (Ü/mg.protein)	7.56±1.38	6.78±2.05
Katalaz (Ü/mg.protein)	6.73±1.59	5.63±1.24

Tablo-7. Deprenil uygulandıktan sonra genç ve yaşlı sıçanlara ait böbrek MAO, MDA, Konjuge dienler, SOD ve Katalaz değerleri.

Bir MAO inhibitörü olan deprenilin uygulandığından sonra sıçan karaciğer ve böbrek dokusu MAO aktivitelerinde neden olduğu inhibisyonun yüzdesi ve bu inhibisyonun olduğu zaman dilimlerinin sonuçları sırası ile Tablo 8'de gösterilmiştir.

	1 haftada	1 günde	1.5 saatte
Karaciğer MAO aktiviteleri	% 15 düşüş	% 40 düşüş	% 72 düşüş
Böbrek MAO aktiviteleri	% 10 düşüş	% 35 düşüş	% 68 düşüş

Tablo 8- Deprenil uygulamasının karaciğer ve böbrek MAO aktivitesindeki zamanla bağlantılı oluşturduğu inhibisyon yüzdeleri.

Genç ve yaşlı sıçanların karaciğer MAO enzim aktiviteleri açısından karşılaştırıldığında yaşlı grupta anlamlı bir yükseklik görülmektedir ($p<0.001$). Buna karşın deprenil uygulanan her iki grupta ise bu düzeylerde anlamlı bir düşüş izlenmektedir ($p<0.001$) Aynı şekilde yaşlı grupta da bu düşüş daha anlamlı derecede belirgindir ($p<0.0001$) Ancak Şekil 2'de görüleceği gibi bu düşüş yaşlılarda daha da belirgindir.

Genç ve yaşlı sıçanlar karaciğer MDA düzeyleri açısından karşılaştırıldığında yaşlı grupta yine anlamlı bir yükseklik belirlenmiştir ($p<0.001$). Deprenil uygulanan genç sıçanlarda ilaç uygulanmamış normal gruba ve plasebo grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş izlenmektedir ($p<0.01$) Bu anlamlı düşüş aynı şekilde deprenil uygulanmış yaşlı grupta normal yaşlı gruba ve yaşlı plasebo grubuna

göre daha belirgindir ($p < 0.001$) Ancak Şekil 3'de görüldüğü gibi deprenil MDA değerlerini yaşlı grupta daha da belirgin bir şekilde düşürdüğü görülmüştür Yaşlı karaciğer MAO aktivitesi ve karaciğer MDA düzeyleri arasındaki korelasyon $r = 0.735$ ($p < 0.05$) dir. Deprenil uygulamasının ardından yaşlı grupta azalan karaciğer MAO aktivitesi ve azalan karaciğer MDA düzeyleri arasındaki korelasyon $r = 0.9499$ ($p < 0.01$)'dir. Yine deprenil uygulamasının ardından genç gupta azalan MAO aktivitesi azalan MDA düzeyleri arasındaki korelasyon $r = 0.8954$ ($p < 0.05$)'dir.

Diğer bir lipid peroksidasyon ürünü olan dien konjugatları ele alındığında ise yaşlı grupta genç gruba kıyasla yine anlamlı bir yükseklik görülmektedir ($p < 0.001$). Deprenil uygulanan genç ve yaşlı gruplarda bu düzeylerde yine sırası ile anlamlı düşüşler izlenmektedir ($p < 0.01$), ($p < 0.001$). Şekil 4'de bu düşüşün yaşlı sıçanlarda daha çarpıcı olduğu gözlenmektedir. Karaciğer MAO ve karaciğer dien düzeyleri arasındaki korelasyon $r = 0,894$ ($p < 0.05$)'dir Deprenil uygulamasının ardından yaşlılarda azalan karaciğer MAO aktivitesi ile azalan karaciğer dien düzeyleri arasındaki korelasyon $r = 0.9459$ ($p < 0.01$)'dir. Gençlere uygulanan deprenilden sonra azalan karaciğer MAO ve azalan karaciğer dien arasındaki korelasyon $r = 0.8707$ ($p < 0.05$) olarak bulunmuştur.

Antioksidan enzimlerden SOD'un aktivitesi yaşlı kontrol grubunda genç gruba göre bir düşüş gözlenmektedir ($p < 0.001$). Deprenil uygulamasının ardından ise genç ve yaşlı grupların SOD aktivitelerinde anlamlı bir farklılık izlenmemiştir (Şekil 5). Karaciğer SOD aktiviteleri ile deprenil verilmesinin önce ve sonrasında diğer parametrelerle arasında hiç bir korelasyona rastlanılmamıştır.

Karaciğer katalaz aktiviteleri ele alınacak olursa yaşlı sıçanlarda genç sıçanlara göre bir düşüş izlenmektedir ($p < 0.05$). Deprenil uygulamasının ardından ise genç ve yaşlı grupların katalaz aktivitelerinde bir değişiklik bulunamamıştır (Şekil 6). Karaciğer katalaz aktiviteleri ile deprenil verilmesinin önce ve sonrasında diğer parametrelerle arasında hiç bir korelasyona rastlanılmamıştır.

Genç ve yaşlı sıçanların böbrek MAO enzim aktivitelerinde kıyaslandığında anlamlı bir fark izlenmemiştir. Deprenil uygulanan genç grupta ise bu düzeylerde anlamlı bir düşüş izlenmektedir ($p<0.001$). Yaşlı grupta ise bu düşüş daha az anlamlı olmakla beraber yine de belirgindir ($p<0.05$) (Şekil 7).

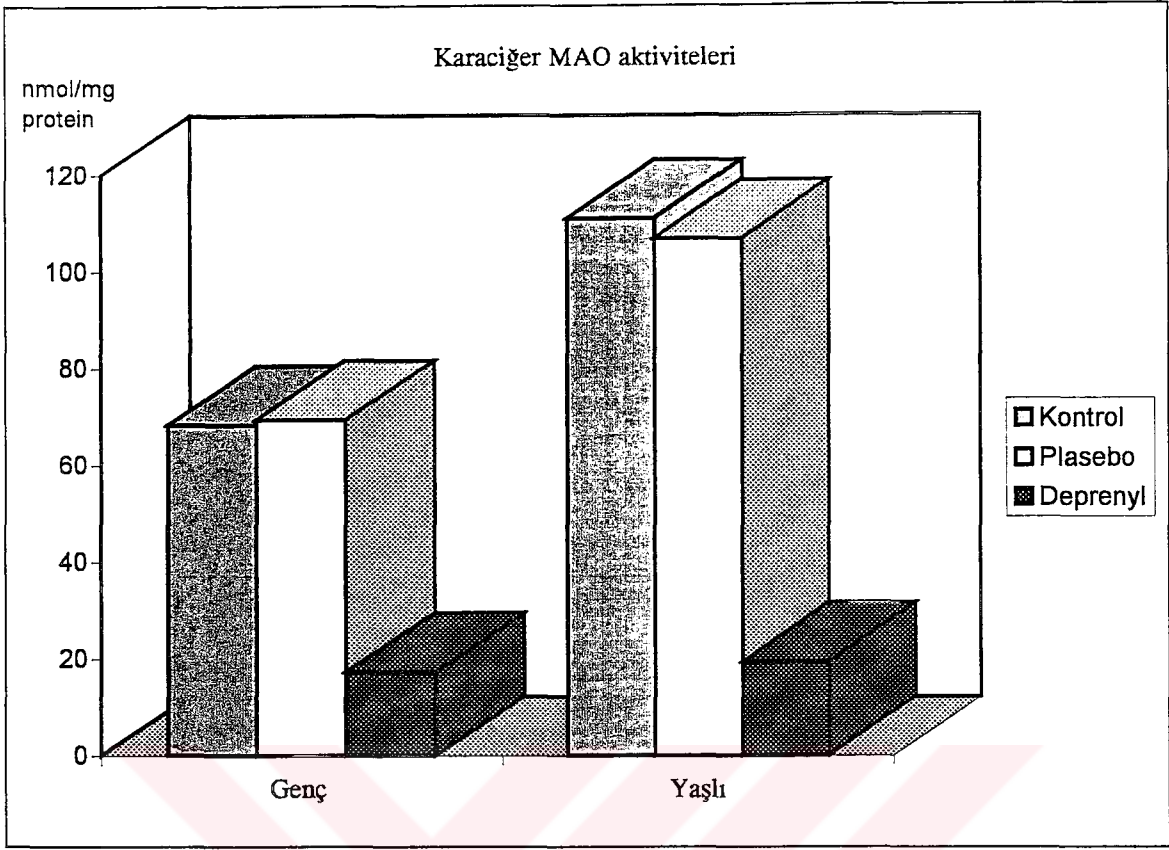
Genç ve yaşlı sıçanların böbrek MDA düzeyleri açısından karşılaştırıldığında yaşlı grupta anlamlı bir yükseklik görülmektedir ($p<0.001$). Deprenil uygulaması genç grupta MDA düzeyini etkilememiş, ancak yaşlı grupta bir düşüşe yol açmıştır. ($p<0.001$) (Şekil 8). Yaşlı böbrek MAO aktivitesi ve MDA düzeyi arasındaki korelasyon $r = 0.8732$ ($p < 0.05$)'dir. Deprenil uygulamasının ardından yaşlılarda azalan böbrek MAO aktiviteleri ile azalan böbrek MDA düzeyleri arasındaki korelasyon $r = 0.9813$ ($p<0.01$)'dir. Yine deprenil verilmesinden sonra gençlerde azalan böbrek MAO aktiviteleri ile azalan böbrek MDA düzeyleri arasındaki korelasyon $r = 0.9075$ ($p<0.05$) olarak bulunmuştur.

Diğer bir lipid peroksidasyon ürünü olan dien konjugatları ele alındığında yaşlı grubun böbrek dokusu düzeylerinde yine anlamlı bir yükseklik görülmektedir ($p<0.05$). Deprenil genç grupta ise bu düzeylerde anlamlı bir düşüşe ($p<0.01$) yaşlı grupta dahada belirgin bir düşüşe yol açmıştır ($p<0.001$) (Şekil 9). Yaşlı böbrek MAO aktiviteleri ile böbrek dienleri arasındaki korelasyon $r = 0.8804$ ($p < 0.05$)'dir. Deprenilin uygulamasının ardından azalan böbrek MAO aktivitesi ile azalan dien arasındaki korelasyon $r = 0.9400$ ($p<0.01$)'dir. Yine genç grupta deprenilin uygulamasının ardından böbrek azalan MAO aktivitesi ile azalan konjuge dien arasındaki korelasyon $r = 0.9528$ ($p<0.05$) olarak bulunmuştur.

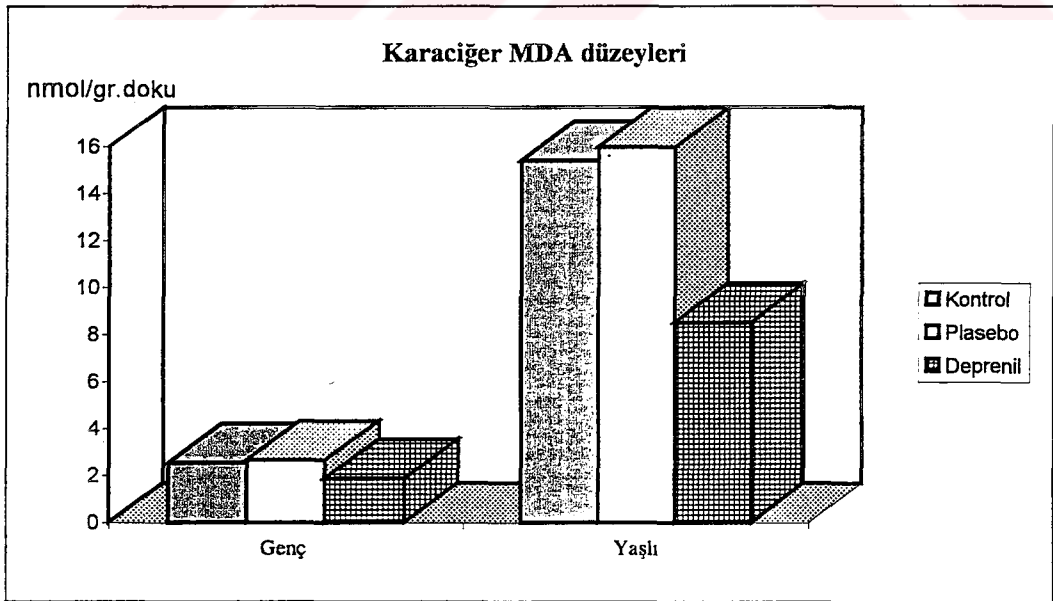
Böbrek SOD aktiviteleri değerlendirilecek olunursa yaşlı grubun SOD enzim aktivitelerinde genç gruba göre bir düşüş izlenmektedir ($p<0.05$). Deprenil uygulamasının ardından ise genç ve yaşlı grupların SOD aktivitelerinde anlamlı bir farklılık izlenmemiştir (Şekil.10). Yine deprenilin uygulanmadan önce ve sonra böbrek SOD aktiviteleri ile diğer parametreler arasında korelasyon tespit edilmemiştir.

Böbrek katalaz aktiviteleri açısından yaşlı kontrol grubunda genç gruba göre bir düşüş ($p<0.001$) varsa da deprenil ne genç ne de yaşlı gruplara katalaz aktivitesinde anlamlı değişimlere yol açmaktadır (Şekil.11).Deprenilin uygulanmasından önce ve sonra böbrek katalaz aktivitesi ile diğer parametreler arasında korelasyon bulunamamıştır.

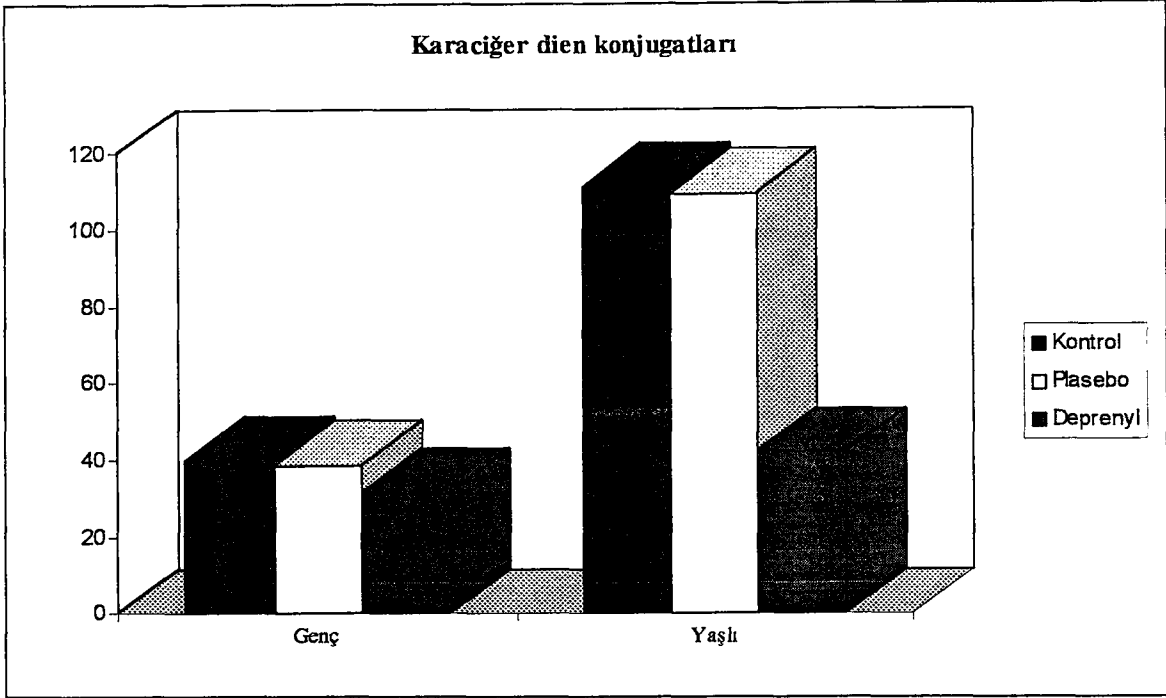




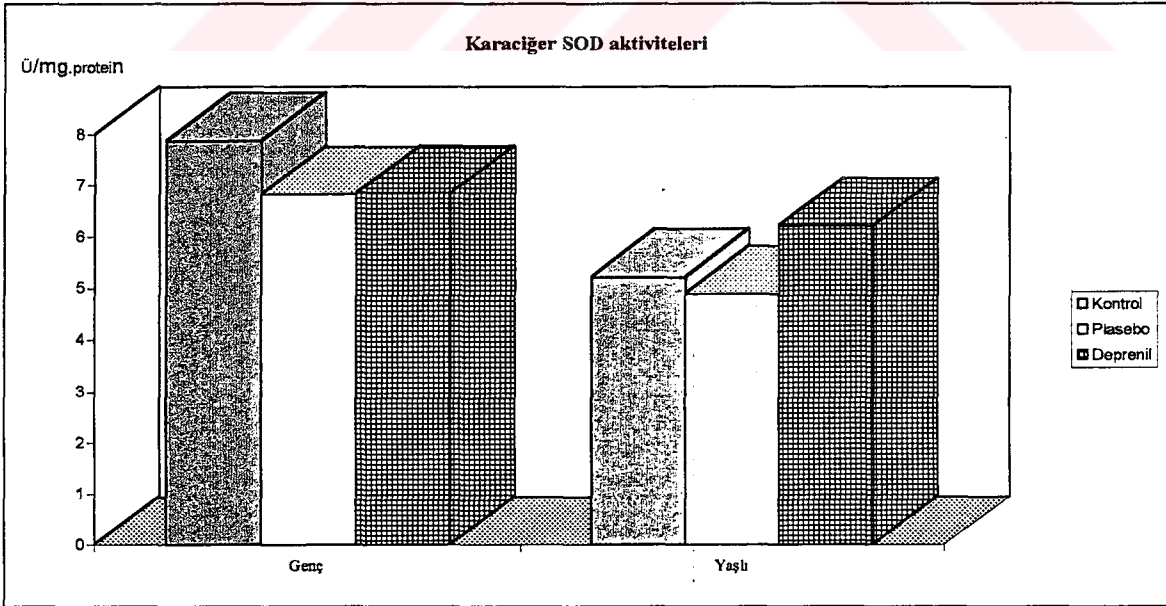
Şekil 2. Deprenilin genç ve yaşlı sıçanlarda karaciğer MAO aktivitesine etkisi.



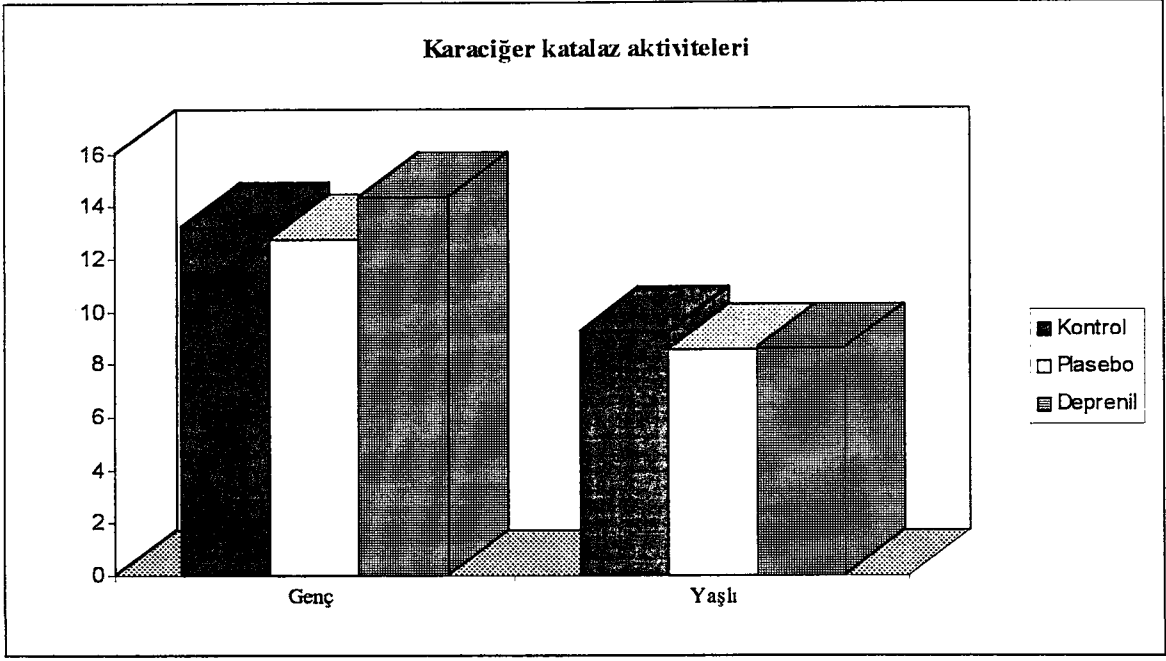
Şekil 3. Deprenilin genç ve yaşlı sıçanlarda karaciğer MDA düzeylerine etkisi



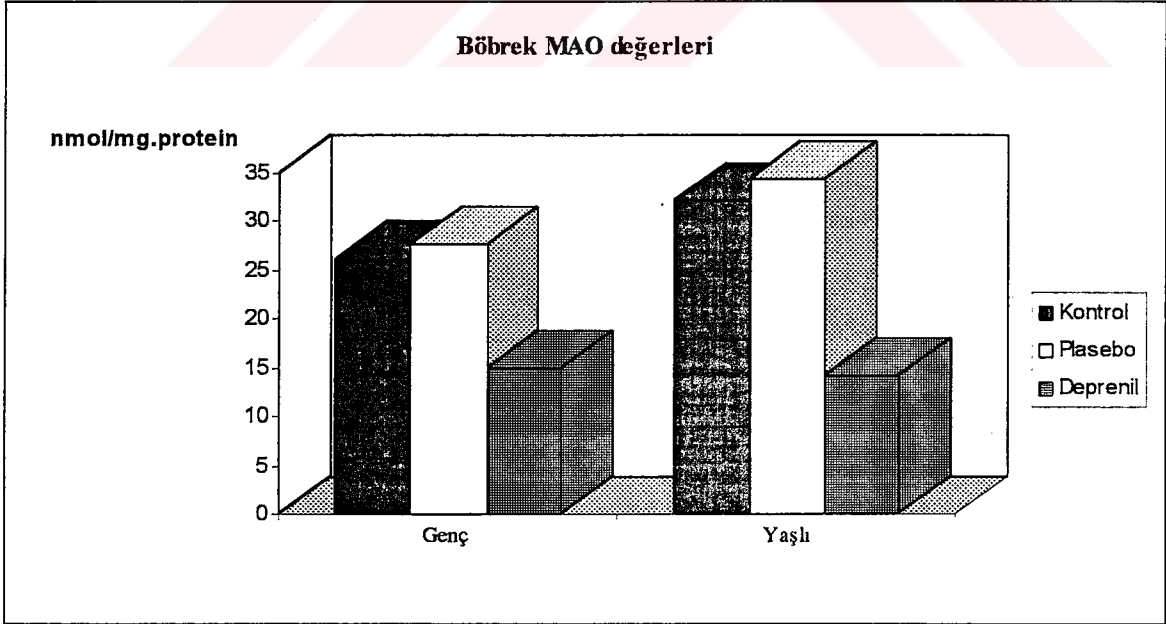
Şekil 4. Deprenilin genç ve yaşlı sıçanlarda karaciğer dien konjugatı düzeyine etkisi.



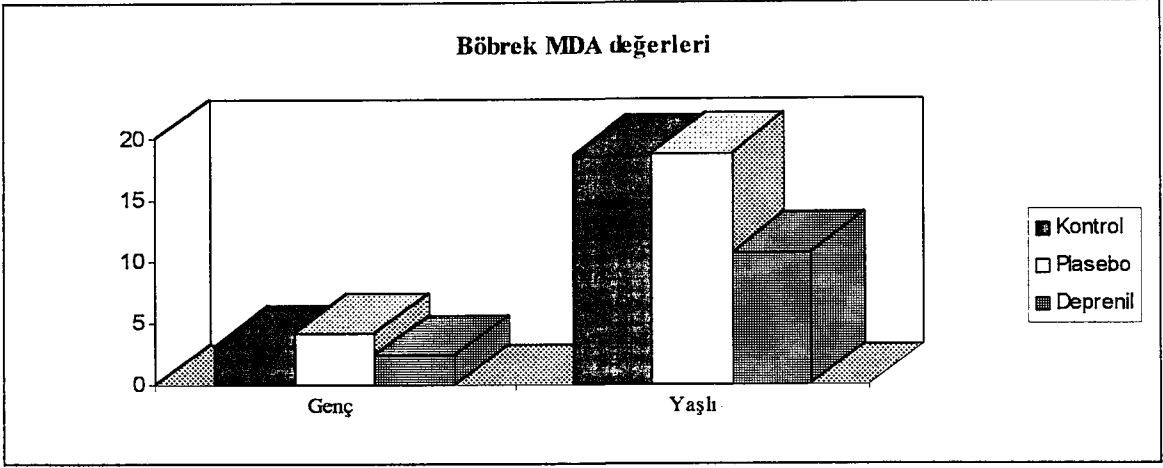
Şekil 5. Deprenilin genç ve yaşlı sıçanlarda karaciğer SOD aktivitesine etkisi.



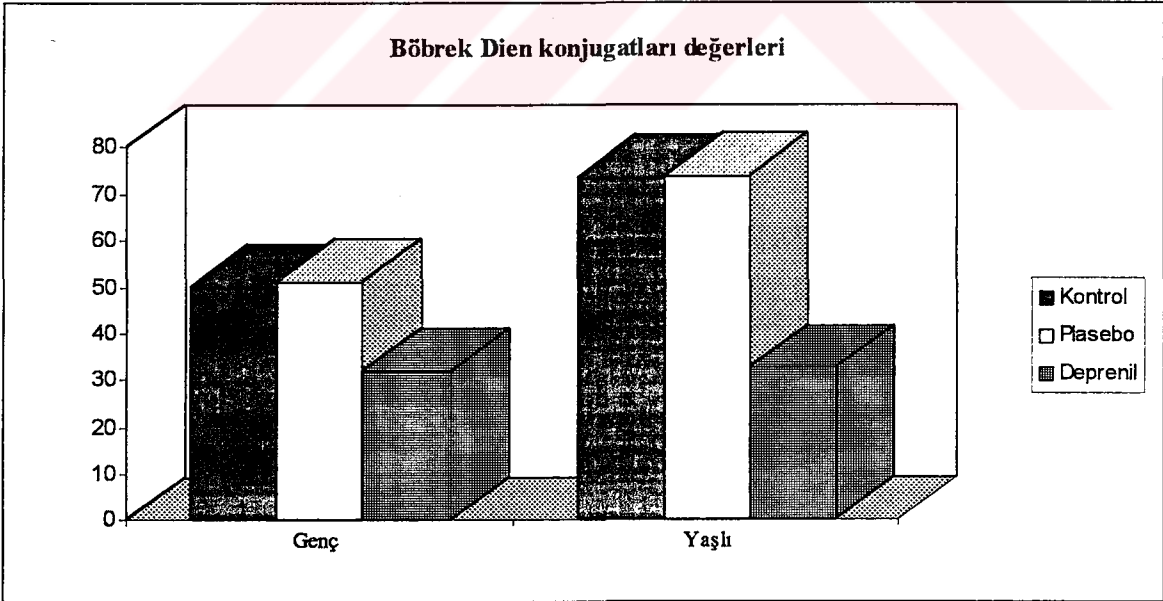
Şekil 6. Deprenilin genç ve yaşlı sıçanlarda karaciğer katalaz aktivitesine etkisi.



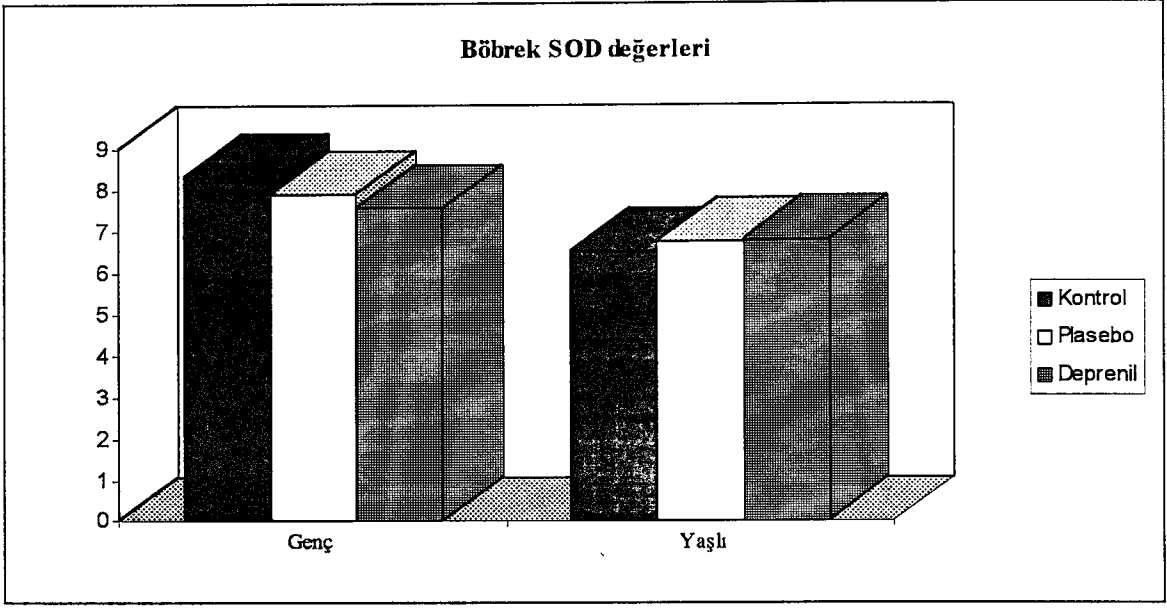
Şekil 7. Deprenilin genç ve yaşlı sıçanlarda böbrek MAO aktivitesine etkisi.



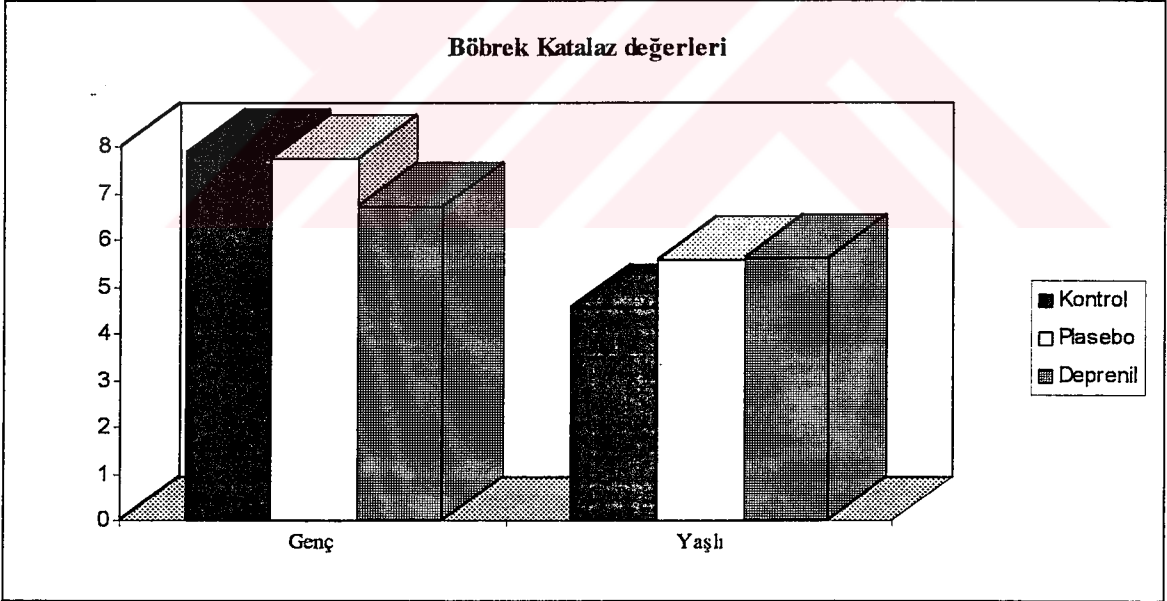
Şekil 8. Deprenilin genç ve yaşlı sıçanlarda böbrek MDA düzeyine etkisi.



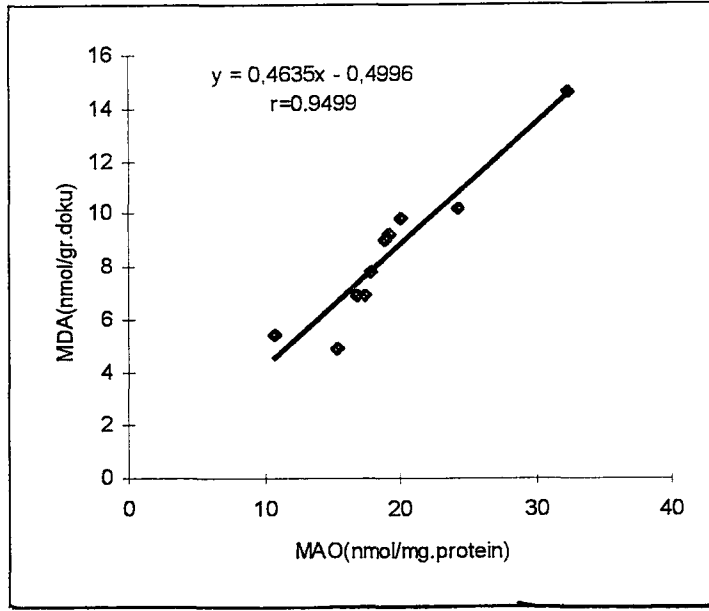
Şekil 9. Deprenilin genç ve yaşlı sıçanlarda böbrek dien konjugatı düzeylerine etkisi.



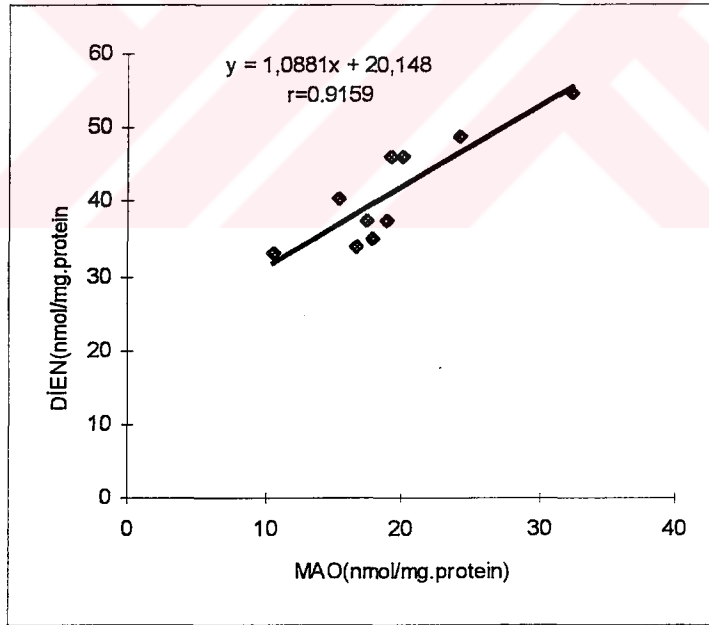
Şekil 10. Deprenilin genç ve yaşlı sıçanlarda böbrek SOD aktivitesine etkisi.



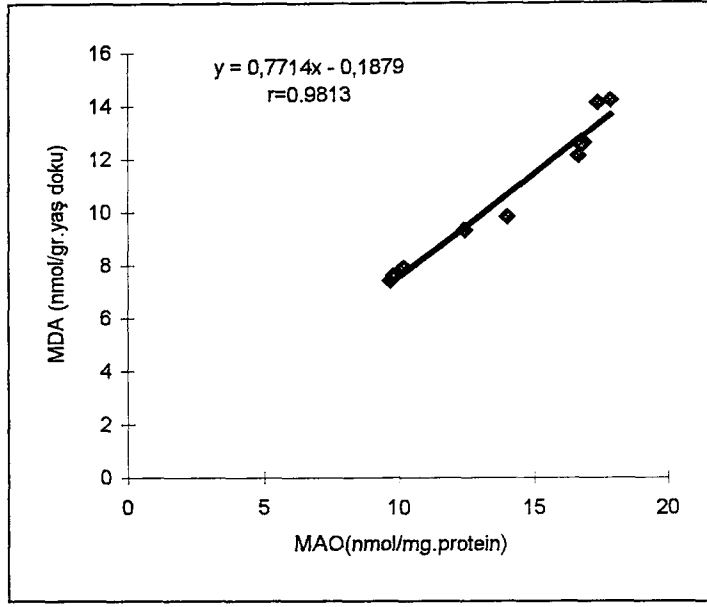
Şekil 11. Deprenilin genç ve yaşlı sıçanlarda böbrek katalaz aktivitesine etkisi



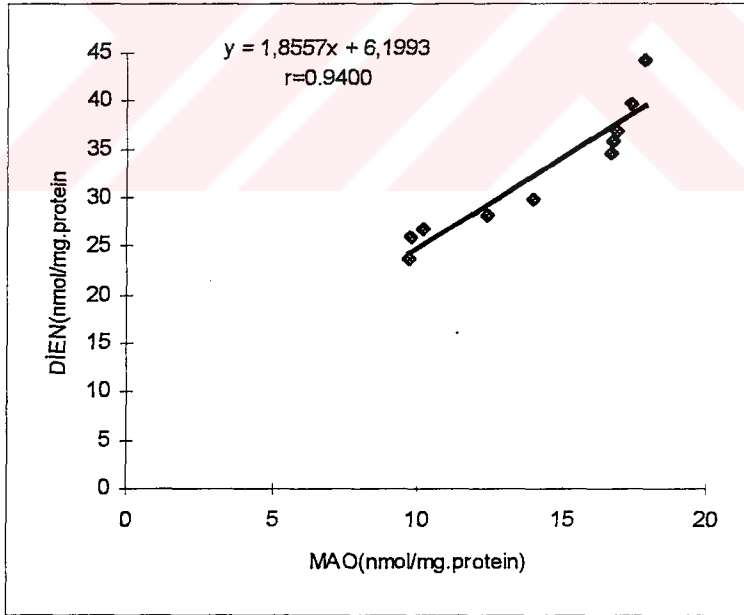
Şekil 12. Deprenil uygulamasının ardından yaşlı sıçanlarda karaciğer MAO ve MDA arasında izlenen korelasyon.



Şekil 13. Deprenil uygulamasının ardından yaşlı sıçanlarda karaciğer MAO ve dien konjugatı arasında izlenen korelasyon.



Şekil 14. Deprenil uygulamasının ardından yaşlı sıçanlarda böbrek MAO ve MDA arasında izlenen korelasyon.



Şekil 15. Deprenil uygulamasının ardından yaşlı sıçanlarda böbrek MAO ve dien konjugatı arasında izlenen korelasyon.

TARTIŞMA

Yaşlanma olgusu son yıllarda yoğun araştırmalara neden olmuş bir alan olarak ilgi çekmektedir. Yaşlanma olgusunu meydana getiren nedenlere ilişkin pek çok sav ileri sürülmüştür. Bunlar arasında, ilk defa 1986'da Harman'ın ortaya attığı serbest radikal reaksiyonlarının yaşlanma prosesinin nedeni olduğu yolundaki sav ile 1987'de Hayflick'in öne sürdüğü ve DNA'daki yaşlanma genlerinin yaşlanmadan sorumlu olduğunu bildirdiği sav en çok kabul görenlerdir (26,60).

Yaşlanma olgusu, her türün kendine özgü intrinsek bir yaşlanma sürecine sahip olduğu ve bu süreçte, gerek çevresel, gerekse hastalıklar gibi etmenlerin organizmalarda meydana getirdiği etkilere açık ve bunlarla karışık olarak karşımıza çıkan bir olgudur. İntrinsek yaşlanma süreci kalıtsal etkenlerin etkisi altındadır ve bugün türlerin sahip olduğu maksimum ömür uzunluğu potansiyeli de bu nedenle kalıtsal olarak belirlenmektedir. Dolayısıyla, insanda, intrinsek maksimum ömür uzunluğu potansiyeli" üzerinde bir artış veya uzama meydana getirebilmek söz konusu değildir. Buna karşılık yaşlanma prosesine karışan ekstrinsek faktörler üzerinde denetim olası görülmektedir (1,27).

Yaşlanma olgusu insan organizmasında fizyolojik olduğu kabul edilen birtakım değişikliklerle ortaya çıkmaktadır. Glukoz tolerans eğrisinin yetersizleşmesi, kadınlarda menapozdan sonra over fonksiyonlarında görülen kayıplar, erkeklerde de yaş ilerledikçe gözlenen sperm hücreleri sayısındaki azalmalar bu tip değişikliklerin örneğidir. Yaşlanma ile oluşan bağ dokusu değişikliklerine gelince, bunlar bağ dokusu dansitesindeki artış ve bağ dokusu içeriğinde azalma ile kendilerini gösterirler (1). Bu değişikliklerin sonucu deri esnekliğinde azalma ve artmış fibröz doku nedeni ile eklem katılığı oluşmasıdır. Bağ dokuda ayrıca kalsifikasyonlar meydana geldiği gözlenir. Sonuç aterosklerotik değişiklikler ve dejeneratif eklem hastalıklarının ortaya çıkmasıdır. Derinin tonus ve elastisitesindeki etkileşimler sonucu subkutan yağ dokusunda azalma meydana gelir ve bu da ısı izolasyonunda kayba yol açar (26,27,84).

Vital kapasitenin azalması, respiratuvar fonksiyonların yetersizleşmesi, damar düz kas hücrelerinde artan kollajen ve azalmış elastik doku sonucunda vasküler komplansta azalma, sistolik kan basıncında artış, renal konsantrasyon ve renal perfüzyonda azalma, nöral transmitterlerde azalma, reflekslerde ve iletim hızındaki yavaşlamaya, bunlara karşın dejeneratif hastalıklarda artışa bağlı olarak aktivite yavaşlaması izlenen diğer çarpıcı değişikliklerdir. Bütün bu değişimler yaşlanma fizyopatolojisini oluşturmaktadır, bu prosesteki bozuklukları engellemeye yönelik araştırmalar ve tedavi olanaklarının sunulması geriatri bilimini tıbbın en ilgi çekici alanlarından biri haline dönüştürmüştür (26,27,62,84).

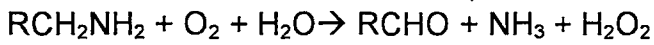
İlerleyen yaşla birlikte dejeneratif hastalıkların da arttığı bilinen bir gerçektir. Ateroskleroz, Parkinson hastalığı, bazı kanser türleri, katarakt ve romatoid artrit daha ziyade yaşlılarda gözlenen dejeneratif hastalıklardan bazılarıdır. Örneğin kardiyovasküler hastalıkların hiç değilse bir kısmının dejeneratif süreçlerin sonunda ortaya çıktığı ifade edilmektedir.

Serbest oksijen radikallerinin artışı, antioksidan enzimlerin inaktivasyonu, membran peroksidasyonu ve nükleik asid değişiklikleri gibi bir dizi olay sonuçta çeşitli hastalıklara ya da yaşlanma ile beraber görülen hücresele yıkıma neden olurlar (27,56). Serbest radikaller tarafından indüklenen hasarın yaşlanmada görülen dejeneratif etkilerin oluşumunda kısmen sorumlu olduğu öne sürülmüştür. Yaşla beraber artan serbest radikal hasarına karşı kendini savunmasını belirlemek için, bu hasara karşı organizmayı koruyan enzim sistemlerine yaşın etkisi araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda oksidan stresin yaşla beraber arttığı artık kanıtlanmış olmakla beraber antioksidan savunma ile ilgili olarak değişik bulgular vardır. Bazı araştırmalar yaşla beraber antioksidan sistemde oluşan kayıpların oksidan/antioksidan sistemlerdeki dengeyi bozduğunu öne sürseler de, bazı araştırmalarda yaşla beraber antioksidan sistemde bir aktivite azalmasına rastlanmamış hatta bazı enzimlerde yükselmeler bile saptanmıştır. Örneğin; sitozolik SOD aktivitesinin kalp ya da iskelet kasında yaşla beraber bir değişikliğe uğramadığı öne sürülmektedir. Ancak normalde kalp SOD aktivitesi devamlı eksersize bağımlı bir radikal üretiminin sonucu olarak kasa göre çok daha fazladır.

Diğer antioksidan enzimlerden olan katalaz isadece SOD tarafından üretilen H₂O₂'nin ortadan kaldırılmasında değil, aynı zamanda peroksizomal yağ asidi oksidasyon sisteminde de rol oynar. Bu nedenle artmış katalaz aktivitesi artan H₂O₂ üretimi ile başa çıkmanın yanı sıra artmış peroksizom içeriği ile de ilgili olabilir (75).

Yukarıda belirtilen görüşlerden L.L.Ji'nin yaptığı bir çalışmanın sonuçlarına göre de hepatik ve myokardial antioksidan enzimler ileri yaşlarda genel bir düşüş eğilimi göstermektedirler. Buna karşın karaciğerdeki glutatyonla bağlantılı enzimler ile kalpte mitokondriyel enzimlerin yaşla birlikte belirgin derecede artış gösterdiği kaydedilmektedir. Benzer bulguların egzersiz sırasında da görüldüğü ve hem yaşlanmanın, hem de egzersizin vücuda oksidatif bir stres yüklediği vurgulanmaktadır (1).

Serbest radikallerin ve antioksidan savunma sistemlerinin yaşlanma ile ilgisini özetledikten sonra yaşlanma ve oksidatif stres etiyopatogenezinde rol oynadığına inanılan MAO enzimi üzerinde durmakta yarar vardır. Yaşam süresinin ve kalitesinin artırılması ve yaşlılıktaki pek çok organik ve fizyolojik değişikliklerin önüne geçilebilmesi amacıyla, geriatri alanındaki çalışmalar özellikle MAO üzerine yoğunluk kazanmıştır. MAO selektif olarak biyojen aminlerin oksidasyonunu katalizleyen bir enzimdir:



Görüldüğü gibi H₂O₂ kateşolaminlerin normal bir metabolizma ürünüdür. MAO tüm vücutta bulunmakla beraber beynin yanı sıra karaciğer ve böbrek gibi dokularda yüksek konsantrasyonlarda bulunur (19,31,57). MAO tarafından H₂O₂ üretimi her iki substratın (amin ve oksijen) da konsantrasyonuna bağlıdır. Ortamın oksijen konsantrasyonu arttırıldıkça substrat oksidasyonu da artar (29,69,83).

Simonson ve ark., sıçan beyinde yaptıkları bir çalışmada MAO enziminin hidrojen peroksid üretiminde önemli bir kaynak olduğunu ve MAO inhibitörlerinin

reperfüzyonda izlenen artmış hidrojen peroksid üretimini elimine ettiklerini göstermişlerdir (65).

Bizim çalışmamızda ilk aşamada yaşla karaciğer ve böbrek MAO aktivitesinde bir değişim olup olmadığını incelemek amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda karaciğer ve böbrek dokusu MAO aktivitelerini belirlemek için Kraml'ın modifiye MAO tayin yönteminden yararlanılmıştır. Son yıllarda kullanılan HPLC gibi modern teknikler veya klasik spektrofotometrik yöntemlere karşın Kraml'ın yöntemi spektrofluorometrik bir yöntemdir. Bu yöntemin ilkesi substrat olarak kullanılan kinüraminin MAO ile oksidasyonu sonucu oluşan 4-hidroksi kinolin floresansının spektrofluorometrik ölçümüne dayalıdır. Yöntemi tercih etmemizdeki en büyük neden kullanılan kinüramin substratının kolay bulunan ekonomik bir substrat olması ve yöntemin tümüyle laboratuvar koşullarımıza uygun olmasından ötürüdür.

Spektrofluorometrik olarak karaciğerde belirlediğimiz MAO aktivitesinin yaşla birlikte belirgin bir artış gösterdiğini izledik. Bu bulgumuz yaşla beraber karaciğer MAO aktivitesinin arttığını belirleyen (39) araştırmacıların bulguları ile uyumludur. Bu araştırmacılar değişik sıçan dokularında organ spesifik ve değişik etkili MAO enzim aktivitesine neden olduğunu saptamışlardır. Biz yaşla böbrek MAO aktivitesinde anlamlı bir fark izlemedik, buna karşın bizden farklı olarak bu araştırmacılar böbrekte hafif düştüğünü söylemektedirler.

Çalışmamızın ikinci aşamasında yaşlanmanın oksidan stres ürünleri ile antioksidan savunma sistemlerine etkisini incelemek amaçlanmıştır. Biyolojik yapılar, özellikle de membranlar yüksek oranlarda doymamış yağ asitleri içermektedir. Doymamış yağ asitleri bir radikal başlatıcısının ya da oksijenin varlığında oksidasyona uğramaktadırlar. Bu olay lipid peroksidasyonu olarak tanımlanmakta olup biyolojik olarak zarar verici bir reaksiyondur.

Malonaldehid poliansatüre yağ asitlerinden türeyen peroksidlerin ortak bir dekompozisyon ürünüdür. Bu üç karbonlu dialdehid ansatüre yağ asidinin

peroksid içeren karbonla β - γ konumunda yanyana bulunması sonucu yağ asidi hidroperoksidlerinden türer. Bu koşullarda peroksid siklizasyona uğrayarak 5 üyeli bir peroksida dönüşür. Bu siklik peroksidlerin malonaldehid ve diğer volatil ürünlerin öncü maddeleri olduğu öne sürülmüştür (40,61). Karaciğer iskemisinin lipid peroksidasyonunun bir yan ürünü olan MDA konsantrasyonunda bir artış ile beraber olduğu gösterilmiştir. MDA konsantrasyonundaki artış serbest radikal aracılı membran lipid peroksidasyonunun sonuçta hepatosellüler negroza giden bir zincir tepkimesinin patojenetik mekanizmasında bir anahtar olduğunu göstermektedir. Yapılan bir çalışmada MDA düzeylerinin yaş ile paralel bir artış gösterdiği saptanmıştır (24).

Enochsson ve arkadaşları endotoksemik sıçanlarda yaptıkları çalışmalarda hepatic malondialdehid düzeylerini 0.3 $\mu\text{mol/g ww}$ ve dien düzeylerinin 1.2 $\mu\text{mol/g ww}$ olarak bulmuşlardır (13). Omar ve arkadaşlarının karaciğer hücre hasarını saptamak için yaptıkları çalışmalarda ise kontrol grubu karaciğer MDA değerleri 2.76 $\mu\text{mol/kg doku}$, iskemik doku karaciğer MDA değerleri 8.62 $\mu\text{mol/kg}$ olarak bulunmuştur (55). Biz çalışmamızda da karaciğer MDA değerlerinin genç sıçan grubunda 2.55 ± 0.9 nmol/mg protein, yaşlı sıçan grubunda 2.67 ± 1.25 nmol/mg protein olarak bulduk. Genç sıçanlara kıyasla MDA düzeylerinde yaşlı sıçanlarda saptadığımız anlamlı artış Yagi gibi araştırmacıların MDA düzeylerinde yaşla paralel belirlediği artışlar ile uyumludur (24). Yine çalışmamızda genç sıçan guruna (39.74 ± 14.32 nmol/mg.protein) kıyasla dien düzeylerinde yaşlı sıçanlarda (114.14 ± 18.24 nmol/mg.protein) belirlediğimiz anlamlı artış lipid peroksidasyonunun yaşlanma ile artışının temel bir göstergesidir.

Bir dizi hastalık toksik tablolar vede yaşlanma ile ilgili olarak lipid peroksidasyonun arttığı kanıtlanması, bu durumlarda etkin bir savunma olarak antioksidan uygulamalarını olası kılmaktadır. Örneğin SOD'un alloksan toksisitesine karşı koruyuculuğu bilinmektedir. Vitamin E eksikliği olan sıçanlarda sentetik antioksidanlarla beslenme sonucu semptomların gerilediği bulunmuştur (25). Buna karşılık, diyet yoluyla alınan antioksidanların memelilerde maksimum hayat süresi üzerinde çok az etkili olması, lipid peroksidasyonunun durdurulmasının yaşlanmayı

önlenemediğinin göstergesi olarak değerlendirilebilir. Ancak burada hastalıkların doku dejenerasyonuna yol açtığı ve bu hasarlı dokuların normal dokuya göre daha hızlı peroksidasyona uğradığı lipid peroksidasyonu sonucu oluşan sitotoksik son ürünlerin sağlam dokularıda hasara uğrattığı gerçeği göz ardı edilmemelidir. Bu noktada antioksidanların hastalığın primer patolojisini durduramasa da sekonder hasarı engellemede önemli olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Uygun dozlarda ve doğru olarak uygulanan antioksidan tedavinin bir çok dejeneratif hastalıkta yararlı etkiler sağlayabileceği kesindir. Hastalıklar yanı sıra dokuların normale göre daha hızlı peroksidasyona uğradıkları, yaşlanmada da antioksidanlar yaşlanma işlemini durduramaları da sonuçta oluşan doku hasarını azaltabilirler.

Antioksidan savunma sisteminin yararı göz önüne alındığında yaşlanma olayında savunma sistemlerinin durumunun belirlenmesi bu olayın aydınlatılmasına ışık tutacaktır. Carrillo gibi pek çok araştırmacı yaşlı sıçanlarda gençlere göre katalaz ve Mn-SOD aktiviteleri daha düşük bulmuşlardır (8). Bizim çalışmamızda da yaşlı sıçanlarda karaciğer SOD ve katalaz aktiviteleri sırasıyla 5.22 ± 1.40 , 9.24 ± 2.99 ' iken bu değerler genç gruba göre (7.88 ± 1.52 , 13.25 ± 4.5) daha düşük olarak belirlenmiştir. Aynı şekilde böbrek dokusunda da yaşlı gruba ait SOD ve katalaz değerleri sırasıyla 6.51 ± 1.68 , 4.44 ± 2.12 iken genç grupta bu değerler 8.31 ± 2.16 , 7.87 ± 2.07 şeklindedir. Bu açılarından bakıldığında ilerleyen yaşla beraber hem SOD, hem de katalaz aktivitesinde karaciğer ve böbrek dokularında bir antioksidan savunma yetersizliğinden bahsedilebilir.

Çalışmamızın son aşamasında bir MAO inhibitörü olan L-deprenilden yararlanılarak MAO enzim aktivitesindeki artışı düşürmeyi, ayrıca oksidan stress ürünlerinde bir azalma yanı sıra, antioksidan savunma sistemlerinde bir artış olup olamayacağını belirlemeyi amaçladık. L deprenil (selegilin) yapısal olarak feniletilamine benzerlikler gösteren ve özgün bir farmakolojik spektruma sahip olan bir ajandır. Tip B MAO'a karşı selektif ve etkin bir irreversibl inhibisyon gösterir (36). Avantajı MAO inhibitörlerinin gösterdiği tipik yan etkileri göstermeyen etkin bir antidepresan olarak kullanılabilmesidir (44).

Selegilin gastrointestinal bölgeden hızla absorblanır (0.39 saat \pm 0.15) ve ilk iki saatte plazma pik seviyesine ulaşılır. Dokularda dağılımı hızlıdır, kan beyin engelini aşar. Büyük oranda plazma proteinlerine bağlanır. (%95). Eliminasyonu oldukça yavaştır (eliminasyon yarılanma ömrü 39.47 \pm 23.33 saat). Büyük ölçüde idrarla, çok az miktarda feçesle atılır. Selegilin neredeyse tamamı L-metamfetamin ve N-dimetilselegiline metabolize olur. Atılımı ya bu metabolitleri ya da değişmemiş L-selegilin şeklindedir (36,72).

Bir MAO inhibitörü olan L-deprenil MAO enzimi ile reverbsibl, nonkovalan bir kompleks oluşturmaktadır. L-deprenilin bu kompleks içinde MAO ile tepkimeye girmesi enzim-bağlı FAD'ın redüksiyona uğramasına ve inhibitörün okside olmasına yol açar. L-deprenilin oksidasyona uğraması ile inhibitör bu kompleks içinde FAD ile N-5 pozisyonunda kovalan bağ oluşturur. Ortaya çıkan inhibisyon dializ, jel filtrasyonu ya da dilüsyon ile geri dönmez. In vivo olarak L-deprenilin etkilerinden organizmanın kurtulması yeni enzim sentezini zorunlu kılar (72).

Yukarıda belirttiğimiz amaç doğrultusunda özellikle deney gruplarımızda MAO inhibisyonunda etkili deprenil dozu yapılan ön çalışmalar sonucu 25 mg/kg olarak belirlenmiştir. Maksimum inhibisyonun hangi zaman diliminde meydana geldiğini belirtmek için, farklı zaman aralıklarında deprenil uygulaması ardından MAO aktivitesindeki inhibisyonu belirledik. Üçlü sıçan gruplarına deprenil uyguladıktan sonra, bu gruplar sırası ile bir hafta, bir gün ve uyguladıktan birbuçuk saat sonra dekapite edilerek MAO aktivitelerini belirledik. Tablo 8'den görüleceği üzere MAO inhibisyonundaki maksimum inhibisyon % 90 olarak belirlenmiştir. Bu ön çalışmalar sonucunda deprenil uygulamasından sonra akut MAO inhibisyonundaki süreç birbuçuk saat olduğuna göre, grupları uygulamadan birbuçuk saat sonra dekapite ettik.

25mg/kg. deprenil uygulanişından 1.5 saat sonra çalışmamızda özellikle yaşlı grupta MAO enziminde hem karaciğer hem de böbrek aktivite düşüşlerinin lipid peroksidasyon parametrelerindeki (MDA,dien konjugatları) düşüşleriyle korele olduğu gözlenmektedir (şekil.12,13,14,15). Bu bulgular bulgular ilacın MAO ve

kateşolamin metabolizmasında gösterdiği etkilerin lipid peroksidasyon ve oksidan strese de yansıdığını ortaya koymaktadır. Bu nedenle yaşlılıkta MAO inhibisyonuna yönelik adımlar dolayısıyla lipid peroksidasyonunda da olası bir inhibisyona yol açacaktır.

Deprenil uygulamasının MAO aktivitesini düşürmesi ve oksidan stres ürünlerini azaltmasına karşın bizim çalışmamızda bu uygulama antioksidan savunma sistemlerinde bir değişikliğe neden olmamıştır. Bunun olası nedeni çalışmamızda deney hayvanlarına sadece akut uygulamasına bağlanabilir. Akut uygulama MAO aktivitesinde belirli bir düşüşe neden olmakta ve bu etki lipid peroksidasyon ürünlerine yansımaktadır. Bu ürünler daha önce vurgulandığı gibi kateşolamin metabolizması sonucu devamlı bir şekilde yan ürün olarak oluşan antistabil bileşiklerdir. Dolayısıyla MAO aktivasyonundaki değişiklikler bu ürünlere yansıtacaktır.

Ancak akut ilaç uygulamasının antioksidan savunma enzimleri üzerinde benzer bir mekanizma ile etki edemeyeceği de bir yerde açıktır. Zira SOD ve katalaz gibi enzimlerin indüklenmeleri zaman alıcı olaylardır. Bu sistemde MAO inhibisyonu ile ilişkili ortaya çıkabilecek bir değişiklikler ancak kronik uygulamalar sonucu olasıdır. Bir MAO inhibitörü olan deprenilin akut uygulamasının yaşlanma olayındaki etkilerini araştırdığımız bu çalışmada sonuçlar yaşlanma etiyopatogenezinde etkili faktörlerden korunma yönünden umut verici gözükmektedir. Bunun nedeni oksidan stresin oluşumuna katkıda bulunan artmış kateşolamin metabolizmasının bir dereceye kadar MAO inhibitörü olan deprenil ile baskılanabileceği ve sonuçta yaşla beraber oksidan streste görülen artışın azaltılabileceği sonucunun ortaya çıkmasıdır. Her ne kadar akut ilaç uygulamasında antioksidan sistemlerde anlamlı bir değişiklik izlenmemişse de uzun dönemli ilaç uygulamasının ardından antioksidan sistemlerde de olumlu değişiklikler olabileceğini düşünmekteyiz. Sonuç olarak bir monoamin oksidaz inhibitörü olan deprenilin akut uygulanmasının ardından MAO ve lipid peroksidasyon düzeylerinde izlenen düşüşler yaşlanma fizyopatolojisinde etkili oldukları öne sürülen bu metabolizmaları kısıtlamak açısından ümit vericidir.

ÖZET

Yaşlanma hem yaşa bağlı olarak gelişen bir dizi değişikliklerden hem de hastalanma ve ölüm olasılığının giderek artan bir şekilde ilerlemesinden sorumlu olan değişikliklerin toplamıdır. Yaşlanma olayının açıklanmasında bir dizi teori öne sürülmüştür. Serbest radikaller tarafından meydana gelen hasarlama “yaşlanmanın serbest radikal teorisi” olarak tanımlanmış ve bu olayda rol oynayan en önemli faktörlerden biri olarak kabul edilmiştir. Doğada serbest radikaller, eşleşmemiş bir elektron taşıyan atom ya da atom grupları olarak bulunurlar. Kısa-ömürlü olan bu ürünler hücre membranlarını, DNA ve proteinleri hasara uğrattırır. Hücreleri serbest radikallerin etkilerinden koruyan enzimatik (SOD ve katalaz) ve nonenzimatik sistemler mevcuttur.

Çalışmanın amacı; genç ve yaşlı sıçan karaciğer ve böbrek dokularında lipid peroksidasyon ürünlerinin göstergelerini ve antioksidan enzim aktivitelerini belirleyerek fizyolojik yaşlanmada serbest radikallerin etkilerini araştırmaktır. Serbest radikal kaynağı olarak monoamin oksidaz (MAO) enzim düzeyleri de araştırılmıştır. Ardından bir MAO inhibitörü olan deprenil verilerek bu ajanın MAO inhibisyonunu sağlayarak oksidan stresin oluşum kaynaklarından birini engellemesi ve böylelikle olası olumlu etkilerinin araştırılması planlanmıştır.

Çalışma iki aşamadan oluşmuştur: İlkinde genç (2-3 aylık, n=10) ve yaşlı (16-18 aylık, n=10) sıçanlarda karaciğer ve böbrek dokularında MAO, MDA, dien konjugatları, SOD ve katalaz aktiviteleri tayin edilmiştir. İkinci aşamada ise deprenil uygulanarak (25 mg/kg i.p.) aynı dokularda benzer parametreler araştırılmıştır.

Sonuçta yaşlı sıçanların karaciğer ve böbrek dokularında MAO aktivitesinde ve lipid peroksidasyon göstergelerinde anlamlı yükselmeler saptanmış, SOD ve katalaz düzeylerinde ise hafif bir düşüş izlenmiştir. MAO inhibitörü olan deprenilin uygulanımının ardından MAO aktivitesinde, MDA ve dien konjugatları düzeylerinde anlamlı düşüşler saptanmıştır. Bu bulgular fizyolojik yaşlanmada

artmış MAO aktivitesinin ve lipid peroksidasyonunun rol oynadığını göstermektedir. Bu aktivitenin inhibisyonunun yaşlı dokularda izlenen artmış lipid peroksidasyonunu ve oksidan stresi azaltarak yaşlanma olayının kontrolünde etkili olabileceği sonucuna varılmıştır.



SUMMARY

Aging is the accumulation of changes responsible for both the sequential alterations that accompany advancing age and the associated progressive increases in the chance of disease and death.

Many theories have been advanced to account for the aging process. Damage by free radical reactions has been considered as “free radical theory of aging” and been accepted as one of the most important theories in this process. Free radicals exist in nature as an atom or groups of atoms that carry an unpaired electron. These products are short-lived, but they alter and ultimately damage cell membranes, DNA and proteins. There are several mechanisms that protect the cell from free radical damage such as enzymatic (SOD and Catalase) and nonenzymatic.

The aim of our study was to assess the role of free radical species in physiological aging by determining the lipid peroxidation products and antioxidant enzyme levels in young and old rat livers and kidneys. One of the sources of free radicals; Monoamine oxidase (MAO) enzyme levels were also determined. In the second phase, the same parameters were determined after administration of a MAO inhibitor; Deprenyl, to search if this agent has any beneficial effects in reducing oxidant stress via inhibition of MAO activity.

The study consisted of two phases: In the first; MAO, dien conjugates and MDA levels, SOD and catalase activities in the young (2-3 months old, n=10) and old (16-18 months old, n=10) rat livers and kidneys were studied. As the second phase, the same parameters were determined in young and old rat livers and kidneys after administration of the MAO inhibitor; Deprenyl (25 mg/kg i.p.).

The results showed that MAO activities and lipid peroxidation cause marked increases in old rat liver and kidneys while slight decreases can be observed in SOD and catalase activities in the same group. Administration of a MAO inhibitor

decreased the MDA and diene conjugate levels as well as inhibiting MAO activities. These results confirm the role of increased lipid peroxidation and MAO activity as one of the causative factors in physiological aging. Inhibition of this activity can reduce the increased lipid peroxidation and oxidant stress observed in old tissues and therefore may contribute to the control of aging process.



KAYNAKLAR

1- Abrass, B.Itamar. Biology of Aging, Principles of Internal Medicine. 12th ed. McGrow Hill Book Co. Inc. USA. 1991, 73-76

2- Aebi H. Catalase in vitro. Methods in Enzymology, 1984; 105: 121-126

3- Ames BN. Endogenous oxidative DNA damage, aging and cancer. Free Rad Res Commun 1989; 7:121-128

4- Bevanjones A.B.,Pare C.M.B., Nicholson W.S.,Price K,Stacey R.S.: Brain amine concentrations after MAO inhibitor administration. British Med.J. 1:17-19, 1972

5- Bueger J.A.,Yust Sç.D.: Microsomal lipid peroxidation method. Enzymol. 52:302-310, 1978.

6- Bulkley Gregory B., The role of oxygen free radicals in human disease processes, Surgery, 94 (3): 407-411

7- Buu N.T.,Angers M, Duhamine J,Kuchel O.: Modification of dopamine and norepinephrine metabolism in the rat brain by MAO inhibitors.J. Neural Transm. 70:39-50, 1987

8- Carrillo MC, Kanai S, Sato Y, Kitani K, Age-related changes in antioxidant enzyme activities are region and organ, as well as sex, selective in the rat, Mech Ageing Dev, 1992 Sep, 65 (2-3): 187-198

9- Chatterj C.J. and Watts N.B.: Endocrinology: Textbook of Clinical Chemistry Ed. By N.W.Tietz. 1136-1160, London, 1986.

- 10- Crapper D.R. and De Boni U.: Models for the biochemical study of dementia: Biochemistry of dementia, s: 53-70, Ed.by P.S. Roberts, John Wiley sons Ltd.,New York,1980.
- 11- Cutler Richard G., Antioxidants and Aging. Am J Clin Nutr 1992; 53:373S-379S
- 12- D'Armiento F.P., Di Gregorio F., Ciafre S.A., Posca T., Liguori A., Napoli C., Colasanti P., Cali A., Vecchione R., Histological findings and evidence of lipid conjugated dienes and malonyldialdehyde in human fetal aortas. Acta Pediatr 82:823-8, 1993
- 13- Enochsson L.B., Schoenberg M, Ware J, Measurements of hepatic malondialdehyde and conjugated diene concentrations in 24-hour endotoxemic rats, Liver, 1992: 12: 17-21
- 14- Fanchamps A:Age related mental decline and dementias.Sandoz,1991
- 15- Freeman Bruce, Crapo James, Biology of Disease; Free Radicals and Tissue Injury. Laboratory Investigation, 1982, 47 (5):412-426
- 16- Gafni A. Altered protein metabolism in aging. Annu Rev Gerontol Geriatr 1990;10: 117-131
- 17- Ganong W.F.: Neuroendocrinology: Basic and Clinical Endocrinology. Ed. F.S. Greenspan 66-78,Appleton and Lange, California, 1991
- 18- Gerlach M., Riederer P., Youdim M., Thr molecular pharmacology of L-Deprenyl. European Journal of Pharmacology, 226,97-108, 1992.
- 19- Glover Vivette, Sandler Merton, Clinical Chemistry of Monoamine Oxidase, Cell Biochemistry and Function, 1986, 4:89-97.
- 20- Goldfien A.:Adrenal Medulla: Basic and Clinical Endocrinology Ed.F.S.Greenspan, s:382- 385, Appleton Lange, California, 1991.

- 21- Gottfries C.G.: Amine metabolism in normal ageing and in dementia disorders: Biochemistry of dementia 213-234, Ed.P.J.Roberts, John Wiley sons Ltd., Newyork, 1980.
- 22- Gottfries C.G.: Dementia classification and aspects of treatment. Psychopharmacology, current trends, Psychopharmacol series: 5,Ed.Daniel Casey, 187-195,1988.
- 23- Grisham MB, Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine. 1992
- 24- Hagihara M, Nishigaki I, Maseki M, Yagi K. Age dependent changes in lipid peroxide levels in the lipoprotein fractions of human serum. J Gerontol 39:269-272, 1984
- 25- Halliwell B., Gutteridge John M., Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy, The Lancet, June 23,1984, 1396-97
- 26- Harman D., Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol 1956; 11: 298-300
- 27- Harman Denham, Free Radical Involvement in Aging, Drugs & Aging, 3(1): 60-80, 1993).
- 28- Hayakawa M., Sugiyama S, Hattori K., Takasawa M., Takayuki Ozawa. Age-associated damage in mitochondrial DNA in human hearts. Molecular and Cellular Biochemistry, 119:95-103, 1993.
- 29- Jing Zhang, Claude A. Piantadosi, Prevention of hydrogen peroxide generation by monoamine oxidase protects against CNS O₂ toxicity, Am Physiol Soc, 1057-1061, 1991
- 30- Jones Bevan A.B.,Lare CMB,Nicholson W.S., Price K, Stacey RS: Brain amine concentrations after MAO inhibitor administration. British Med. J. 1:17-19, 1972.

- 31- Kalaria R.N., Mitchell M.J., Harik S.I.: Monoaminoxidases of the human brain and liver. *Brain* 11(6):1441-54,1988.
- 32- Kayaalp Oğuz: Santral sinir sistemi Farmakolojisi: Rasyonel tedavi yönünden Tıbbi Farmokoloji, 2. cilt , dördüncü baskı , Ankara ,1990.
- 33- Kilkwood Thomas B.:Comparative life spans of species:Why do species have the life spansthey do? *Am.J.Clin.Nutr*,1992:55.1191s-5s.
- 34- Klug D., Rabani J., A Direct Demonstration of the Catalytic Action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. *J Biol Chem* 247:4839-4842, 1972.
- 35- Knight JA, Smith SE, Kinder VE, Anstall HB. Reference intervals for plasma lipoperoxides: Age, sex, and specimen related variations. *Clin Chem* 33:2289-2291, 1987.
- 36- Knoll J, The pharmacological basis of the beneficial effects of (-) deprenyl (selegiline) in Parkinson's and Alzheimer's diseases, *J Neural Transm Suppl*, 1993, 40P:69-91
- 37- Kraml M., A rapid fluorometric determination of MAO. *Biochem Pharmacol*, 14: 1684-6, 1965
- 38- Kropin ij. MAO and catecholamine metabolism. *J Neural Transm*, 41:57-67, 1994.
- 39- Lai J.C.K, Leung T.K.C., Lim L., Monoamine Oxidase Activities in Liver, Heart, Spleen and Kidney of the Rat. *Experimental Gerontology*, Vol. 17, pp. 219-225, 1982-
- 40- Lepage G., Munoz G., Champagne J., Roy C.C. Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 197, 277-283, 1991.
- 41- Lowry OH, Roserough NJ, Farr AL. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-75, 1951

- 42- Lück H. Catalase. "Methods of Enzymatic Analysis" den. Ed: H.U. Bergmeyer, 2. Baskı, Verlag Chemie GmbH, USA, 1965: 885-94
- 43-Maestro Rolando F. Free radicals,antioxidants and human disease: Where are we now? J.Lab.Cli.Med.1992,119/6.
- 44- Mann JJ, Aarons SF, Wilner PJ, Keilp JG, Sweeney JA. A controlled study of the antidepressant efficacy and side effects of (-)- deprenyl: A selective monoamine oxidase inhibitor. Arch Gen Psychiatry, 1989 Jan. 46 (1): 45-50
- 45- McCord JM, Fridovich I, Superoxide dismutase. An Enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). J Biol Chem 1969; 244: 6049-6055.
- 46- Menteş G, Ersöz B.Harper'in Biyokimyası. Barış Kitabevi,1993.
- 47- Miquel J, Quintanilla AT, Weber H, eds. Free radical induced lipid peroxidation and aging. Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine, Vol 1. CRC Press 1980;pp 187-197
- 48- Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J Biol Chem, 1972; 247 (10): 3170-5
- 49- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, Harper's Biochemistry, 22nd edition, 1991, Lübnan
- 50- NATO / ASI Kurs notları:"Modulation of cellular responses in toxicity" 1994, İtalya.
- 51- Neff Norton H. Hsiu-Ying T. Yang, Fuentes Jose A.: The use of selective MAO inhibitor drugs to modify amine metabolism in Brain. In: neuropsychopharmacology of monoamines and their regulatory enzymes.s:49-57. by E. Usdin, Raven Press, Newyork.

- 52- Nohl H, Hegner D, Summer KH. Responses of mitochondrial superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities to aging. *Mech Ageing Dev* 1979; 11: 145-151
- 53- Oberley LW, Buettner GR, Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Can Res*, 1979; 39:1141-9.
- 54- Oksidan stres ve hücre hasarı kurs notları, 1993, Ankara.
- 55- Omar R., Nomikos I., Piccorelli., Savino J., Agarwal N. Prevention of postischaemic lipid peroxidation and liver cell injury by iron chelation. Department of Pathology and Surgery 1989.30,510-514. New York Medical College, Vathalla, NY, USA
- 56- Özdemir G, Reaktif oksijen partikülleri, Roche Bilimsel Eserler Serisi, 1993, Eskişehir.
- 57- Porter NA. Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 105: 273-282, 1984.
- 58- Práda M.D., Kettler r., Cesura A.M., Richards J.G., Sawa M.J., Muggly-Maniglia D., Wyss P.C., Kyburz E., Imhog F.: From machohemide to ro 19-6327 and Ro 41-1049, the development of a new class of reversible, selective MAO-A and MAO-B inhibitors. *J. Neural Transm.* 29 (supple) : 279-92, 1990.
- 59- RG Pedersen JZ, Finazzi-Agro A, Protein radical enzymes. *FEBS Letters*, 1993, 325(1,2):53-58.
- 60- Ronald I., Shorr MD., Carnes M., Madison MD.: Theories of aging. *Wisconsin Medical Journal*. s:11-19. December, 1988.
- 61- Sevanian A, Hochstein P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Ann Rev Nutr* 5:365-390, 1985.
- 62- Shore P.A. and Cohn V.H.: Comparative effects of MAO inhibitors on MAO and Diamine oxidase. *Biochem Pharmacol.* 5:91-95, 1960.

- 63- Shorr R.I., Carnes M., Theories of aging, Wisconsin Medical Journal, Dec. 1988, 11-19.
- 64- Siesjo B.K. and Stig Rehncrona : Adverse factors affecting neuronal metabolism: Relevance to the Dementias: Biochemistry of dementia, s:91-102.Ed.P.S.Roberts, John Wiley and Sons Ltd,New York.1980.
- 65- Simonson SG, Zhang J, Canada AT Jr, Su YF, Benveniste H, Piantadosi CA, Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase during ischemia-reperfusion in the rat brain. J Cereb Blood Flow Metab 1993 Jan, 13 (1): 125-34
- 66- Slater TF Del maestro RF, An approach to free radicals in medicine and biology Acta Physiol Scand, 1980, suppl 492:153-68.
- 67- Slater T.F.: Free radical mechanisms in tissue injury. Biochem J, 1984; 222: 1-15.
- 68- Smith EL, Hill RL, Lehman IR, Lefkowitz RJ, Handler P, White A, Principles of Biochemistry, 7th edition, 1983, Mc-Graw Hill Inc., USA 382-3.
- 69- Sparks D.L.,Woeltz W.M.,Markesbery W.R.: Alterations in brain MAO activity in ageing, Alzheimer's disease and Pick's disease. Arch Neurol. 48(7): 718-21,1991.
- 70- Tekes Kornelia,Tothfalusi L.,Gaal J., Magyar K.: Effect of MAO inhibitors on the uptake and metabolism of Dopamine in rat and human brain . Pol.J. Pharmacol Pharm 40:635-658, 1958.
- 71- Tipton K.F.: Enzymology of MAO.Cell Biochem and Funct.,4:79-97, 1986.
- 72- Tipton K.F., Kinetic mechanism and enzyme function, Biochem Soc Trans, 8, 242,1980.
- 73- Tomlinson B.E.: The structural and quantitative aspects of the dementias: Biochemistry of dementia.s: 15-52,Ed.P.J.Roberts John Wiley and sons L.t.d. New York,1980.

- 74-Valenzuela A., The biological significance of malondialdehyde determination in the assesment of tissue oxidative stress. Life Sciences, Vol. 48, 301-309, 1991.
- 75-Vertechy M., Cooper M.B., Ghirardi O., Ramacci M.T., Antioxidant Enzyme activities in heart and skeletal muscle of rats of different ages. Exp Gerontol 1989. 24(3):211-218
- 76- Vladimirov YA, Olenev VI, Suslova TB, Cheremisina ZP. Lipid peroxidation in mitochondrial membrane. Adv Lipid Res 17: 173-249, 1980.
- 77- Ward PA, Till GO, Hatherill JR, Annesley TM, Kunkel RG. Systemic complement activation, lung injury and products of lipid peroxidation. J Clin Invest 76:517-527, 1985
- 78- Weisiger RA, Fridovich I. Superoxide dismutase, organelle specificity. J Biol Chem, 1973; 248(10); 3582-92
- 79- Wendel A., Enzymes acting against reactive oxygen, Adv Clin Enzymol, 1988, 6:161- 167
- 80- Weyler Walter, Hsu Yun-Peng P., Brakefield Xandra O.: Biochemistry and genetics of MAO. Pharmacol Ther. 47: 391-417, 1990.
- 81- Wilson David L., Aging Hypotheses, Aging Markers and the Concept of Biological Age, Exp Gerontology, 1988, 23:435-438.
- 82- Wilson J.D., Braunwald E., Isselbacher K.J., Petersdorf R.G., Martin J.B., Fauci A.S., Root R.K., Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill, Inc., 1991
- 83- White H.L.:MAO A and B as components of a membran complex.J Neurochem 38:1429-1436, 1982
- 84- Zoller D.P., The Physiology of Aging, American Family Physician, Vol. 36 (1): 112-116.

ÖZGEÇMİŞİM

22.11.1956 yılında İzmir'in Karaburun ilçesinde doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi İzmir'de yapıp 1976'da Eşrefpaşa Lisesi'nden mezun oldum.

Aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Fakültesi biyokimyagerlik bölümüne girdim ve 1982 yılında mezun oldum. 1983 yılında E.Ü.T.F. Merkez Laboratuvarı'nda göreve başladım. 1989 yılında da E.Ü.T.F Biyokimya Anabilim Dalı'na geçtim. 1991 yılında yüksek lisansımı aldım. Aynı yıl E.Ü.T.F Biyokimya Anabilim Dalı'nda doktora başladım. Evli ve iki çocuk babasıyım.

