

49732

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YAŞLANMADA MONOAMİN OKSİDAZ
İNİHİTÖRLERİNİN SIÇAN KALP DOKUSUNDA
OKSİDAN STRES VE ANTİOKSİDAN
SİSTEMLERE ETKİLERİ**

Biyokimya Programı

DOKTORA TEZİ

**Tıp Doktoru Ferhan Külahçioğlu Girgin
Danışman Öğretim Üyesi: Prof.Dr. Biltan Ersöz**

İzmir-1996

TEŞEKKÜR

Ege Üniversitesi Tıp Fakóltesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda sürdürdüğüm doktora eğitimim süresince verdikleri destek ve katkılardan ötürü öncelikle Prof.Dr. Biltan Ersöz'e, ayrıca Prof.Dr. Gülriz Menteş'e, Prof.Dr. Necla Nişli'ye, Prof.Dr. Oya Bayındır'a, Prof.Dr. Fatma Z. Kutay'a, Prof.Dr. Taner Onat'a, Doç.Dr. Dilek Özmen'e, Doç.Dr. Eser Yıldırım Sözmen'e, Doç.Dr. Tijen Tanyalçın'a, Doç.Dr. Sara Habife ve ayrıca doktora eğitimimi ve tez çalışmalarımı uyumlu bir beraberlik içinde yürüttüğümüz çalışma arkadaşım Mert Özgönül'e teşekkür ederim.

Doktora tezimin oluşmasının her aşamasında bilgi ve deneyimlerini büyük bir özveriyle ortaya koyan çok değerli hocam Prof.Dr. Biltan Ersöz'e içten şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİ.....	4
Radikal Kavramı ve Oksijen Radikalleri.....	4
Süperoksid Radikali	7
Hidroksil Radikali	10
Hidrojen Peroksid	11
Singlet Oksijen	12
Reaktif Oksijen Metabolitlerinin Kaynakları.....	14
Enzimatik Tepkimeler	14
Nonenzimatik Tepkimeler	16
Patolojik Prosesler	16
Dış Etkenler	17
Reaktif Oksijen Metabolitlerinin Biyolojik Aktiviteleri ve Hücre Hasarı ..	18
Oksijen Radikalleri ve Klinik Patolojik Durumlar.....	22
Biyolojik Sistemlerde Lipid Peroksidasyonu	24
Selüler Düzeyde Lipid Peroksidasyonunun Etkileri	29
Lipid Peroksidasyonu ve Ateroskleroz	30
In vivo Lipid Peroksidasyonunun Ölçümü	31
Antioksidan Savunma	35
Doğal Antioksidanlar	36
İlaçlar	39
Kardiyovasküler Sistem.....	41
Yaşlanma ve Kardiyovasküler Değişiklikler	41
Kalp Hastalıkları Ve İskemiye Bağlı Oksidan Stres	41

Kateşolamin Metabolizması ve Monoamin Oksidaz.....	45
Monoamin Oksidaz İnhibitörleri.....	52
Deprenil	53
Parjilin	55
ARAÇ-GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	56
Araç-Gereç	56
Kimyasal Maddeler	57
Çalışma Materyalleri	61
Çalışmada Kullanılan Yöntemler	64
İstatistiksel Analiz	68
BULGULAR.....	69
TARTIŞMA	80
ÖZET	96
SUMMARY.....	98
KAYNAKLAR.....	100

GİRİŞ ve AMAÇ

Yeryüzünde hayatın doğuşuna serbest radikallerin neden olduğuna inanılmakla birlikte, bu bileşikler aynı zamanda hemen hemen tüm canlılarda yaşam süresince oluşan hasarın ve ölümün temel nedeni olarak da kabul edilmektedirler. Serbest radikaller organik maddelerin havada çürümesi, plastiklerin işlenmesi, boyaların kuruması gibi endüstriyel işlemlerde olduğu gibi mitokondrilerde oksidatif fosforilasyon sürecinde, kateşolaminlerin otooksidasyonunda, araşidonik asitten tromboksan, prostaglandin ve lökotrienlerin oluşumunda ve yangısal yanıtta makrofaj ve granüositlerde yer alan respiratuvar patlama gibi in vivo ortamlarda da devamlı olarak üretilmektedirler (5, 9, 14, 22, 26, 70). Dış ortamda ya da organizmanın kendi metabolik işlemleri sırasında sürekli olarak oluşan bu radikallerin her çeşit dokuda hücreleri tahrip ettiği ve gen programlarını değiştirdiği gösterilmiştir. Serbest radikallerin etkileri hücre ve dokuda çeşitli düzeylerde yer almakla birlikte özellikle membranlara yönelik lipid peroksidasyonu ile DNA ve proteinlere yönelik oksidatif hasar dikkat çekicidir. Membranlarda yer alan çok doymamış yağ asitlerinin peroksidatif yıkılımı sonucu oluşan lipid peroksidleri; akışkanlığın azalması, negatif yüzey geriliminde artma, elektriksel stabilite kaybı ve nonspesifik permeabilite artması gibi lipid bilayer düzeyindeki değişmelerin yanı sıra membrana bağlı enzimlerin inaktivasyonu, tiol grup oksidasyonu ve iyonik permeabilite artması, oksidatif fosforilasyonun bozulması, karaciğer hidroksilasyon sisteminin hasarı ve lizozomal enzimlerin salınması gibi biyomembran ve organel düzeyinde de değişimlere yol açarlar. Bu nedenle günümüze değin serbest radikallerin etkisini araştırmaya yönelik çalışmalar temel olarak hücre hasarında kilit rol alan lipid peroksidasyonu göstergelerini biyolojik marker olarak kullanagelmışlerdir. Bunun sonucu olarak yaşlanma gibi fizyolojik proseslerde ve kanser, reperfüzyon hasarı, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar gibi bir dizi patolojik olayda serbest radikallerin ve lipid peroksidasyonunun rol oynayıcı faktörler olduğu ortaya konmuştur (1, 4, 9, 14, 15, 17, 19, 22, 26, 27, 33, 43, 50, 55).

Yaşlanma prosesinde kardiyak dokunun fonksiyonlarında da önemli değişiklikler meydana gelmekte ve bu olumsuz değişiklikler organizmanın yaşam kalitesini düşürebilmektedir. Yaşlanma prosesinde serbest radikallerin etkili olduğunu düşündüren hipotezler ve bu konuyu destekleyen çalışmalar göz önüne alındığında kardiyak dokuda gelişen bu olaylarda serbest radikallerin etkilerinin izlenebileceği açıktır.

Serbest radikallerin yıkıcı etkilerine karşı hücreler ve bir bütün olarak da organizma bir takım savunma mekanizmalarına sahiptir. Bu mekanizmalar serbest oksijen radikallerinin öncül maddelerini safdışı ederek ya da oluşan serbest radikalleri temizleyerek etki etmektedirler. Bunlar arasında süperoksid dismutaz ve katalaz gibi enzim yapısında olanlar ve α tokoferol, β karoten, askorbik asid gibi enzimatik olmayan antioksidan ajanlar vardır. Antioksidan enzimler organizmanın serbest radikallere karşı savunmasında yaşamsal öneme sahiptirler; bu açılarından süperoksid dismutaz ve katalaz önemli antioksidan etkiler gösterirler (70, 81, 86).

Yaşlanma patogeneğinde kateşolaminlerin etkin rolü olduğu konusundaki görüşler son yıllarda giderek ağırlık kazanmaktadır. Yaşlanma ile beraber kateşolamin metabolizmasının arttığı, buna karşılık hedef dokularda kateşolaminlere yanıtızlık olduğu bilinmektedir. Bu olay ise kateşolamin metabolizmasında yer alan enzim aktivitelerinin artışıyla açıklanmaktadır. Kateşolaminlerin metabolizmasında yer alan önemli enzimlerden biri olan monoamin oksidaz; noradrenalin, adrenalin ve dopamin gibi monoaminleri deamine eden bir oksidoredüktaz olup bu işlem sırasında hidrojen peroksid oluşumuna yol açmaktadır (6, 23, 81).

Son yıllarda biyolojik psikiyatride depresyon, Parkinson Hastalığı ve Alzheimer Hastalığı'nda önemli uygulama alanları bulan monoamin oksidaz inhibitörleri arasında önde gelen ikisi, enzim üzerinde irreversibl inhibisyon meydana getiren deprenil ve parjilindir. Bu inhibitörlerin serbest radikallere bağılı olarak gelişen hasarı ve toksisiteyi engelleme etkileri değişik dokularda araştırılmış olmakla

beraber, uygulamalarının ardından kalp dokusunda gelişen monoamin oksidaz metabolizması değişikliklerini, bu metabolizmanın yol açtığı lipid peroksidasyonunu ve yine aynı dokuda izlenen antioksidan enzim sistemi değişikliklerini bir arada inceleyen bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Bu verilerin ışığında; sunulan çalışmanın amacı, öncelikle genç ve yaşlı sıçan kalp dokularında monoamin oksidaz enzimi, malondialdehid ve dien konjugatları gibi lipid peroksidasyon göstergeleri ve SOD, katalaz gibi antioksidan enzimlerde yaşa bağımlı olarak gelişen olası değişiklikleri incelemek ve sonrasında da deprenil ve parjilin gibi iki değişik monoamin oksidaz inhibitörü kullanarak kateşolamin metabolizmasında oluşturulacak bu inhibisyonun yukarıdaki parametrelerdeki etkilerini bir arada değerlendirmektir.



GENEL BİLGİ

RADİKAL KAVRAMI ve OKSİJEN RADİKALLERİ

Atom yapısı bir çekirdek ve çevresinde bulunan değişik sayıda elektronlardan oluşmaktadır. Atomlarda elektronlar enerji düzeylerine göre belirli bir düzende yerleşir ve "orbital" adı verilen uzaysal bölgelerde çift olarak hareket ederler. Her bir orbitalde iki elektron bulunur. Aynı orbitalde iki elektron daima birbirine zıt yönde kendi ekseni etrafında dönmektedir. Moleküle bir elektron eklenmesi durumunda bu düzene uygun olarak önce her bir orbitale bir tane aynı yöne dönen elektron yerleşir, atom numarasına göre artan elektronlar tekrar aynı sıra ile ters yönde dönecek şekilde yerleşirler (57).

Moleküllerin çoğu çift elektronlu, az sayıdaki molekül ise tek elektronludur. Tek, yani eksik elektronlu olan bu moleküller, bulabilecekleri herhangi bir molekül ile etkileşime girerek bu molekülden elektron alır ya da ona bir elektron verirler. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine girip onların yapısını bozan bu moleküllere "serbest radikaller", "oksidan moleküller" ya da "reaktif oksijen partikülleri" denmektedir (57).

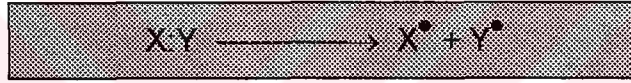
Serbest radikal en dış orbitalinde eşleşmemiş bir elektron içeren herhangi bir atom, atom grubu ya da moleküldür (örneğin nitroz oksid [NO] ya da nitrojen dioksit [NO₂]). Biradikal ise dış orbitallerinde eşleşmemiş iki elektron içerir (örneğin moleküler oksijen [O₂]). Radikal iyon ise pozitif (örneğin [H₃N⁺]) ya da negatif (örneğin [O₂^{-•}]) bir yük taşıyan serbest radikaldir (43).

Anaerobik canlılar da dahil olmak üzere her canlıda toksik etkili olan doğrudan moleküler oksijen değil, oksijenin tam olmayan indirgenmesi ile oluşturulan bu

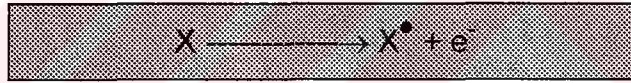
oksijen radikalleridir. Atomik ya da moleküler yapıda eşlenmemiş tek elektron içeren bu bileşikler reaktif özellik taşırlar. Serbest radikaller, negatif yüklü elektron sayısının nükleustaki pozitif yüklü proton sayısı ile eşit olmadığı moleküller oldukları için stabil değildirler ve elektron konfigürasyonlarını pozitif yükle dengelemeleri gerektiğinden çok reaktiftirler. Oksijen radikali serbest elektronunu eşleştirmek için başka bir molekülden elektron aldığında diğer molekülü anstabil hale getirir, zira o molekülün de elektronik düzenini sağlaması için komşu bir molekülden elektron alması gerekir. Bu nedenle serbest radikaller vücutta önemli moleküllere zarar veren bir seri tepkimeyi başlatabilirler (55, 57).

Serbest radikaller üç şekilde oluşabilir (9):

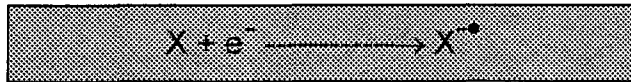
① Normal bir molekülün kovalan bağının homolitik yarılmaması sonucu eşleşmiş elektronlardan her birinin ayrı parçada kalması



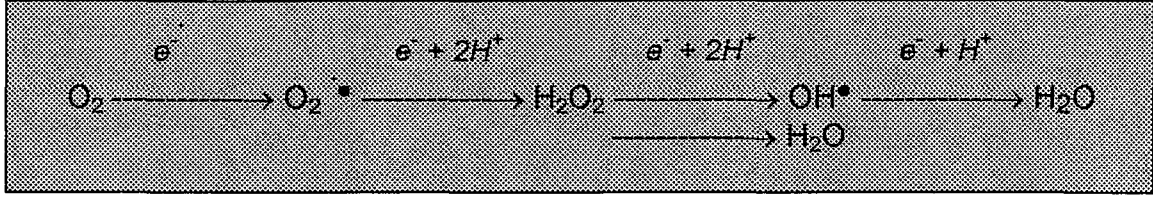
② Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı



③ Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi



Normal koşullar altında organizmada 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 miktarında moleküler oksijen univalan redüksiyona uğrar. Bu işlem sırasında moleküler oksijen elektronları sırasıyla alır ve böylelikle her bir elektron kazanımında bir reaktif ara ürün oluşur; süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali... (5, 55, 62, 68)



Elektron transport zincirinden kaynaklanan bu elektron kaçağının yanında peroksizomlarda lokalize olan flavin oksidaz gibi bir dizi enzim de süperoksit anyonu ya da hidrojen peroksit oluşturabilir. Hayvan hücrelerinde süperoksit bir başka kaynağı da askorbik asit, tioller, adrenalin ve flavin koenzimleri gibi moleküllerin otooksidasyonudur. Bu otooksidasyon tepkimeleri geçiş metal iyonlarının ortama eklenmesi ile anlamlı şekilde artırılabilir (9).

Biyolojik sistemler için en reaktif ve toksik maddeler olan bu radikaller, oksijenin toksik etkisinin gerçek nedenini oluştururlar. Serbest radikal eşleşmemiş tek elektronunu bir başka moleküle vererek onu redükte edebilir ya da bir başka molekülden elektron alıp onu okside ederek yapısında yeni bir elektron çifti oluşturabilir. İki serbest radikalın tepkimesi sonucunda radikal özellik ortadan kalkar; ancak bir radikal, radikal olmayan bir moleküle tepkimeye girerse başka bir radikal oluşur. Radikal özellik taşıyan moleküllerin bu karakteristikleri radikallerin zincir tepkimelerde rol oynamasına neden olur (43). Her iki olayın sonunda nonradikal yapı radikal şekline dönüşür. Bu özellikleri ile reaktif oksijen partikülleri iki ana başlık altında incelenmektedir (Tablo 1) (55, 57).

Normal koşullarda hücre içi savunma sistemleri tarafından hızla temizlenen ve etkisiz hale getirilen bu radikallerin varlığı elektron spin rezonans spektroskopisinin gelişimi ile ortaya konmuştur (51).

1) Radikaller

Süperoksit radikalı	(O_2^{\bullet})
Hidroksit radikalı	(OH^{\bullet})
Peroksit radikalı	(LOO^{\bullet})
Alkoksit radikalı	(LO^{\bullet})
Semikinon radikalı	(HQ^{\bullet})

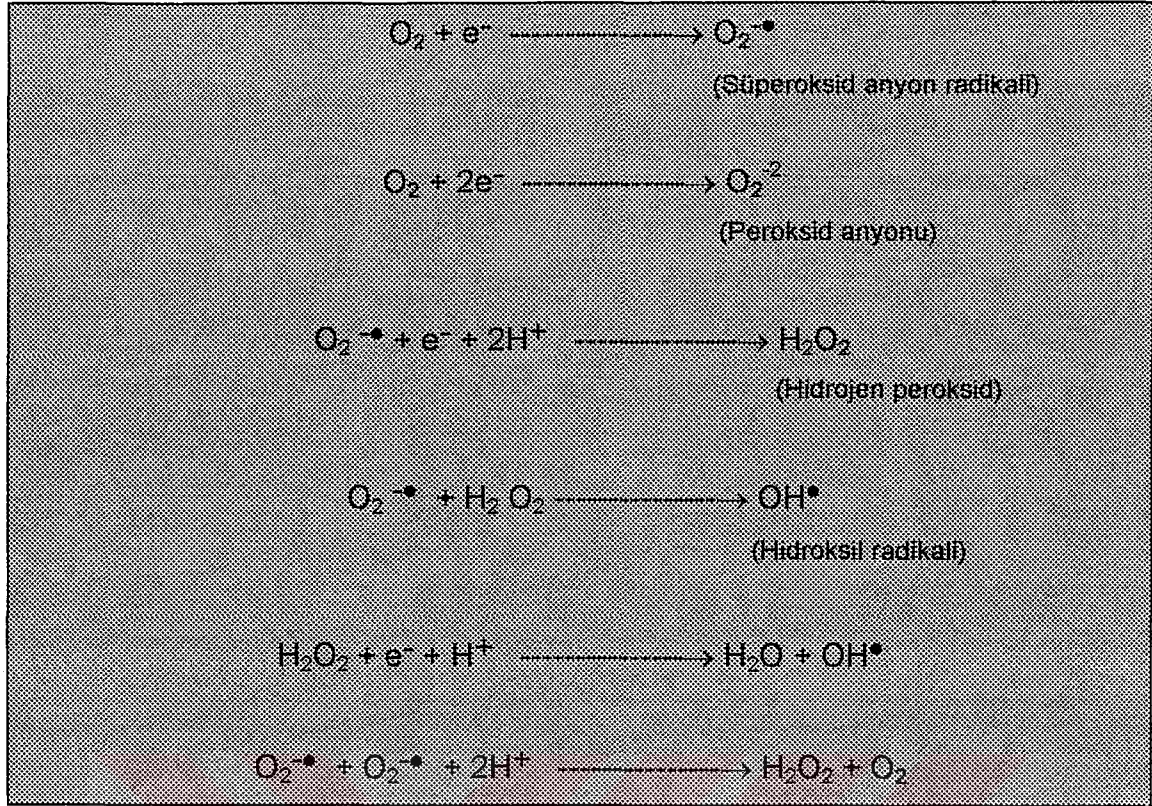
2) Non radikaller

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

Tablo 1. Reaktif Oksijen Partikülleri

SÜPEROKSİD RADİKALİ (O_2^{\bullet})

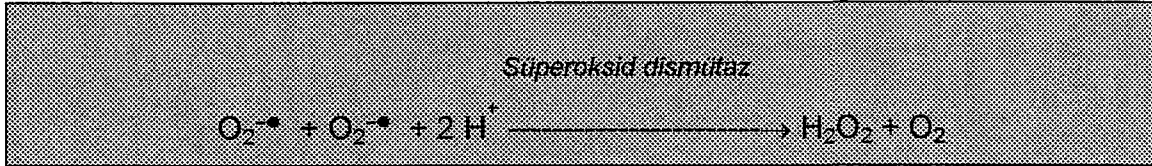
Moleküler oksijen dış orbitalinde paylaşılmamış iki elektron içermektedir. Bu dış orbitallerden her biri birer elektron daha kabul edebilmektedir. Bu orbitallerin tek elektron alması ile süperoksit radikalı (O_2^{\bullet} , süperoksit anyonu), iki elektron alması ile de peroksit anyonu (O_2^{-2}) oluşmaktadır. Peroksit anyonu ortamdaki iki proton alarak hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturabilir; süperoksit anyon radikalı ise aldığı elektronu başka bir elektron alıcısına vererek tekrar oksijene oksidlenebilir. Bunların yanı sıra iki süperoksit anyon radikalı birbiri ile etkileşerek biri oksidlenirken diğeri indirgenmekte, böylece H_2O_2 ve O_2 meydana gelebilmektedir.



Diğer radikallerle kıyaslandığında süperoksid radikalın reaktivitesi çok azdır. Süperoksid radikali, oluşumuna neden olduğu diğer radikallerle birlikte organizmada genel bir oksidleyici gibi davranmaktadır. $\text{O}_2^{\bullet -}$, sülfhidril gruplarının disülfidlere oksidasyonuna ve ferrik demirin ferröz formuna indirgenmesine neden olmaktadır. $\text{O}_2^{\bullet -}$ ferrik formun ferröz forma indirgenmesini sağlayarak ferritinden demirin direkt olarak ayrılmasını sağlayabilir. Ferro iyonu (Fe^{+2}) bir elektronunu lipid peroksidasyonunun yan ürünlerine vererek ek serbest radikal oluşumlarına da neden olabilir. Benzer şekilde ADP-Fe^{+2} gibi Fe'in düşük molekül ağırlığa sahip şelatları oksijen ile reaksiyona girerek poliansatüre yağ asidlerinde direkt olarak lipid peroksidasyonunu başlatacak aktif oksijen türlerini de oluştururlar (56). Süperoksid ayrıca diğer metallerle elektron vererek ya da elektron alarak organizmada fonksiyonel metallerin oksidoredüksiyon düzeyini bozar. Sülfhidril gruplarının ve metal iyonlarının canlıdaki sayısız fonksiyonları hatırlandığında, süperoksid radikalının hücrede metabolik olayları ve oksidoredüksiyon potansiyelini değiştirerek sayısız etkilere neden olacağı açıktır.

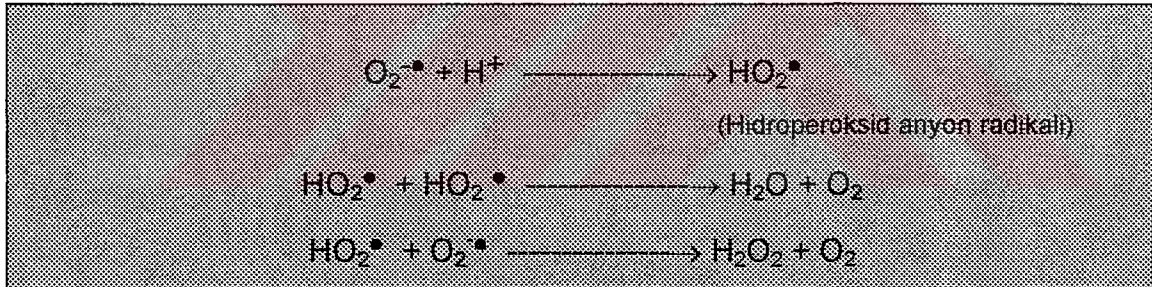
Normal solunum metabolizması sırasında devamlı olarak oluşan süperoksit anyon radikallerinin girebileceği tepkimeler şunlardır (33):

① Süperoksit anyon radikalleri süperoksit dismutaz ile dismutasyona uğratılarak hidrojen peroksit oluşumuna yol açabilirler.

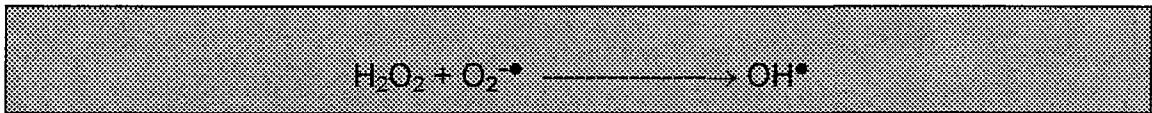


Nötral ya da bazik pH'larda iki süperoksit anyonu arasındaki elektrostatik itme nedeniyle spontan dismutasyon çok yavaş olarak yer alır. Asidik ortamda ise tepkime oldukça hızlıdır.

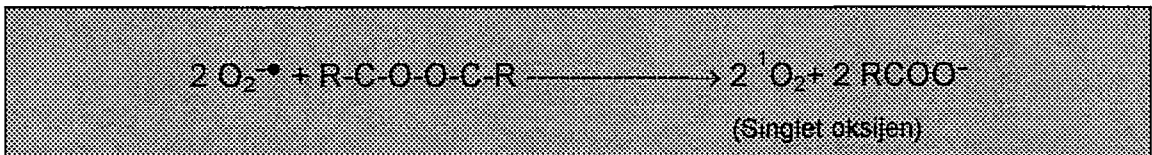
② Süperoksit anyon radikalleri ortamdan bir proton alarak perhidroksi radikali oluşturabilirler.



③ Süperoksit anyon radikalleri hidrojen peroksit ile tepkimeye girip hidroksil radikali oluşturabilirler.



④ Süperoksit anyon radikalleri diaçil peroksitlerde olduğu gibi diğer tepkimeler ile singlet oksijen yapımına da neden olabilirler.



HİDROKSİL RADİKALİ (OH•)

1934 yılında Haber ve Weiss, hidrojen peroksidin süperoksit anyonu ile indirgenmesi ile hidroksil radikali oluşabileceğini göstermişlerdir (9).



Ardından 1978 yılında redoks katalizör olarak fonksiyon gören bir metal, örneğin şelat yapmış demir (Demir-EDTA kompleksi) varlığında, Haber-Weiss tepkimesinin biyolojik sistemlerde de çalıştığı ve bu yolla önemli miktarlarda OH• üretildiği gösterilmiştir (9).

Metalo protein varlığında (FENTON TEPKİMESİ):



Metalo protein yokluğunda (HABER-WEISS TEPKİMESİ):



Oksijen radikalleri içinde en reaktif ve en toksik etkili olanı hidroksil radikaldır. Bu radikal membran yapısında yer alan ansatüre yağ asitlerini ve esterlerini peroksidasyona uğratarak lipid peroksidlerin ve endoperoksidlerin oluşumuna neden olmaktadır.

Hidroksil radikalinin katıldığı tepkimeler üç grupta toplanabilir (33):

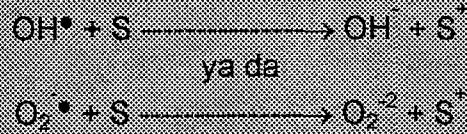
① Hidroksil radikali hidrojen çıkarma tepkimeleri ile bir radikal ve su açığa çıkarır.



② OH•, katma tepkimeler ile çift bağ içeren aromatik bileşiklere katılır, aromatik amino asitlerin hidroksilasyonuna ve toksik etkili aldehidlerin oluşumuna neden olur.



③ OH•, organik ve inorganik bileşiklerde elektron transfer tepkimelerine neden olur ki aynı etkiyi O₂⁻ radikali de göstermektedir.



HİDROJEN PEROKSİD (H₂O₂)

Hidrojen peroksit oksijen aracılı doku hasarında rol oynayan oksijen metabolitlerinden biridir. Süperoksit anyonlarının dismutasyonu sırasında, ksantin-ksantin oksidaz reaksiyonunda, mitokondriyal elektron transportunda ve nötrofillerde üretilir (33, 57).

Hidrojen peroksit üretim yolları aşağıda belirtilmiştir (33):

① Oksijenin iki elektron ile redüksiyonu sonucu hidrojen peroksit oluşur.

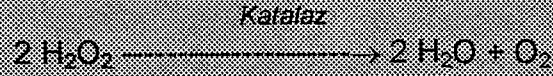


② İki süperoksit anyon radikalinin tepkimeye girmesi ile de hidrojen peroksit ve oksijen oluşur.



Hidrojen peroksit okside edici bir ajan olmasına rağmen spesifik olarak reaktif özellik taşımaz ve önemi reaktif geçiş elementlerinin varlığında hidroksil radikali için kaynak oluşturmasında yatar. Metal katalistlerin yokluğunda, hidrojen peroksit ortamdan uzaklaştırılır ve zararsızdır (9).

Normalde mitokondri ve peroksisomlarda belirli miktarlarda üretilen hidrojen peroksit etkin bir serbest radikal temizleyici sistemle ortamdan uzaklaştırılır.



SİNGLET OKSİJEN ($^1\text{O}_2$)

Enerji absorpsiyonu ile oksijenin paylaşılmamış dış elektronları spinlerini değiştirebilirler. Oksijenin bu şekilde uyarılmış durumunda, dış iki elektron ayrı ayrı ya da aynı orbitali işgal edebilir. Oksijenin uyarılmış bu iki formuna singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) denmektedir. Bu radikalin DNA hasarı oluşturduğu ve mutajenik etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir (14, 57).

In vivo olarak singlet oksijen üretimine neden olan başlıca tepkimeler şunlardır:

① Süperoksit anyon radikalinin kendiliğinden dismutasyonu sonucu singlet oksijen oluşabilir.



② Haber- Weiss tepkimesi sonucunda singlet oksijen oluşabilir.



③ Süperoksit radikallerinin diaçil peroksitlerle tepkimesi sonucunda da singlet oksijen oluşur.



④ Süperoksit anyon ve hidroksil anyon radikalinin etkileşmesi sonucunda singlet oksijen meydana gelir.



⑤ Fagositoz sırasında myeloperoksitazın hidrojen peroksitde etkisi ile de singlet oksijen oluşur.



Singlet oksijen serbest radikal olmamasına rağmen çok reaktif olması ve üretimi sırasında bazı radikal tepkimeleri oluşması nedeni ile aynı aileden sayılır (14).

Karotenler, bilirubin, histidin, metionin, 2,5-difenil furan, 1,4-diazobisikloalefan singlet oksijeni temizlerler. Bu bileşikler olay sırasında oksidlenmez ve tüketilmezler, singlet oksijenin enerjisini alırlar. Bir tepkimede singlet oksijen üretildiği, kemilüminesans ya da singlet oksijen bağımlı bir tepkimenin çalışmasıyla tespit edilmektedir. Örn; dienlerden endoperoksit, kolesterolden 5 α -hidroperoksit türevi oluşması gibi (33, 72, 73)....

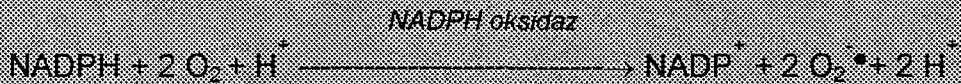
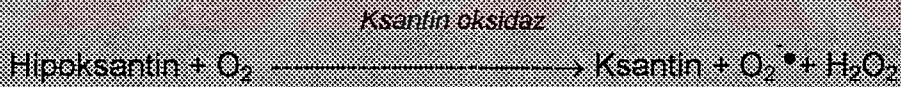
REAKTİF OKSİJEN METABOLİTLERİNİN KAYNAKLARI

Bir dizi biyolojik işlevin normal yürütülebilmesi için serbest radikallerin yan ürün olarak oluştuğu reaksiyonlar 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 (19).

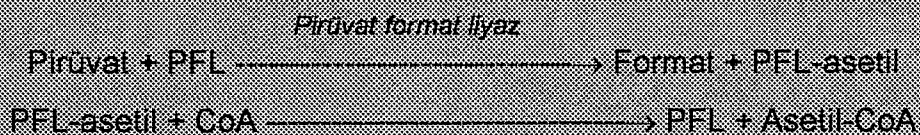
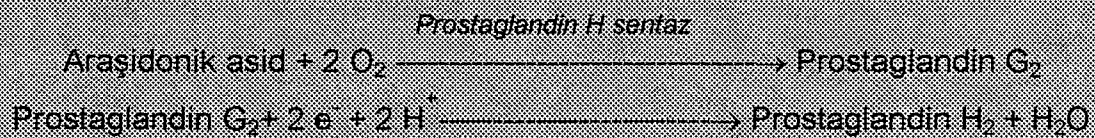
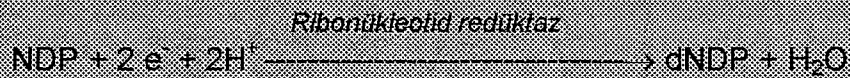
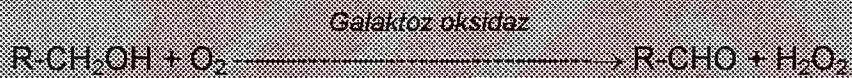
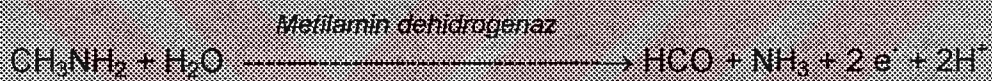
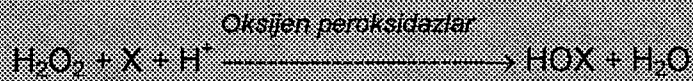
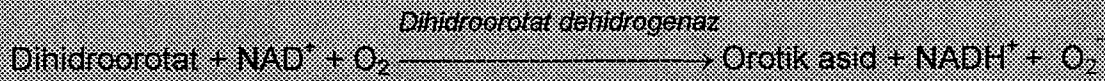
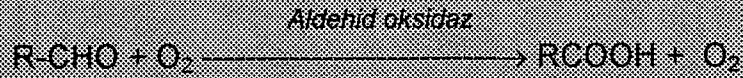
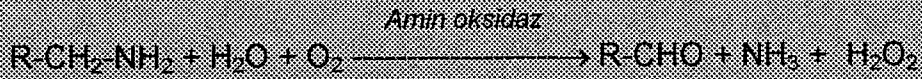
Organizmada serbest radikallerin oluşmasına yol açan tepkimeler şunlardır (19, 22, 57, 59, 70):

① Enzimatik tepkimeler

Vücutta endojen olarak oluşabilen oksijen metabolitlerinin enzimatik kaynakları şunlardır (22, 59):

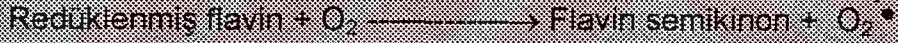
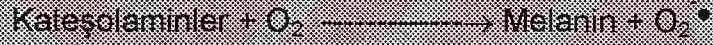
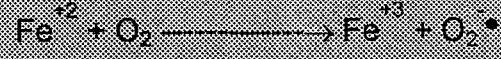


NADPH oksidaz polimorf nüveli lökositler, makrofajlar ve monositler gibi inflamatuvar hücrelerin yüzeyinde bulunur ve uygun uyarana (bakteri, mantar) ile karşılaştığında O_2 'yi $\text{O}_2^{\bullet-}$ 'e çevirir ("solunum patlaması").



② Nonenzimatik tepkimeler

Otoksidasyon tepkimeleri sonucu oluşan reaktif oksijen metabolitlerinin nonenzimatik kaynakları aşağıda özetlenmiştir (22, 57):



③ Patolojik prosesler

- ◆ İskemi-reperfüzyon
- ◆ Uzun süreli metabolik hastalıklar
- ◆ Yangı (Nötrofil, eozinofil ve makrofajlar fagositoz sırasında önemli ölçüde $\text{O}_2^{\bullet -}$ üretmektedirler)

④ 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 olarak aşağıdaki ürünleri oluştururlar (34):

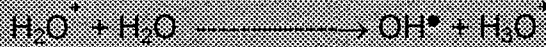


Sulu ortam oksijen içeriyorsa aşağıdaki tepkimelerle süperoksit radikali de kolaylıkla oluşmaktadır.



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 ;



tepkimleri ile de radikaller oluşmaktadır.

- ◆ Hava kirliliği
- ◆ Toksik kimyasallar
- ◆ Sitostatikler (Adriamisin, Daunorubisin, Doksorubisin)
- ◆ Pestisitler
- ◆ Sigara

REAKTİF OKSİJEN METABOLİTLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ VE HÜCRE HASARI

Hücrede koruyucu mekanizmaları aşacak kadar serbest radikal oluştuğunda, farklı şekillerde metabolik ve selüler bozukluklar meydana gelmektedir.

Serbest radikallerin hücresel hedefleri Tablo 2'de özetlenmiştir (19, 65, 72, 73):

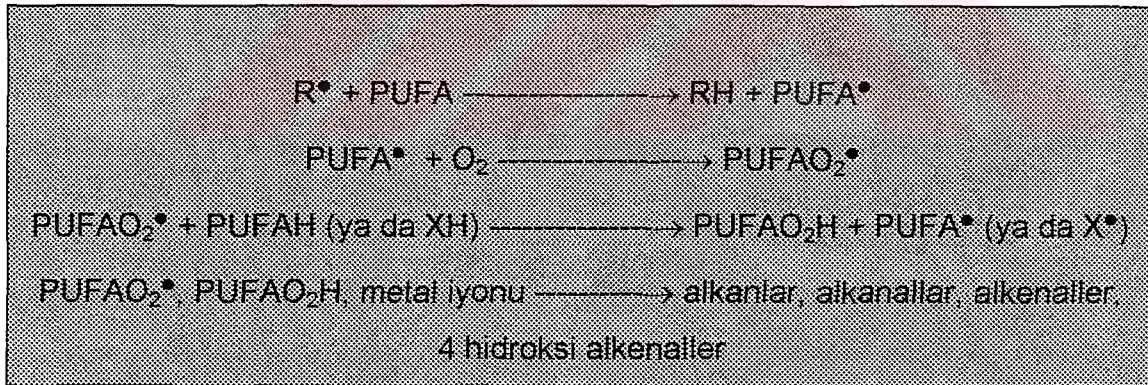
HEDEF	SONUÇ
Doymamış ve tiol içeren aminoasitler	Protein denatürasyonu ve çapraz bağların oluşumu, enzim inhibisyonu ve hücre membran geçirgenliğinde değişiklik
Nükleik asit bazları	Baz hidroksilasyonu, hücre döngüsünde değişiklik, mutasyon
Karbonhidratlar	Hücre membran reseptör duyarlılığında değişiklik
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 2. Serbest radikallerin hücresel hedefleri

Bu etkiler sonucunda hücre ve dış ortamında şu değişiklikler gözlenir (70):

① **Ekstraselüler boşluk:** Serbest radikaller hücreyel etkilerinin yanı sıra ekstraselüler etkilere de yol açarlar. Hücrenin göstereceği yangısal yanıt ve takip eden doku hasarının boyutunu belirlemede serbest radikaller önemli rol oynarlar. Süperoksid anyonu ve hidroksil radikali ekstraselüler matrikste "oksidatif indirgeme depolarizasyon tepkimeleri" olarak tanımlanan bir dizi tepkime ile hyalüronik asidi ve kollajeni parçalarlar. Özellikle hyalüronik asid gibi glikozaminoglikanların bol miktarda bulunduğu ekstraselüler sıvılarda (örneğin; göz vitreusu ya da sinoviyal sıvı) izlenen bu tepkimeler canlı dokuların yapısal özellikleri ile membran geçirgenliklerini belirgin olarak değiştirmektedir (5, 72, 73).

② **Biyomembranlar:** Memeli hücre membranları peroksidatif hasara karşı çok duyarlı olan çok doymamış yağ asidlerini (PUFA) bol miktarda içermektedir (14) Bu yağ asidlerinin peroksidasyonu aşağıdaki şekilde gerçekleşir (72, 73):



Radikal, yağ asidi ile birleşerek tepkimeler serisini başlatır. Radikal yağ asidinin oksijenle birleşmesi sonucu lipid peroksid radikali (LOO[•]) oluşur. Lipid peroksid radikalleri başka yağ asidi yan zincirleriyle tepkimeye girerek lipid hidroperoksidlerini (LOO[•]H) oluştururlar. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asidlerinin peroksidasyonu malondialdehid üretimine yol açar. Bu peroksid ürünleri metal iyonları varlığında bazı enzimatik tepkimeler ile etan ve pentan gibi yıkım ürünlerinin yanı sıra yaşlanma pigmentleri ya da lipofüsin olarak

adlandırılan ve 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 yol açar. Ayrıca diffüze olabilen 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 hasarlayıcı olayın başlamasına neden olur (52, 72, 73). Bu hasarlayıcı olaylardan bazıları; fosfolipaz aktivasyonu 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 enzimlerin aktivitesinde artış ve endonükleaz aktivitesi ile DNA kırıklarının oluşumudur.

Membran hasarı hücre zarfını etkilemesinin dışında önemli organelleri çevreleyen membranları da etkiler. Lizozom ve mitokondri gibi organellerin de etkilenmesiyle ortama salınan lizozomal enzimlerin artışı serbest radikallerin yol açtığı hücre hasarına katkıda bulunur (5).

③ **Proteinler:** Oksijen metabolitlerinin saldırdığı başka bir hücre komponent de iyonların transportunda ve hücre içi iyonik homeostazda önemli rolleri olan membran proteinleridir. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan aldehid ürünleri, kovalan olarak proteinlere ve özellikle lizin artıklarındaki epsilon amino gruplarına bağlanırlar (13). 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 (19). Böylelikle aktiviteleri için bu amino asitlere gereksinim duyan papain, gliseraldehid 3 fosfat gibi enzimler serbest radikallere ya da radikal üreten ajanlara maruz kalınca inhibe olurlar. Bunların yanı sıra sitoplazma ve membrandaki proteinler ozon ve protoporfirin IX gibi okside edici

ajanlarla karşılaştıklarında çapraz bağlar ya da büyük agregatlar da oluştururlar.

④ **Mitokondri:** Normal koşullarda mitokondri, 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^{\cdot} salınımına neden olur. "Tek değerli oksijen kaçağı" olarak bilinen bu olay normal koşullarda hücrenin savunma sistemleri ile yok edilebilmektedir. Oksidan stresin fazla olduğu durumlarda ise savunma sistemleri yetersiz kalarak mitokondride hasar oluşmasına neden olurlar. Enerji üretiminden sorumlu organel olan mitokondrinin kendi DNA'sı vardır. mtDNA nükleer DNA'yı koruyan histonları içermediğinden oksidatif hasara karşı daha hassastır. mtDNA'da oluşan mutasyonlar yaşla ilgili dejeneratif hastalıkların gelişimine yol açarlar. Ayrıca yine bu mutasyonlar solunum zincirindeki enzimlerde defekte neden olarak hücre ve dokuda enerji açığına ve hücrenel enerji metabolizmasının yıkılmasına neden olurlar. Hücrenin enerji sisteminin etkilenmesi ile ATP kullanımında artma ve ATP sentezinde azalma (Gliseraldehid 3 fosfat dehidrogenaz iki SH grubunu kaybederek aktivite kaybına uğrar ve sonuçta moleküle NAD bağlanamaz; ATP sentezi ile ATP sentetaz aktivitesi inhibe olur), bununla bağlantılı olarak da hücrede ATP düzeyinde hızla düşme görülür (29).

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

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

OKSİJEN RADİKALLERİ VE KLİNİK PATOLOJİK DURUMLAR

Serbest oksijen radikalleri hücrenin çeşitli komponentlerine olan hasarlayıcı etkileri nedeni ile aşağıda belirtilen patolojik durumlarda önemli rol oynarlar (5, 14):

① *İlaç ve bazı ekzojen ajanlarla oluşan toksisite:*

- ◆ İyonizan radyasyon
- ◆ Kemoterapötik ilaçlar (adriamisin, streptozotosin, bleomisin)
- ◆ Nitrofurantoin
- ◆ Karbon tetraklorür
- ◆ Parakuat
- ◆ Kimyasal karsinojenler (benzpirin, sigara, ozon, NO, NO₂, hava kirliliği)
- ◆ Alloksan

② *Hiperoksijenasyon sendromları:*

- ◆ Akciğerde oksijen toksisitesi
- ◆ Retrolental fibroplazi

③ *İskemi-reperfüzyon sendromları:*

- ◆ Myokard enfarktüsü
- ◆ Kardiopulmoner by-pass
- ◆ Organ transplantasyonu
- ◆ Stres ülseri
- ◆ Barsak iskemisi
- ◆ Nekrotizan enterokolit
- ◆ Şok sonrası karaciğer yetmezliği
- ◆ Beyin iskemisi
- ◆ Akut renal tübüler nekroz
- ◆ Serbest flep transferleri

④ ***İnflamatuvar hastalıklar:***

- ◆ Nötrofil fagositozu
- ◆ Artrit
- ◆ İnflamatuvar kemik hastalıkları
- ◆ Bağ dokusu hastalıkları
- ◆ İmmun yetmezlikler

⑤ ***Toksik doku hasarı:***

- ◆ Aspirasyon pnömonisi
- ◆ Pankreatit
- ◆ Özofajit

⑥ ***Genel durumlar:***

- ◆ Yaşlanma
- ◆ Dolaşım şoku
- ◆ Periferik ödem
- ◆ Kanser
- ◆ Amiloidoz
- ◆ Arterioskleroz
- ◆ Diabetes mellitus

BİYOLOJİK SİSTEMLERDE LİPİD PEROKSİDASYONU

Organik dünyanın belki de en stabil molekülleri olan fosfolipidlerin içerdikleri ansatüre yağ asidi zincirleri sitoplazmik yapının ve biyolojik membranların temel elemanıdır. Biyolojik yapılar özellikle membranlar yüksek oranda doymamış lipid içermektedirler. Bu lipidler bir radikal başlatıcısının ya da oksijenin varlığında oksidasyona uğrarlar. Biyolojik sistemlerde lipid peroksidasyonu büyük önem taşır; zira lipid peroksidler selüler hasara yol açan, metabolizmayı değiştiren ve dokulardaki kan akımını azaltan potent kimyasal maddelerdir (50). Radikallerin yol açtığı bu olay patolojik ya da fizyolojik işlemlere (prostaglandin sentezi ya da yaşlanma) eşlik edebilir.

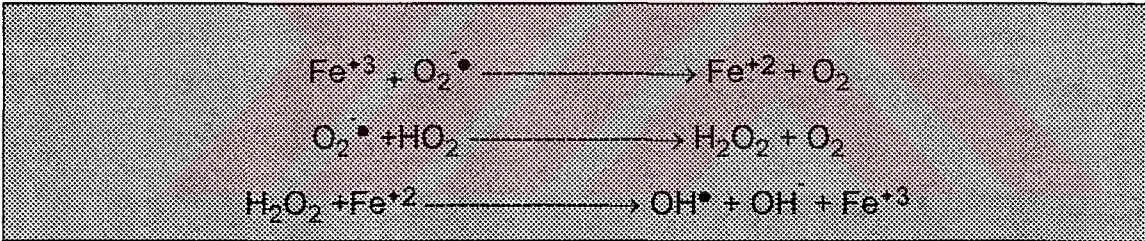
Teorik olarak üç tip radikal, peroksidasyonun başlatılmasında yer almaktadır (50):

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

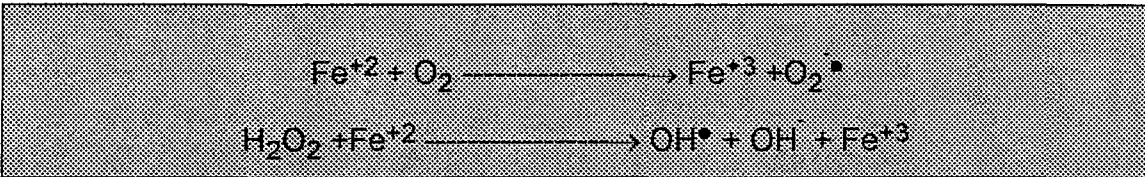
Singlet oksijen ve hidroksil radikalının her ikisi de lipid peroksidasyonunu başlatabilir, ancak peroksidasyon mekanizmaları farklıdır. Lipid radikal (lipid peroksid) zincir tepkimesinin uzunluğu ve böylece lipid peroksidasyonunun şiddeti lipid ansatürasyonunun derecesine göre artmaktadır. Hidroksil radikali ile oluşan lipid peroksidasyonunda ansatüre yağ asidinin iki allik karbonundan hidrojen atomu çıkarken, singlet oksijen ile oluşan lipid peroksidasyonunda oksijen direkt olarak oleine ilave olur. Bu farklılık sonuçta oluşan peroksidasyon ürünlerinde kendini gösterir. Buna örnek olarak oleik asidden hidrojen atomu

çıkması ile 8 ve 11 hidroperoksid izomerleri ve 9 ve 11 izomerlerinin oluşması, singlet oksijen etkisi ile de 9 ve 10 hidroperoksidlerin oluşması verilebilir. Lipid peroksidasyonunu başlatan diğer bir ajan NO_2 'dir. Bu ajanın etkisi sonucu hidrojen atomunun çıkması ya da oleine NO_2 ilavesi ile peroksidasyon oluşmaktadır (50).

Lipid peroksidasyonunu başlatan serbest radikallerin meydana gelişinde bazı metallerin esas rolü oynadığı kabul edilmektedir. Deneysel sistemlerde bu amaçla genellikle demir ya da 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} ya da ferrik şelatlar lipid peroksidasyon tepkimelerini başlatabilirler. Çoğu kez ksantin oksidazın ksantin ya da hipoksantine etkisi ile oluşan süperoksid radikali redükleyici etki göstermektedir. Benzer şekilde askorbat da bağımsız bir mekanizma ile Fe^{+3} 'ü indirgemektedir.



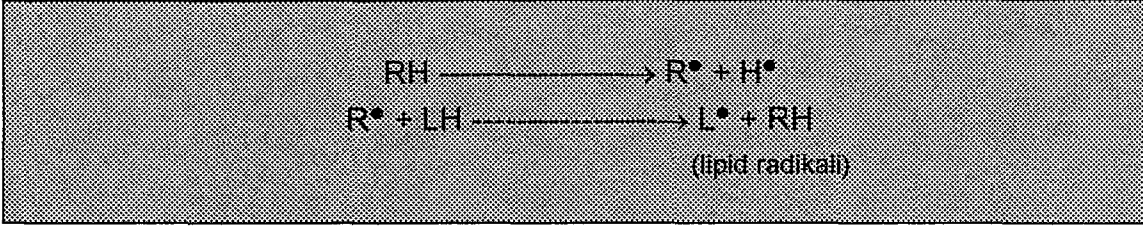
Fe^{+2} 'i bir oksidanın Fe^{+3} 'e oksidlemesiyle de lipid peroksidasyonu başlayabilir. Çoğu kez oksidan moleküller oksijen ve hidrojen peroksiddir.



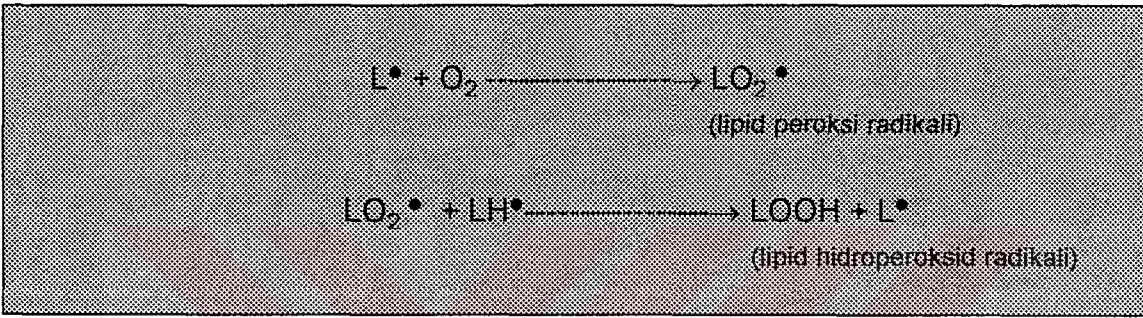
Lipid peroksidasyonu yağların özellikle poliinsatüre yağ asidlerinin oksidatif oksijen bağımlı yıkılımı olarak tarif edilir ve dallanan bir zincir reaksiyonudur. Olayda genelde bir enzimin varlığı gerekli olmamasına rağmen belirtildiği gibi demir ve bakır gibi iz metaller, ultraviyole ya da radyasyon olayı

katalizleyebilmektedir. Bu zincir reaksiyonu 4 ana aşamada incelenebilir (Şekil 1) (69, 83):

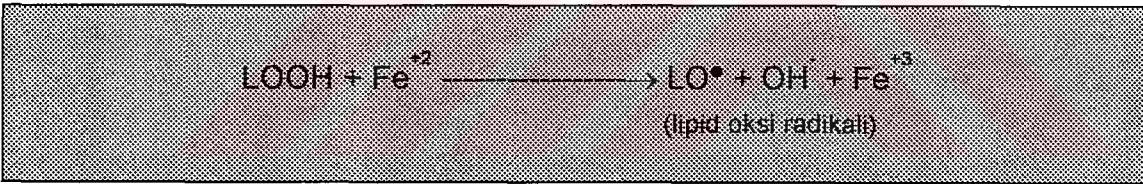
① **Zincir başlangıcı:**



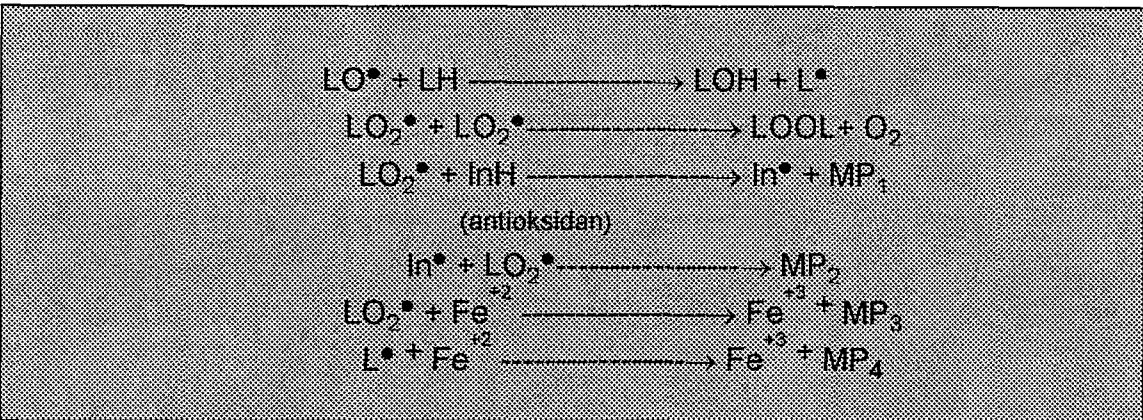
② **Zincir ilerlemesi:**



③ **Zincir dallanması:**

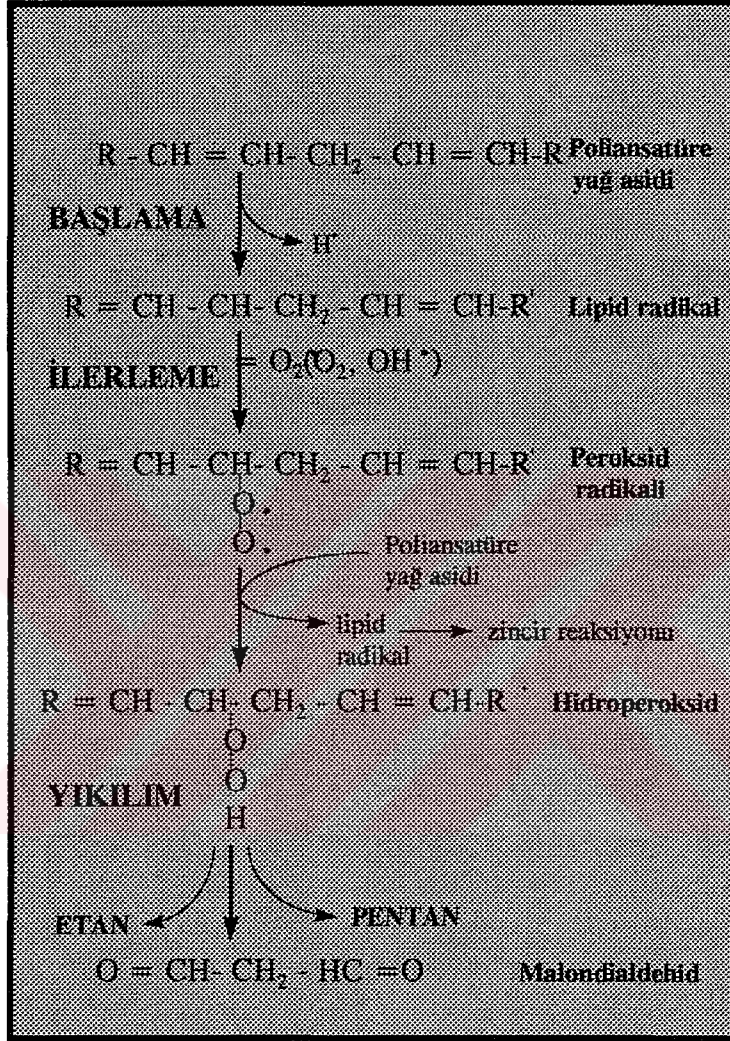


④ **Zincir sonlanması:**



*(MP₁₋₄: Sonraki zincir tepkimelerine katılmayan tanımlanmış çeşitli moleküller)

Lipid peroksidasyonunda ilk olarak çifte bağlar yeniden düzenlenmeye uğrayarak konjuge dien yapısına dönüşürler. Daha sonra peroksidasyon olayı devam ederek lipid endoperoksidleri ve/veya lipid hidroperoksidlerinin oluşumuna yol açar. Lipid endoperoksidlerinin daha ileri yıkılımı ile göreceli olarak stabil bir son ürün olan MDA oluşur.



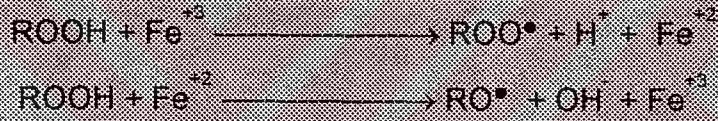
Şekil 1. Lipid peroksidasyonu (3)

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 otooksidasyonda 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. Poliansatüre 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 ise 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 (69).

Linoleik asidin ya da linoleat esterlerinin primer oksidasyon ürünleri incelendiğinde dört ana konjuge dien hidroperoksidin olduğu saptanmıştır. Bu dört üründen (karışımın % 97'si) başka eser miktarlarda nonkonjuge hidroperoksidler de identifiye edilmiştir. Dien hidroperoksidler anstabilidir (63).

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



Hemoglobin, sistein-FeCl₃ kompleksi, EDTA-Fe⁺³ gibi demir taşıyan kompleksler kataliz olayında etkilidirler. Yüksek konsantrasyondaki demir ise antioksidan etkilidir. Fe⁺² ile Fe⁺³ arasındaki den21i bu antioksidan etkiden sorumlu tutanlar da vardır. Konsantrasyon ne olursa olsun Fe⁺² / Fe⁺³ oranının 1,0 olduğu durumda maksimal lipid peroksidasyonu olduğu da ileri sürülmüştür (69).

Linoleik asid hidroperoksidlerinin alkoksil ve epoksi allik radikallere, ferröz katalize yıkılımını, oksijenle tekrarlanan tepkime ve hidrojen çıkması ile izomerik epoksi hidroperoksidlerin oluşumu takip etmektedir.

Hidroperoksidlerin termolitik yıkımı ile de volatil hidrokarbonları ve aldehidleri içeren kısa zincirli ürünler meydana gelmektedir. ω-6 ve ω-3 peroksidlerden oluşan pentan ve etan bu yıkılım yolunun iyi bilinen örnekleridir. Hidroperoksidler

ayrıca homolitik yıkılıma da uğramaktadırlar. Bunun örneği de epoksi alkoller ve epoksidlerin oluşmasıdır (50).

SELÜLER DÜZEYDE LİPİD PEROKSİDASYONUNUN ETKİLERİ

Lipid peroksidasyonu üzerine yapılan çalışmalar, bu tepkimeler zincirinin protein moleküllerine, lipid çift tabakaya ve organellere olan etkilerini açığa çıkarmıştır (83):

① Lipid bilayer düzeyindeki değişmeler:

- ◆ Akışkanlığın azalması
- ◆ Negatif yüzey geriliminde artma
- ◆ Protein iletkenliğinin oluşması
- ◆ Elektriksel stabilite kaybı ve nonspesifik permeabilite artması

② Biyomembranlar ve organellerdeki değişiklikler:

- ◆ Membrana bağlı enzimlerin inaktivasyonu
- ◆ Tiol grup oksidasyonu ve iyonik permeabilite artması
- ◆ Oksidatif fosforilasyonun bozulması
- ◆ Mitokondrilerden sitokrom C kaybı
- ◆ Solunum zinciri inhibisyonu
- ◆ Karaciğer hidrosilasyon sisteminin hasarı
- ◆ Lizozomal enzimlerin salınması
- ◆ Membrana bağlı fosfolipazların aktivasyonu
- ◆ Membran proteinlerinin solubilizasyonu

③ Hücre metabolizmasındaki değişiklikler:

- ◆ Tokoferoller, steroidler ve tiroksinin yıkılması
- ◆ Tiol bileşiklerinin azalması
- ◆ Hücre motilite inhibisyonu
- ◆ İyonların tekrar dağılımı
- ◆ Hücre bölünmesinin yavaşlaması

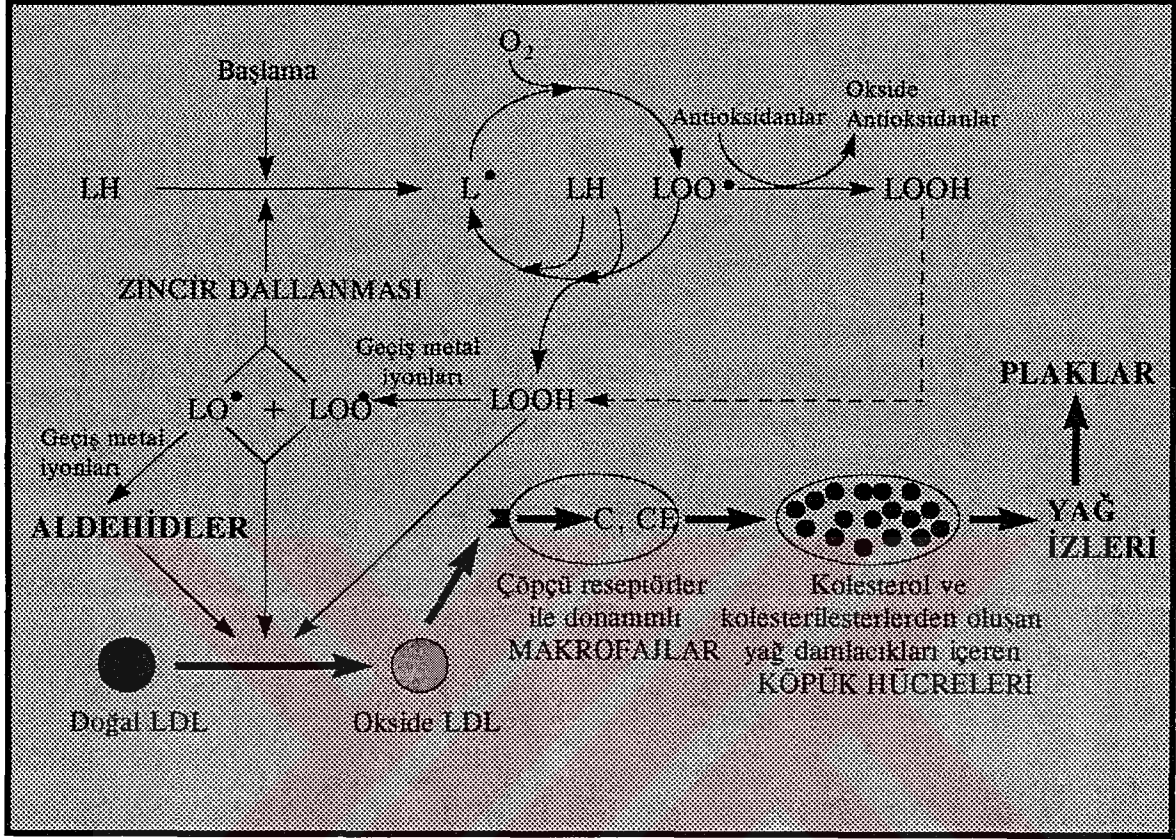
LİPİD PEROKSİDASYONU ve ATEROSKLEROZ

Yapılan biyokimyasal çalışmalar, deneysel hayvan çalışmaları ve epidemiyolojik araştırmalardan elde edilen sonuçlara göre düşük densiteli lipoproteinlerin (LDL) oksidatif modifikasyonunda lipid peroksidasyonunun rolü olduğu ortaya çıkmıştır. LDL, 2.5 milyon molekül ağırlığında ve çekirdeğinde 1600 kolesterol esterle 200 molekül trigliserid molekülüne sahip büyük bir sferik moleküldür (17).

LDL'nin oksidasyonu serbest radikaller tarafından ilerleyen bir lipid peroksidasyonu olayıdır (Şekil 2) (17). Olay bir başlangıç radikalinin LDL lipidlerdeki bir poliansatüre yağ asidinden hidrojen çıkarması ile başlar. Bu başlangıç radikali, lipooksijenazın ilerlettiği ve lipid hidroperoksidleri ya da hidrojen peroksidleri ile ilerleyen olaylar sırasında oluşmuş olabilir. Metal iyonları varlığında bu radikaller lipid alkoksil, lipid peroksil ya da hidroksil radikallere dönüşebilir. Karbonmerkezli bir PUFA radikali oluşur oluşmaz moleküler oksijen ile tepkimeye girerek lipid peroksil radikaline dönüşür ki bu da yakında bulunan bir PUFA'dan bir hidrojen çıkararak bir lipid hidroperoksidi ve yeni bir PUFA radikali oluşturur. Bu son tepkime lipid peroksidasyon zincirini ilerleten reaksiyondur. Eğer bu zincir uzaması devam ederse bir başlangıç olayı tüm LDL PUFA'ları lipid hidroperoksidlerine dönüştürür. Bunun sonucunda yer alan dekompozisyon fazında ise lipid hidroperoksidleri aldehidler, hidrokarbon gazları, epoksidler ve alkol gibi stabil son ürünler de dahil olmak üzere bir dizi ürüne yıkılırlar.

Okside LDL (oLDL) bazı aldehidler gibi diffüze olabilen ve yüksek oranda sitotoksik özellik taşıyan lipid peroksidasyon ürünlerini içerir. Arteriyal duvarda depolanan oLDL bu biyolojik aktif bileşikleri ortama devamlı olarak salarak endotel hücre tabakasını irrite eder ve lezyonun ilerlemesine katkıda bulunur. oLDL ayrıca endotelden kaynaklanan gevşetici faktörün (EDRF-NO) yol açtığı düz kas hücre relaksasyonunu da inhibe eder. Minimal olarak okside olmuş olan LDL, endotel hücrelerini stimüle ederek bir dizi biyolojik aktif faktörlerin (monosit kemotaktik proteinler, endotel-lökosit adezyon molekülleri, monositler için büyüme faktörleri) salınımına yol açar. LDL aynı zamanda eikozanoid

homeostazında ve trombositlerin agregasyonunda da bozukluklara neden olur. oLDL aterosklerotik lezyonlarda T-lenfositleri aktive eder ve düz kas hücrelerinin proliferasyonuna da yol açar. Bütün bunlar ele alındığında oLDL'nin aterojenik olduğu söylenebilir (17).



Şekil 2. Lipid peroksidasyonu ve köpük hücrelerinin oluşumu

Aterosklerozun erken döneminde subendotelial boşlukta "köpük hücreler" bulunur. Olayın ilerlemesi ile bu hücrelerin çoğu ölerek ileride plaklara dönüşecek olan yağ çizgilerinin oluşumuna yol açarlar.

IN VIVO LİPİD PEROKSİDASYONUNUN ÖLÇÜMÜ

Serbest radikaller çok reaktif ve kısa ömürlü olduklarından saptanmaları oldukça güçtür. Bu nedenle serbest radikallerin lipid, protein ve DNA gibi hücrenel bileşenlerle etkileşiminden kaynaklanan son ürünlerin indirekt yolla saptanmasına yönelik metodlar geliştirilmiştir. Direkt olarak serbest radikalleri ölçen tek analitik teknik elektron spin rezonans spektrometridir; ancak bu teknik

de göreceli olarak çok hassas değildir ve mikromolar düzeyde olan serbest radikallerin "steady-state" konsantrasyonlarını gerektirdiğinden in vivo olarak uygulanımı çok fazla öneme sahip değildir (30).

Günümüzde lipid peroksidasyonunun insanda birçok patolojik olaydaki etkisinin kesin olarak ortaya konması da güçlükler içermektedir; çünkü in vivo olarak oluşan lipid peroksidasyon ürünlerinin tayini için spesifik ve basit yöntemler yoktur. Yaygın olarak kullanılan TBA testi, dien konjugasyon testleri ve gaz ekshalasyonu gibi testler sıklıkla sorgulanmıştır. Bunun yanı sıra lipid peroksid türevi aldehidleri saptamak için öne sürülen ve yüksek spesifisiteye sahip testler de kompleks yapıda olup uzun zaman alırlar ve bu nedenle biyolojik örneklerde uygulamaları sınırlıdır (60).

Lipid peroksidasyonunu ölçmeye elverişli değişik metodlar vardır. Bunların çoğu farklı basamaklarda oluşan peroksidasyon ürünlerinin tayini esasına dayanmaktadır (60, 72, 73, 87):

① Konjuge dienlerin spektrofotometrik tayini

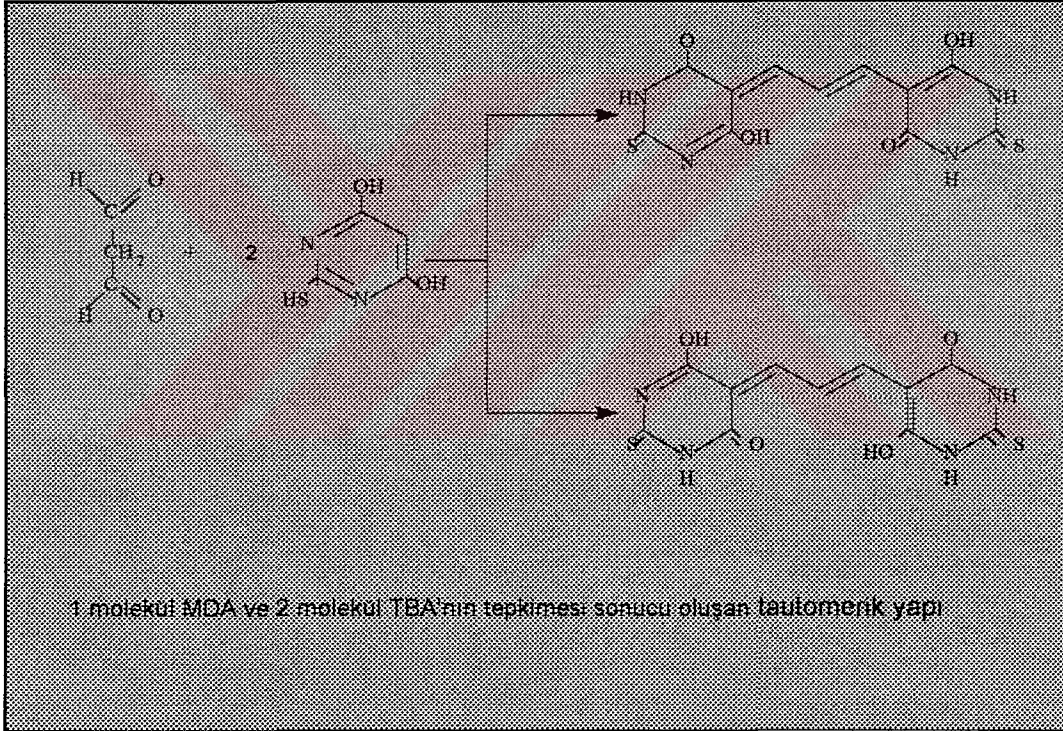
Karbon merkezli lipid radikaller kendilerini stabilize eden bir düzenlenmeye uğradıktan sonra konjuge dien olarak adlandırılırlar ve bu ürünler 234 nm'de karakteristik bir absorpsiyon bandı oluştururlar. Deney hayvanlarından elde edilen dokularda ve saflaştırılmış lipid sistemlerde bu absorpsiyonun tayini çok önemli bir indeks olarak kullanılagelmiştir. Biyolojik materyallerde mevcut olan birtakım maddeler (örneğin; hem proteinler) aynı UV alanında absorpsiyon gösterdikleri için interferans yaratabilirler. Konjuge dienlerin kloroform / metanol gibi bir organik çözücüde ekstrakte edilmesi ile örnekler bu etkileşimden uzaklaşırlar (30).

② Kemilüminesans ile lipid hidroperoksidlerinin tayini

Lipid ve proteinlerin oksidasyonu sonucu bileşikler geçici olarak uyarılmış düzeylere çıkarlar, daha sonra "ground state"e dönüş ışık emisyonu ile beraber oluşur. Kemilüminesans ile saptanan bu durum genel oksidatif stresin kalitatif yansımalarını verir.

③ Tiobarbitürik asid tepkimesiyle malonaldehid ve ilgili kromojenlerin fluorometrik, spektrofotometrik ve likid kromatografik tayini

Araşidonat metabolizmasında siklooksijenaz yolunun son ürünü olan malondialdehid lipid peroksidasyonunun en sık kullanılan indeksidir. Biyolojik örneklerde lipid peroksidasyonunun ve serbest radikal aktivitesinin göstergesi olan en kolay ve en popüler metod, bu ürünün tiobarbitürik asid ile tepkimesidir (30). TBA tepkimesi lipid peroksidasyonu için kullanılan nonspesifik bir test olmasına rağmen malondialdehid üretimi için iyi bir göstergedir (54). Bu tepkime malondialdehid ile tiobarbitürik asid arasındaki etkileşime dayanır; asidik koşullarda TBA ile birlikte ısıtılan örnek sonuçta 532 nm'de absorbands veren pembe bir ürün oluşturur (Şekil 3) (80).



Şekil 3: TBA-MDA tepkimesi ve ürünün tautomerik yapısı

TBA tepkimesi yüksek derecede hassas olmasına rağmen spesifikliğı düşüktür (89). Bu tepkime MDA için spesifik olmayıp TBA-reaktif ürünleri saptamaya yöneliktir. Serbest MDA'nın direkt olarak ölçümü ise en güvenilir olarak HPLC ile yapılır (30).

TBA testinin spesifikliđini engelleyen iki temel nokta vardır:

◆ TBA, MDA dışında diğer bileşiklerle (albümin, periodat ile okside olan glikoproteinler, glikoz deriveleri, riboz şekerler, hemoglobin, bilirubin, pirimidinler) de renkli ürünler oluşturabilir (69, 80).

◆ TBA testinin kaynatma aşamasında, daha önce oluşmuş olan lipid hidroperoksidlerinin yıkılımı sonucunda artefaksiyel bir MDA üretimi olur. Okside lipidlerde bulunan 2,4-alkildienler ve 2 alkenaller (+) bir tiobarbitürik asid tepkimesi oluştururlar (11, 69).

④ Gaz kromatografisi ile solunum havasında etan, pentan gibi alkanların tayini

⑤ Doku ekstraktlarından floresans ile lipofüsin pigmentleri tayini

⑥ Alkenaller, alkanlar ve diğer aldehid ürünlerinin HPLC, GS-MS ile tayini

⑦ Eritrosit deformabilite testi

⑧ Gaz kromatografi ile membran fosfolipidlerinden poliinsatüre yağ asidleri kaybının tayini

⑨ Oksijen tüketiminin tayini

ANTİOKSİDAN 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, H_2 reseptör antagonistleri, atrial natriüretik peptid, hipotermi...(52, 57) Üçüncü aşama aktive olmuş nötrofillerin lezyon bölgesine hücumunu ve birikimini inhibe etmek için antiinflamatuvarların kullanılmasıdır. Dördüncü ve en etkin yol artmış oksidanlara doğrudan etki ederek onları ortamdaki kaldırmaktır. Direkt etki ile oksidanları inaktif hale getiren maddelere "antioksidanlar" denir. Tüm antioksidanlar başlıca dört yol ile etkilerini gerçekleştirmektedirler. 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.

Halliwell ve Gutteridge (26, 27)'in belirttiğine göre antioksidanlar okside edilebilen substrata göre göreceli olarak daha düşük düzeylerde bulunan ve o substratın oksidasyonunu anlamlı derecede geciktiren ya da inhibe eden maddelerdir.

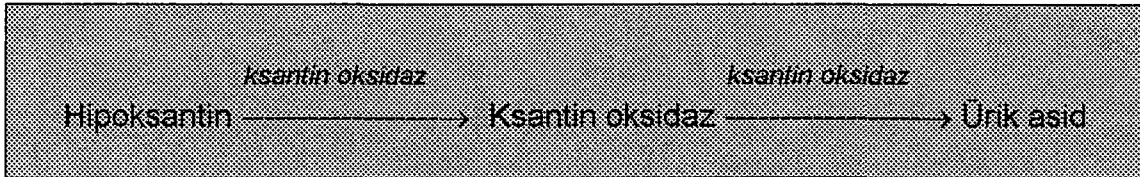
DOĞAL ANTİOKSİDANLAR

① Enzimler

- ◆ Süperoksid dismütaz; $O_2^{\bullet-}$ 'nin hidrojen perokside dismütasyonunu katalizler.
- ◆ Katalaz; hidrojen peroksidin dismütasyonunu katalizler.
- ◆ Glutasyon peroksidaz; hidrojen peroksid ve lipid peroksidlerinin redüksiyonunu katalizler.
- ◆ Glutasyon redüktaz; GSSG'nin (okside glutasyon) GSH'ye (redükte glutasyon) dönüşümünü sağlayarak indirekt yolla antioksidan etki gösterir.
- ◆ Hidroperoksidaz
- ◆ Sitokrom c oksidaz; hücredeki oksijenin % 95'ini detoksifiye eder.

Süperoksid dismütaz (süperoksid oksidoredüktaz-SOD-EC 1.15.1.1)

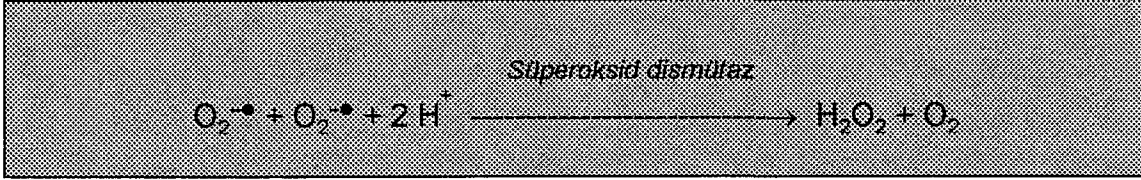
Fridovich ve arkadaşları 1968 yılında daha önce alyuvarlardan saflaştırılan, fakat herhangi bir enzimatik aktivitesi saptanamayan bakır içeren bir proteinin (eritroküprein) ksantin oksidaz deney sistemine eklendiğinde sitokrom C'nin indirgenmesini inhibe ettiğini bulmuşlardır (70). Ksantin oksidaz tepkimesinde $O_2^{\bullet-}$ • oluştuğu ve bu radikalın sitokrom c'yi indirgediği daha önce bilinmekteydi.



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 $O_2^{\bullet-}$ 'nin

dismutasyonunu katalizledikleri gösterilmiş ve enzim süperoksid dismutaz olarak adlandırılmıştır.

Süperoksid dismutaz, oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunan ve süperoksidin hidrojen perokside dismutasyonunu katalizleyen bir metaloenzim olup 21. kromozomda lokalize olmuştur (53).

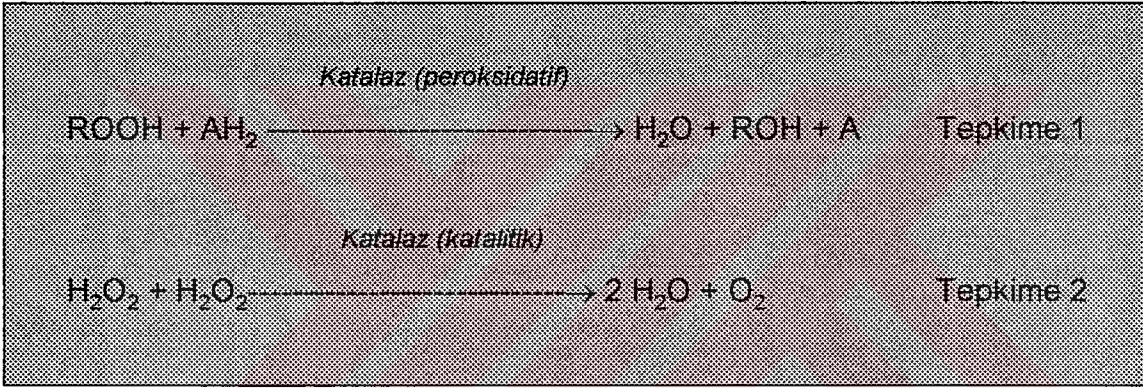


SOD, süperoksid anyonunun dismutasyonunu 10^4 kez hızlandırmaktadır ve hız sabitesi $2 \times 10^9 / \text{ms}$ 'dir. İndüklemeye bağlı olarak intraselüler SOD artışı dioksijenin toksisitesine karşı gelişen bir direnç artışını da beraberinde getirir (24).

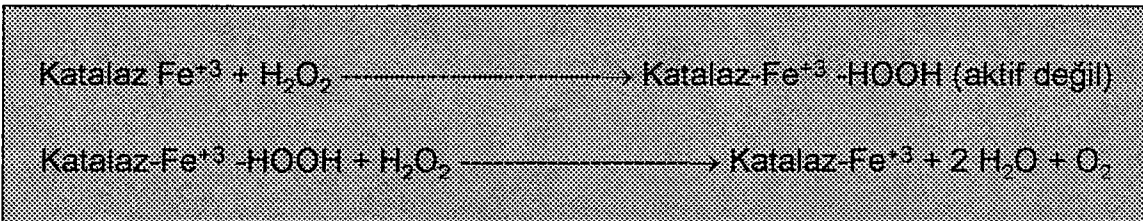
Süperoksid dismutazın bugüne kadar dört farklı şekli bulunmuştur. Bunlardan biri ökaryotik hücrelerin sitozolünde (Zn^{++} ve Cu^{++}) ve mitokondrinin intermembran aralığında (Mn^{++}) bulunur. Molekül kütlesi 31 200 Da olan bu enzim her bir dimerik protein için birer molekül bakır ve çinko içerir. Çinkonun stabiliteyi sağladığı, bakırın ise aktiviteden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Çinkonun ayrılması irreversibl iken, bakır reversibl olarak ayrılıp tekrar bağlanabilir. Mn-SOD kalp, karaciğer ve böbrekte en yüksek konsantrasyonlardadır. Cu-Zn SOD ise karaciğer, beyin ve testiste en yüksek; eritrosit, akciğer ve pankreasta ise en düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Cu-Zn SOD sıçan karaciğerinde lizozomlarda da bulunur. Cu-Zn SOD siyanür ile inhibe olurken Mn-SOD siyanür ile inhibe edilemez (85). 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 (24, 70).

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 (48, 74). Bu enzim kan, kemik iliği, karaciğer, müköz membran ve böbrekte yüksek miktarlarda bulunmaktadır. Eritrosit dışında özellikle peroksizomlarda yoğun olarak bulunur (86). Katalaz, düşük hızlarda hidrojen peroksidin olduğu durumlarda ya da yüksek elektron alıcısı konsantrasyonlarının bulunduğu ortamlarda peroksidatif tepkimeyle (Tepkime 1), hidrojen peroksid oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkimeyle (Tepkime 2) hidrojen peroksidi suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırır.



Katalazın aktivitesi için demir gereklidir. Aktif kısmı olan Fe^{+3} -protoporfirinin iki fonksiyonel döngüsü bulunmaktadır.



Ortamda çok düşük hidrojen peroksid düzeyi olduğunda, aktif olmayan enzim bileşiği ile elektron alıcısı tepkimeye girer:



② **Nonenzimatik antioksidanlar**

- ◆ Seruloplazmin; demiri okside eder.
- ◆ Transferrin; dolaşımdaki demiri bağlar.
- ◆ Hemoglobin; oksidanları bağlar.
- ◆ E vitamini ve analogları; lipid peroksidasyon zincirini kırarlar.
- ◆ C vitamini $O_2^{\cdot-}$ ve OH^{\cdot} 'i direkt olarak tutar, E vitaminini rejenere eder.
- ◆ Tiyol içerenler (glutasyon, N asetil sistein, metiyonin); serbest radikal ve HOCl tutucusudur.

- ◆ A vitamini; direkt olarak peroksillere etki eder.
- ◆ Ürik asid; $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} ve peroksil tutucusudur.
- ◆ Sistein; $O_2^{\cdot-}$ ve OH^{\cdot} tutucusudur.
- ◆ Ubikinon; serbest radikal tutucusudur.
- ◆ Glikoz; hidroksil radikal tutucusudur.
- ◆ Bilirubin; $O_2^{\cdot-}$ ve OH^{\cdot} 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 sistemlere karşı savaşılan antioksidan savunma mekanizmaları ile eşleşmiştir (65).

İLAÇLAR

- ◆ Ebselen; endojen glutasyon peroksidaz aktivitesini artırır.
- ◆ Demir şelatörleri; desferroksamin, dimetil tioüre, serüloplazmin; serbest Fe^{+3} 'ü bağlarlar.
- ◆ Sitokinler (TNF ve interlökin-1)
- ◆ Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopurinol, oksipürinol); ksantin oksidaz tarafından süperoksid anyon üretimini inhibe ederler.

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

◆ NADPH oksidaz inhibitörleri; adenozin, lokal anestezipler, Ca⁺² kanal blokerleri, nonsteroidal antiinflatuar ajanlar; nötrofil ve makrofajlardaki NADPH oksidaz üretimini inhibe ederler.

◆ Mannitol; OH• radikalini tutar.

◆ Barbitüratlar

◆ Flavanoidler

◆ Trimetazidin

◆ İndepamid

◆ H₂ reseptör blokerleri



KARDİOVASKÜLER SİSTEM

YAŞLANMA VE KARDİOVASKÜLER DEĞİŞİKLİKLER

Damar düz kaslarında kollajen artışı ve elastik dokunun azalması yaşlanmada izlenen damar kompians azalmasını açıklayabilir. Azalmış kardiyak output ve artmış periferel direnç sonucu organ perfüzyonunda düşüş izlenir. Dinlenme sırasındaki "kardiyak output" 20 yaştan sonra progresif olarak düşer. Bunun yanı sıra yaşlanma ile kalp hızı azalırken diastol ve sistol sonu hacim artar. Ayrıca myokardın β adrenerjiklere yanıtında azalma saptanır. Bu durumun nedeni yaşla beraber artan endojen kateşolaminler olduğu gibi yaşla ilgili olan diğer değişiklikler de olabilir. Diyastolik disfonksiyon ortaya çıkar. Yaşlı insanlarda azalmış bir baroreseptör duyarlılığı izlenir, bunun sonucu olarak intravasküler volümdeki değişikliklere kardiovasküler yanıtta azalma olur (1, 92).

KALP HASTALIKLARI VE İSKEMİ-OKSİDAN STRES

Günümüzde iskemi sonucu gelişen kalp hastalıkları ve patolojik değişiklikler en önemli ölüm nedenidir. İskemik hasar sonucu artan kapiller permeabilite o bölgede öncelikle ödem oluşumuna yol açar. İskeminin devam etmesi durumunda ise sitozolik enzimler dolaşıma salınır ve mikroskopik / makroskopik değişiklikler ile doku hasarı oluşur. Son yıllarda yapılan çalışmalar iskemik dokuda oksijenden türev alan serbest radikallerin bol miktarda üretildiğini ve oluşan hasardan sorumlu olduğunu öne sürmektedir (43).

İskemik dokular hipoksik ya da anoksik olduklarından uzun yıllar oksijen metabolizma sapmaları ya da süperoksid ya da hidroksil radikali gibi serbest radikallerde bir artış beklenmemiş ve iskeminin hiperoksijenasyon sonucu gelişen oksijen toksisitesine karşı bir antitez oluşturduğu düşünülmüştür. Günümüzde ise iskemiyi takip eden reperfüzyon döneminde oluşan hasarda

iskeminin kalpte oluşturduğu etkilerin yanı sıra serbest radikal metabolizması sonucu gelişen ürünlerin de rol oynadığı saptanmıştır (43).

Myokardial iskemi bir dizi fizyolojik ya da terapötik işlem sırasında oluşabilir. Myokardial iskeminin nedeni ister ateroskleroz ya da tromboembolizm, ister koroner arter by-pass ya da transplantasyon gibi cerrahi işlemler olsun sonuçlar aynıdır; myokardiuma gelen oksijen miktarı ve metabolizma için gerekli substratlar azalır.

İskeminin ilk dakikalarında glikolitik yol oldukça fazla bir şekilde stimüle edilmesine rağmen NADH, sitrat ve laktatın birikimi ile doku asidoza yöneldiğinde bu yol inhibe edilir. Bu durumda, ortamdaki oksijen oksidatif fosforilasyonu desteklemeye yeterli olmadığından Krebs siklusuna girmesi gereken pirüvat, laktik aside dönüştürülür. Anaerobik yolla ATP'nin üretimi ise doku gereksinimini karşılayacak düzeyde değildir.

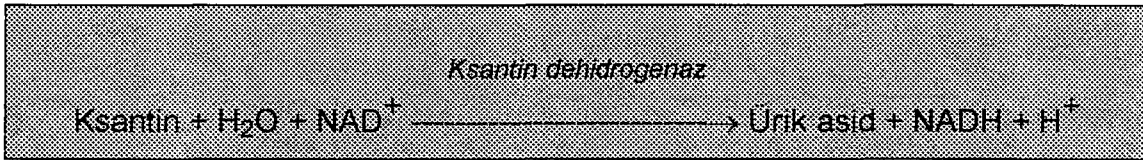
Devam eden iskemi ile ATP düzeyleri iyice düşer ve hücreye çok zararlı olan bir dizi olay başlar. Bunlar arasında en önemli olan hücrenin membran iyon dengesinin korunamamasıdır. Bunun sonucunda sodyum hücre içine girer, reperfüzyonda ise bu iyon kalsiyum ile yer değiştirir.

Reperfüzyon sırasında kalsiyum-sodyum değişimi kalsiyumun hücre içine girişini sağlayan tek yoldur. Hücre içi kalsiyumun artması; hücre dışına akışın azalmasından çok hücre içine olan akışın fazlalığına bağlıdır. Serbest intraselüler kalsiyumun artışı sonucu hücrenin iyon dengesi iyice bozulur. Kalsiyumla yüklü olan mitokondri daha fazla ATP üretemez ve lizise uğrar. Hücre içi proteaz ve fosfolipazlar aktive olur. Proteazların aktivasyonu hücre iskeletinin yıkılmasına yol açar. Fosfolipazların aktivasyonu sonucu membranda oluşan hasar ise serbest yağ asidlerinin ve lizofosfolipidlerin salınımına yol açar. Bu bileşikler toksik özellikler taşımalarının yanı sıra, reperfüzyonda radikallerin ve diğer sitotoksik ürünlerin oluşumuna yol açan araşidonik asid metabolizmasını başlatmaları nedeniyle de tehlikelidirler. Araşidonik asidin siklooksijenaz ya da lipooksijenaz tarafından metabolize olması işleminde hidroksil radikali ve

peroksil bileşikler oluşur. Spesifik lipooksijenaz tarafından araşidonik asidin metabolize edilmesi sonucunda ise mono ve dihidroperoksi yağ asitleri oluşur. Hidroperoksi yağ asitleri peroksidler gibi davrandıklarından metal iyon kompleksleri ile tepkimeye girerek hidroperoksil radikalleri ya da hidroksil radikalleri oluştururlar. Bunun yanı sıra hidroperoksid radikalleri ikincil haberci gibi davranarak reperfüzyonla indüklenen hasarda rol oynayan inflamatuvar ve immun yanıtları düzenlerler (18).

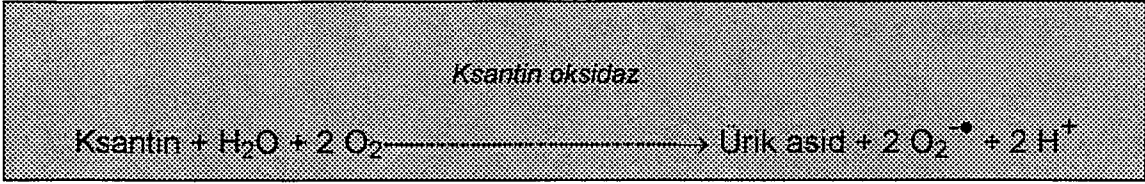
Serbest oksijen radikalleri kalbin sarkolemmal, SR ve mitokondriyal fonksiyonlarını etkilemenin yanı sıra kontraktıl proteinleri modifikasyona uğratarak da kardiyak disfonksiyona neden olurlar (32).

Doku iskemisi sırasında meydana gelen hasarın büyük bir bölümü moleküler oksijenin tekrar dokuya girdiği reperfüzyon safhasında oluşur. Postiskemik dokuda süperoksid anyon radikalının en önemli kaynağının ksantin oksidaz olduğu düşünülmektedir. Bu enzim organizmada ksantin dehidrogenaz (D formu) olarak sentez edilir ve barsak, akciğer ve karaciğerde yaygın olarak bulunur. Enzim D formunda iken elektronları H_2O_2 ya da $O_2^{\bullet-}$ oluşturmak üzere oksijene transfer edememekte ve ancak NAD^+ 'yi indirgemektedir.

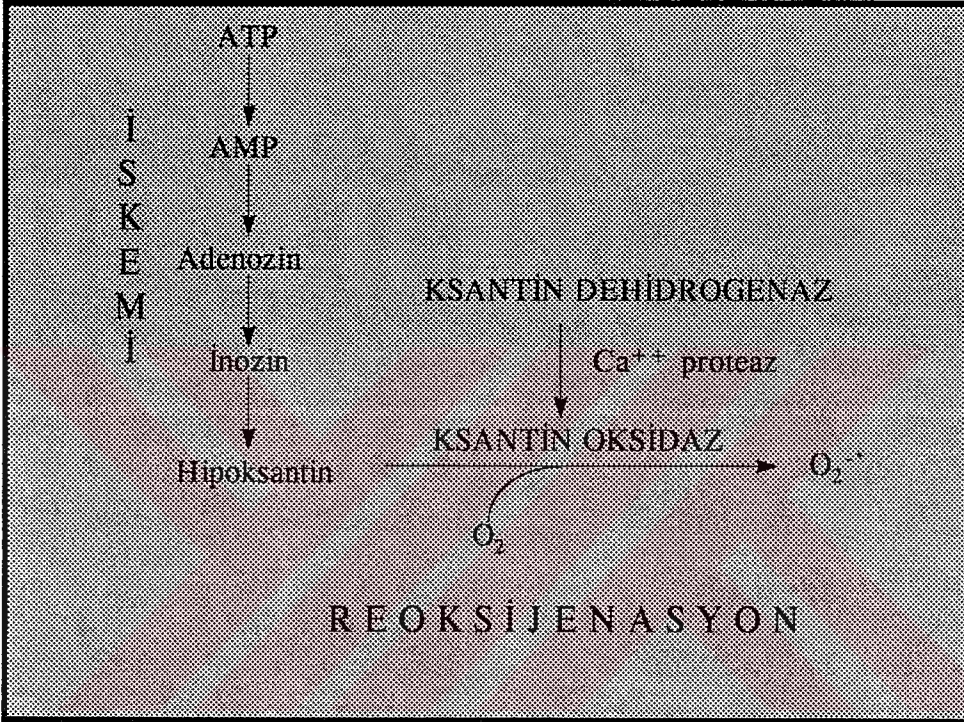


Tek başına ksantin oksidaz aktivite artması iskemik dokuda radikal hasarı meydana getirmeye yetmez, ortamda substrat bulunmalıdır. Bir substrat olan hipoksantin, iskemik barsak dokusunda adenozin trifosfatın (ATP) katabolizması sonucu normalin 5 katı kadar artmaktadır.

Ksantin oksidaz için diğer substrat moleküler oksijendir. Bu da iskemik dokunun reperfüzyonu ile sağlanmaktadır (50).



İskemik dokuda ise enzimin D formu, hızla O_2^- üreten oksidaz formuna dönüşür (65, 66) (Şekil 4).



Şekil 4. İskemi-reperfüzyon ve oksijen radikallerinin oluşumu

KATEŞOLAMİN METABOLİZMASI ve MONOAMİN OKSİDAZ

Kateşolaminler, vücutta hormon ve nörotransmitter olarak işlev yapan bir grup biyojenik amindir. Adrenal medullanın kromaffin granüllerinde, periferik ve santral sinir sisteminin sempatik sinir uçlarında bulunurlar. En önemlileri adrenalin, noradrenalin ve dopamindir. Adrenal medullanın temel ürünü olan adrenalin, medulladaki kateşolaminlerin % 80'ini oluşturur, 1-3 mg/gr doku konsantrasyonlarında bulunur ve medulla dışı dokularda yapılmaz. Medullada sentezlenerek depolanan adrenalin, kan dolaşımı yolu ile uzak organlar üzerinde de etkisini gösterir. Bu nörotransmitter soğuk, yorgunluk ve şok gibi akut durumlar karşısında organların sempatik yanıtını sağlamak için gereklidir. Medullada % 20 oranında bulunan noradrenalin ise sempatik sinir uçlarındaki başlıca kateşolamindir. Postsinaptik hücrede lokal olarak bir nörotransmitter şeklinde etki gösterir (6, 81).

Kateşolaminler tirozinden sentezlenirler. Kateşolaminlerin biyosentezinde hız kısıtlayıcı basamak tirozin hidroksilazdır. Bu enzim sadece kateşolamin sentez eden dokularda, sitoplazmada bulunur. Tirozinden oluşan dopamin daha sonra depolanmak ve gerektiğinde noradrenaline dönüşmek üzere veziküller içine girer. Burada dopamin β hidroksilaz, dopaminin noradrenaline dönüşümünü katalize eder. Solubl bir enzim olan fenil etanolamin N-metil transferaz ise adrenal medullada adrenalin oluşturmak üzere noradrenalinin N-metilasyonunu katalize eder (6, 45, 81).

Kateşolaminler adrenal medulla ve sinir hücrelerindeki depo veziküllerinde depolanırlar. Veziküllerin içeriği kalsiyuma bağımlı bir ekzositoz ile salgılanır. Salgılanan adrenalin dolaşıma geçerek hedef dokulara gider, noradrenalin ise nöron tarafından geri alınır (6, 45, 81).

Kateşolaminler kan beyin bariyerini aşamadıklarından beyinde lokal olarak sentez edilirler. Kateşolaminlerin ön maddesi olan L-Dopa, bu engeli aşarak hücre içine girebilir (6, 81).

Kateşolaminler plazmada albümin ile gevşek bir şekilde bağlı olarak taşınırlar. Son derece kısa (10-30 sn) biyolojik yarı ömürleri vardır.

Adrenalin karaciğerde ve kaslarda glikojenolizi stimüle ederek kan glikoz düzeyini yükseltir. Bu etkisini cAMP üzerinden gerçekleştirir. Periferik dokularda ise glikoz tutulumunu azaltır. Yağ dokusunda lipolizi uyararak serbest yağ asitlerinin ve gliserolün düzeylerini artırır (6, 45, 81).

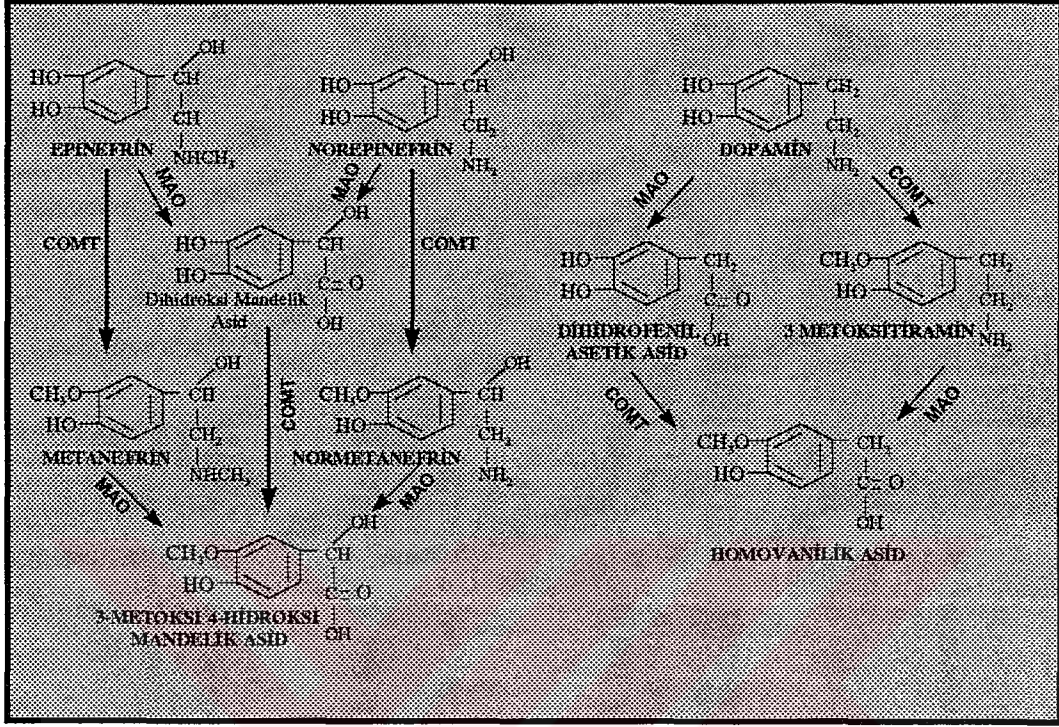
Adrenalin, iskelet kası arteriollerinde vasodilatasyon yaparken, deri, mukoza ve splanktik visseral arteriollerde vazokonstriksiyona neden olur. Kalp kası üzerine stimulan etkilidir. Noradrenalin ise genel olarak vazokonstriktör etkilidir.

Kateşolaminlerin yıkımında Katekol-O-Metil Transferaz (KOMT) ve Mono Amin Oksidaz (MAO) enzimleri rol alır. MAO oksidasyon reaksiyonlarını, KOMT ise metilasyon reaksiyonlarını katalizler (45).

Kateşolaminlerin metabolizmasındaki ilk aşama, yan zincirin metilasyonu ya da oksidasyonudur. Dokuya sıkı bir şekilde bağlı bulunan Noradrenalin, önce MAO tarafından oksidasyona uğrar, gevşek bir şekilde bağlı bulunan komponent ise önce KOMT tarafından metilasyona uğrar.

Katekol-O-Metil Transferaz (KOMT); pekçok dokuda özellikle kateşolaminlerin büyük oranda yıkıldığı karaciğerde yoğun olarak bulunan bir sitozolik enzimdir. Substrata bağımlı bir reaksiyon sonucu kateşolaminlerin inaktif O-metil türevlerini oluşturur. 3 no'lu pozisyondaki -OH gruplarının metilasyonu aracılığı ile kateşolaminlerin inaktivasyonunu katalizler. Mg^{++} 'a bağımlı olan bu enzim, sitozol içinde yer alır. Bu enzim metil grupları kaynağı olarak S-adenozil metionini kullanır. Aktif bir -SH grubuna gereksinim gösterir.

Noradrenalin, adrenalin ve dopaminin metabolizmaları Şekil 5'de gösterilmiştir (45):



Şekil 5. Kateşolaminlerin metabolizması

MONO AMİN OKSİDAZ (MAO, EC 1.4.3.4)

Monoaminoksidaz 5-hidroksitriptamin, dopamin, epinefrin ve norepinefrin gibi biyolojik olarak aktif aminlerin deaminasyon yolu ile in vivo inaktivasyonununun sorumlusu bir enzimdir. Eritrositlerde bulunmamasına rağmen memeli dokularında yaygın olarak bulunur. Sinir dokusu, karaciğer, mide, böbrek ve barsaklar yüksek oranda bulunduğu organlardır. Plazmaya göre trombositler göreceli olarak daha fazla MAO aktivitesine sahiptirler (78,79).

Monoamin oksidaz ilk kez 1928'de Mary Hare tarafından "tiramini okside edici aktiviteye sahip enzim" olarak tanımlanmıştır.

Primer aromatik aminler büyük oranda MAO tarafından yıkılır. Primer alifatik aminler, sekonder ve tersiyer aminler ise daha az oranda MAO ile yıkılırlar. Monoamin oksidazın doğal endojen substratları kateşolaminler ve indoletilaminler gibi aromatik amin deriveleridir, ancak enzim üç ya da daha fazla karbon zinciri içeren aromatik amin türevlerine karşı da aktiftir (78,79).

MAO tarafından inaktive edilen belli başlı maddeler şunlardır (23):

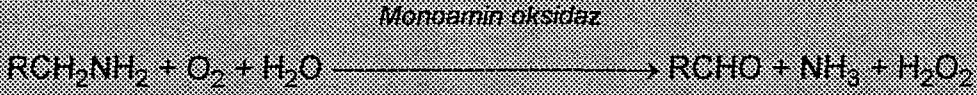
- ◆ Monoamin nörotransmitterler
- ◆ 5 OH triptamin, noradrenalin, dopamin
- ◆ Telemetil histamin (histaminin beyindeki ilk metaboliti)
- ◆ Fenil etilamin gibi beyinde iz miktarda bulunan aminler
- ◆ Triptamin ve tiramin
- ◆ Diyet ve ilaçlardaki monoamin birimleri
- ◆ Son yıllarda N-metil 4 fenil 1236 tetrahidropiridin (MPTP) gibi bazı bileşiklerin oksidasyonunu da yaptığı anlaşılmıştır.

Amin oksidazlar substrat spesifikliğine göre 1940 yılında Zeller tarafından monoaminoksidaz ve diaminoksidaz (histaminaz) olarak iki gruba ayrılmıştır. 1959'da Blaschko ve arkadaşları monoaminoksidazları inhibitör spesifitesine göre sınıflamışlardır (45):

① Daha çok serumda lokalize olan ve karbonil reaktiflerle inhibe edilen MAO (Benzilamin oksidaz, SMAO).

② Daha çok dokularda lokalize olan ve karbonil reaktiflere (semikarbazid, İNAH) dirençli MAO (Doku MAO, mitokondrial MAO). FAD içeren bir enzimdir. Enzim esas olarak mitokondri ile ilişkilidir; ancak küçük bir bölümün mikrozomal fraksiyonda olduğu da bulunmuştur (78,79, Enzymology of MAO). Submitokondriyal fraksiyasyon çalışmalarında enzimin dış mitokondriyal membrana sıkıca bağlı olduğu izlenmiştir. Deterjan kullanılmaksızın enzimin membrandan ayrılmasının zor olması enzimin membranda integral bir protein olduğunu düşündürmektedir. FAD, enzimin sistein grubuna izoalloksazin

halkasının 8. pozisyonundan tioester bağı ile kovalan bağlanır (89). Hücre içindeki MAO'nun %25'i de mikrozomlardadır. Bu enzim;

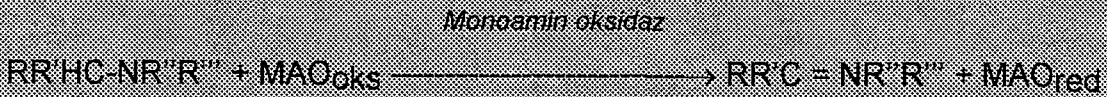


reaksiyonunu katalizler.

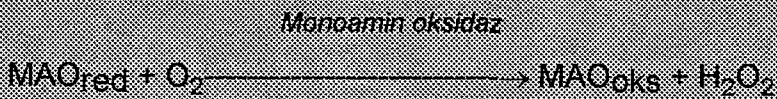
MAO'nun ana etki mekanizmasını oksidatif deaminasyon ve FAD'ye elektron transferi oluşturmaktadır (23). Amin oksidasyonunda ilk basamak C-N bağının dehidrojenasyonudur; sonuçta oluşan imin, aldehid ve amonyağı oluşturmak üzere hidrolize olur. Direkt ve indirekt kinetik bulgular bu hidrolizin enzim yüzeyinde olduğunu öne sürmektedirler. Aminin protone olmayan tipi substrat olarak rol alır. Amin enzimle tepkimeye girerek redükte enzimi ve ürünü oluşturur, bu redükte enzim hemen oksijen tarafından reoksidasyona uğrar (78,79).

MAO tarafından katalizlenen reaksiyon indirgen ve yükseltgen iki yarı reaksiyondan oluşur:

1) İndirgen yarı reaksiyon:



2) Yükseltgen yarı reaksiyon:



Alifatik substratlar için oksidasyon ürünü bir imindir. Bu, su ile hidrolize edilir ve kendiliğinden son ürüne dönüşür. Yapılan bazı çalışmalarda aldehidin FAD'ye elektron transferinden önce salındığı, amonyağın ise reoksidasyondan sonra salındığı gösterilmiştir.

Substrat spesifitesine ve inhibitör sensitivitesine göre monoamin oksidaz enziminin iki tipi tanımlanmıştır. A tipi monoamin oksidaz (MAO A) seçici olarak 5-hidroksitriptamin ve norepinefrini deamine eder ve klorgilin tarafından inhibisyona daha duyarlıdır. İnsanda plasentada, sıçanda dalakta, insan ve sıçanlarda ise barsaklarda bulunur. B tipi monoamin oksidaz (MAO B) ise seçici olarak feniletilamin ve benzilamini deamine eder ve deprenil tarafından inhibisyona daha duyarlıdır. Bu form esas olarak karaciğer ve beyinde bulunmakta, ayrıca insanlarda trombositlerde de yer almaktadır (8, 38).

MAO A dış mitokondrial membranın hidrokarbon çekirdeklerine bağlı iken, MAO B membranın periferik hidrofilik bölgelerine bağlıdır. MAO A 527 amino asit içerir ve 59.7 kD'dur. MAO B ise 520 amino asit içerir ve 58.8 kD büyüklüğündedir. MAO A kateşolaminerjik sinir uçlarında yoğun iken, MAO B serotoninerjik sinir uçlarında yoğundur.

Kateşolaminler metabolizmaları sırasında birkaç değişik mekanizma ile hasar yaratabilirler. Öncelikle metaller tarafından katalizlenen bir otooksidasyona uğrayarak reaktif kinonları oluşturabilirler. Kinonlar kovalan olarak GSH'a bağlanırlar ve böylelikle antioksidan havuzun boşalmasına neden olurlar. Başta norepinefrin olmak üzere kateşolaminler intraselüler enerji temininin zorlaşmış olduğu durumlarda oksijenin serebral metabolik hızını arttırarak iskemi-reperfüzyon hasarını ilerletirler. Nöral dokuya direkt kateşolamin toksisitesi üzerine de hipotezler öne sürülmüştür. İskemi sırasında salınan kateşolaminlerin enzimatik deaminasyonu sonucunda reperfüzyonda önemli miktarlarda oksidatif stres oluştuğu bilinmektedir. İskemi sırasında kateşolamin konsantrasyonlarının artması ile monoamin oksidaz (MAO) aktivitesi oksijene bağımlı hale gelir. Böylelikle reperfüzyon gibi dokuya tekrar oksijenin girdiği durumlarda H₂O₂

retiminde patlama meydana gelir. H_2O_2 , katekolaminlerin ve serotoninin normal bir metabolizma yan ürünüdür (68). H_2O_2 membranları geçerek NADH ve gerekli tiol gruplarının oksidasyonuna ya da çok reaktif hidroksil radikalini oluşturarak lipid peroksidasyonuna neden olur. MAO inhibitörleri H_2O_2 üretimini azaltarak CNS O_2 toksisitesine karşı beyni korur (91). Günümüzde doku hiperoksisi ile beraber ilerleyen SSS hasarında MAO inhibitörlerinin antioksidan etkisi ile ilgili çalışmalar sürmektedir.



MAO İNHİBİTÖRLERİ

MAO inhibisyonu, depresyon ve Parkinson Hastalığı tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir terapötik yaklaşımdır (47). Buna rağmen MAO inhibitörleri, depresyonun farmakolojik tedavisinde trisiklik antidepresanlar gibi diğer ilaçlara kıyasla daha temkinli olarak kullanılmagelmışlerdir. Bunun nedeni, MAO inhibitörlerinin trisiklik ajanlardan daha az etkin olmaları ve "cheese effect" olarak adlandırılan ciddi ve potansiyel fatal tehlikesi olan bir yan etkiye sahip olmalarıdır. Bu etki tiramin tarafından indüklenen bir hipertansif krizdir. MAO A aktivitesinin inhibisyonu sonucu tiramin düzeylerinin artması sempatik sinir uçlarından noradrenalin salınımına neden olmaktadır. Ayrıca MAO inhibitörleri birçok yiyecek ve ilaçla da etkileşime girmekte ve bu da tedavide kullanımlarını kısıtlayan başka bir faktörü oluşturmaktadır. Bütün bunlara rağmen son yıllarda;

- ◆ atipik depresyon
- ◆ terapiye dirençli depresyon
- ◆ reaktif-nörotik depresif sendrom
- ◆ anksiyete/panik bozuklukları ve fobilerin tedavisinde MAO inhibitörleri

sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (39) (Tablo 3).

	Nonselektif	MAO A selektif	MAO B selektif
İrreversibl	İzokarboksazid Fenelzin Tranilsipromin	Klorjilin	Selejilin (Deprenil) Parjilin
Reversibl		Brofaromin Simokzaton Moklobemid Teloksaton	

Tablo 3. Monoamin oksidaz inhibitörlerinin selektivite ve reversibiliteye göre sınıflanması.

MAO A inhibisyonu antidepresan etki için temel gereksinimdir, zira depresif bozuklukta etkili olan patolojik mekanizmalar arasında santral noradrenalin ve serotonin nörotransmisyonunun bozulması etkili olmaktadır. Buna karşılık, MAO B'nin selektif olarak inhibe edilmesi dopaminerjik fonksiyonların kaybı ile karakterize olan Parkinson Hastalığı'nda yararlıdır.

Monoaminoksidaz inhibitörlerinin depresif hastalıkların tedavisi için klinik kullanımda uygulanması monoaminoksidaz aktivitesinde yaygın düşüüşlere yol açmaktadır (45).

Klorjilin, deprenil ve parjilin gibi bir dizi asetilenik türevler de dahil olmak üzere var olan MAO inhibitörleri FAD ile kovalan bir ürün oluşturarak enzimi inhibe ederler (78,79). Bu tepkimeler enzim ile aktive olan irreversible inhibisyonlardır; başlangıçta inhibitör enzim ile reversibl nonkovalan bir kompleks oluşturur. L-deprenilin ve MAO'nun etkileşimi sonunda enzime bağlı FAD'da redüksiyon ve inhibitörde oksidasyon gelişir. Okside inhibitör daha sonra kovalan bir şekilde FAD'a N-5 pozisyonunda bağlanır. Sonrasında bu kompleks içinde enzim tarafından dehidrojenasyona uğratılır ve inhibitör enzimin aktif bölgesine bağlanarak inhibisyonu gerçekleştirir (20).

DEPRENİL

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 izopropilfenilmetilpropargilamin, fenilizopropil-N-metilpropinilamin, N-2-dimetil-N-propinil-2-feniletülenamin, R(-)-N-metil-N-(1-fenil-2-propil)-2-propinil-amin hidroklorid ya da N-propinil-metamfetamin olarak geçer.

Deprenil tiraminin etkisini inhibe eder ve bu nedenle günümüzde diyetsel kısıtlamalar konmadan uygulanabilinen en güvenli MAO inhibitörüdür (36).

MAO-A insan organizmasında en yüksek seviyelerini intestinal ortamda oluşturur. MAO-B ise serebral ortamda yüksek konsantrasyonlara ulaşır ve

dopaminin katabolize edilmesinde önemli rol oynar. Bu nedenle, MAO-B enzimi üzerinde selektif bir etkiye sahip olan ajanlar, serebral dokulardaki dopamin yıkımını belirli oranlarda önlerler ve böylelikle de dopaminin beyinde yeterli düzeyde bulunmasını sağlarlar. Deprenil (Selejilin) de aynı tesir mekanizması ile yani beyin dokusundaki dopaminin katabolizmasını inhibe ederek Parkinson tedavisinde önemli bir destek sağlar (39).

Deprenil 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. Deprenilin neredeyse tamamı L-metamfetamin ve N-dimetilselejiline metabolize olur. Atılımı ya bu metabolitleri ya da değişmemiş L-selejilin şeklindedir (39).

L-deprenil enzim ile öncelikle 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. In vivo olarak da L-deprenilin etkilerinden kurtuluş, yeni enzim sentezine gereksinim gösterir. Enzimin MAO olması durumunda enzim dönüşümü organdan organa değişir ve enzim yarı ömrü sıçan karaciğerinde ve beyinde sırasıyla 2.5-3.5 gün ve 8-13 gündür (78,79).

Yapılan çalışmalarda L-deprenilin artan dozlarda ve uygulama sayısında MAO-B'e olan inhibitör etkisini kaybettiğini göstermiştir. L-Deprenil MAO-B'nin yanı sıra nöronal amin alınımasını inhibe eder. Deprenil tarafından indüklenen MAO B inhibisyonu sonucu Parkinson Hastalığı'nın erken döneminde dopamin düzeylerinde bir artış ve nörotoksik serbest radikallerin inhibisyonuna bağlı olarak nöroprotektif bir etki izlenmiştir. L-Deprenil'in temel etkisinin dopamin deaminasyonunu inhibe etmesinden kaynaklandığı düşünülse de L-Deprenil'in

terapötik etkilerinin ajanın metabolik ürünlerine -amfetamin ve metamfetamin-bağlı olduğunu ileri süren çalışmalar da vardır (47). Ayrıca uzun süreli deprenil kullanımı substantia nigra'da bulunan nöron hücrelerindeki nöromelanin granüllerinde yaşa bağımlı karakteristik morfolojik değişiklikleri de engeller (36). Son yıllarda substantia nigra pars compacta nöronlarındaki ölümlerin L-deprenil tarafından yavaşlatıldığı bildirilmiş ve ilacın bu etkisinin MAO B inhibisyonundan bağımsız olabileceği açıklanmıştır. Günlük deprenil enjeksiyonlarının (2.0 mg/kg) 3 haftalık bir süre ile verilmesi sıçan beyin striatum bölgesinde 10 kata kadar varan bir süperoksid dismütaz aktivite artışına yol açar. Aynı şekilde katalaz enziminde de kontrollere göre 1.7 kez bir artış izlenir (20, 36, 77). Tüm bunların sonucunda uzun süreli deprenil uygulanan sıçanların daha uzun yaşadığı bildirilmiştir (36).

PARJİLİN

Parjilin flavin kofaktörü ile stabil bir bileşik oluşturarak spesifik ve stoikiometrik olarak aktif MAO'ya bağlanan ve enzimin inhibisyonuna neden olan bir ajandır (8). Parjilin MAO B'ye selektif olarak irreversibl bir etki gösterir (39).

Parjilin ile MAO'nun inhibisyonu sonucu beyinde hidrojen peroksid üretiminde azalma ve sinir sistemi oksijen toksisitesinde düşüş görülmüş ve bu nedenle MAO aktivitesinin hidrojen peroksid üretiminde artışa, MAO inhibisyonunun ise bu artışı azaltacağına ve histoloji düzeyinde koruyucu etkilerde bulunabileceğine ait bulgular elde edilmiştir (68).

ARAÇ-GEREÇ ve YÖNTEMLER

ARAÇ-GEREÇ

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 ve kuartz küvet-Hellma*
12. Florometrik kuartz küvet
13. Otomatik pipetler-Gillson*
14. Cam pipetler-Assistant*

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

*Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

**Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı

KİMYASAL MADDELER

1. Doku homojenizasyonu için kullanılan maddeler

- Sakkaroz (Merck)
- EDTA (Sigma)
- Disodyum hidrojen fosfat (Merck)
- Potasyum dihidrojen fosfat (Merck)

2. Doku homojenizasyonu için kullanılan çözeltiler

2.1. MAO tayini için doku homojenizasyon çözeltisi

0.4 M sakkaroz ve 0.0001 M EDTA

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

2.2. SOD ve katalaz tayini için doku homojenizasyon çözeltisi

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.

3. Parametrelerin tayini için kullanılan maddeler

- Kinüramin 2 Hbr (Sigma)
- Dipotasyum hidrojen fosfat (Merck)
- Potasyum dihidrojen fosfat (Merck)
- 4 Hidroksikinolin (HQ) (Merck)
- Sodyum hidroksit (Merck)
- Triklor asetik asit (Merck)
- Tiobarbitürik asit (Sigma)
- Kloroform (Merck)
- Metanol (Fluka)
- Sikloheksan (Riedel-de Haen)

- Na₂CO₃ anhidr (Merck)
- NaHCO₃ (Merck)
- Hidrojen peroksit (Merck)
- Epinefrin (Sigma)
- Sodyum - Potasyum tartarat, 4 H₂O (Merck)
- Bakır sülfat • 5 H₂O (Merck)
- Folin chioaltea
 - Sodyum molibdat • 2H₂O (Merck)
 - Fosforik asit (% 85) (Merck)
 - HCl (% 38) (Merck)
 - Lityum sülfat (Merck)
 - Brom (Merck)
 - Sodyum klorür (Riedel-de Haen)

4. Parametrelerin tayini için kullanılan çözeltiler

4.1. MAO tayini için kullanılan çözeltiler

-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

KH₂PO₄ 17.01 g tartılıp 250 ml. distile suda çözülür.

K₂HPO₄ 21.7725 g tartılıp 250 ml. distile suda çözülür.

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

- 4-Hidroksikinolin trihidrat (4 HQ) çözeltisi

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

- 4N NaOH çözeltisi

160 g NaOH tartılarak 1000 ml. distile suda çözülür.

4.2. Malondialdehid tayini için kullanılan çözeltiler

-% 0.9 Serum fizyolojik

9 gr. NaCl tartılıp 1000 cc suda çözülür.

-% 5 Triklor asetik asit (TCA) çözeltisi

5 cc. TCA alınıp 100 cc suda çözülür.

-% 0.67 Tiobarbitürik asit (TBA) çözeltisi

0.67 gr. tiobarbitürik asit 100 cc distile suda çözülür.

4.3. Dien konjugatları tayini için kullanılan çözeltiler

-Fosfat tampon (0.5 M) , pH = 7.4

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 ve metanol çözeltisi

2/1 oranda kloroform / metanol karışımı hazırlanır.

4.4. SOD tayini için kullanılan çözeltiler

-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.

4.5. Katalaz tayini için kullanılan çözeltiler

- H_2O_2 , 30 mM

Taze olarak hazırlanır. 0.34 ml % 30'luk H_2O_2 , fosfat tampon (pH = 7.0) ile 100 ml'ye tamamlanır.

4.6. Protein tayini için kullanılan çözeltiler

- % 2 Sodyum karbonat çözeltisi

0,1 N sodyum hidroksit içinde hazırlanır.

- Taze hazırlanmış alkali bakır çözeltisi

100 ml sodyum karbonat çözeltisine 1 ml. sodyum potasyum tartarat çözeltisi (% 2.7 sodyum potasyum tartarat • 4 H₂O) ve ardından 1 ml. bakır sülfat (% 1 CuSO₄ • 5 H₂O) 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 hidroksid ile titre edilerek normalitesi belirlenir. Normalitesi 1 olacak şekilde 1 N HCl ile seyreltilir.

5. Standartlar

5.1. MAO standardı

4 HQ 10⁻⁵ M, Merck

5.2. Süperoksit dismutaz standardı

Bovin eritrosit SOD, 3000 Ü, Sigma

5.3. Protein standardı

Bovin Serum Albümin, Sigma

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

6. İlaçlar

6.1. Deprenil

L-selejilin (Koçak).

6.2. Pargyline

[(N-methyl-N-propargylbenzylamine;N-methyl-N-2- propynylbenzylamine) Hydrochloride C₁₁H₁₃N.HCl] Sigma'dan temin edilmiştir.

ÇALIŞMA MATERYALLERİ

Bu çalışmada Swiss-Albino türü erkek sıçanlar kullanılarak 8 çalışma grubu oluşturulmuştur.

1. Grup: GENÇ SIÇAN GRUBU

(n=10)

2-3 aylık Swiss-Albino türü erkek sıçanlardan oluşturulmuştur. Sıçanlar, standard ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat karanlık) ve ısı koşullarında (ortalama 20° C) standard diet (pelet yem) ile beslenmişlerdir.

2. Grup: YAŞLI SIÇAN GRUBU

(n=10)

16-18 aylık Swiss-Albino türü erkek sıçanlardan oluşturulmuştur. Sıçanlar, standard ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat karanlık) ve ısı koşullarında (ortalama 20° C) standard diet (pelet yem) ile beslenmişlerdir.

3. Grup: GENÇ KONTROL GRUBU

(n=10)

2-3 aylık Swiss-Albino türü erkek sıçanlardan oluşturulmuştur. Standard ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat karanlık) ve ısı koşullarında (ortalama 20° C) standard diet (pelet yem) ile beslenen sıçanlara 2.5 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. Sstandard ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat karanlık) ve ısı koşullarında (ortalama 20° C) standard diet (pelet yem) ile beslenen sıçanlara 2.5 cc serum fizyolojik bir

defada intraperitoneal olarak verilmiş ve 1.5 saat sonra dekapitasyon uygulanmıştır.

5. Grup: DEPRENİL UYGULANAN GENÇ SIÇAN GRUBU

(n=10)

2-3 aylık Swiss-Albino türü erkek sıçanlardan oluşturulmuştur. Standard ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat karanlık) ve ısı koşullarında (ortalama 20° C) standard diet (pelet yem) ile beslenen 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. Standard ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat karanlık) ve ısı koşullarında (ortalama 20° C) standard diet (pelet yem) ile beslenen sıçanlara bir kez 25 mg/kg deprenil 2.5 cc serum fizyolojik içinde çözülerek intraperitoneal olarak verilmiş ve 1.5 saat sonra dekapitasyon uygulanmıştır.

7. Grup: PARJİLİN UYGULANAN GENÇ SIÇAN GRUBU

(n=10)

2-3 aylık Swiss-Albino türü erkek sıçanlardan oluşturulmuştur. Standard ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat karanlık) ve ısı koşullarında (ortalama 20° C) standard diet (pelet yem) ile beslenen sıçanlara bir kez 25 mg/kg parjilin 2.5 cc serum fizyolojik içinde çözülerek intraperitoneal olarak verilmiş ve 1.5 saat sonra dekapitasyon uygulanmıştır.

6. Grup: PARJİLİN UYGULANAN YAŞLI SIÇAN GRUBU

(n=10)

16-18 aylık Swiss-Albino türü erkek sıçanlardan oluşturulmuştur. Standard ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat karanlık) ve ısı koşullarında (ortalama 20° C) standard diet (pelet yem) ile beslenen sıçanlara bir kez 25 mg/kg parjilin 2.5 cc

serum fizyolojik içinde çözülerek intraperitoneal olarak verilmiş ve 1.5 saat sonra dekapitasyon uygulanmıştır.

MAO inhibitörleri ile oluşan inhibisyon derecesini ve maksimum inhibisyondaki değişiklikleri saptamak amacıyla inhibitörler verildikten sonra çeşitli saatlerde dekapitasyon uygulanarak en uygun süre belirlenmeye çalışılmıştır. Bu süreler denenirken daha önce yayınlanan çalışmalardan elde edilen veriler ve MAO inhibitörlerinin klinik uygulamada antidepresan etkinliklerini gösterdikleri süreler gözönüne alınmıştır. Bugüne kadar çeşitli deney hayvanlarında yapılan çalışmalar MAO inhibisyonunun, inhibitörün verilmesinin ardından ilk birkaç saat içinde gerçekleştiğini ve ardından monoamin substratlarında belirli bir artış görüldüğünü göstermiştir (23). Klinik uygulamalar ise MAO inhibitörlerinin antidepresan etkilerinin ortaya çıkması için yaklaşık 2 haftalık bir süreye gereksinim olduğunu belirtmektedir (39). Bu nedenle ajanların akut olarak i.p. uygulanmalarının ardından belirli saatlerde dekapitasyon uygulanmış ve kalp MAO düzeylerindeki inhibisyon yüzdeleri elde edilerek (Tablo 4), deney süresince MAO inhibisyonunun en etkili olduğu 1.5 saatin ardından dekapitasyonun uygulanmasına karar verilmiştir.

	Deprenil	Parjilin
1.5 saat (n=3)	% 61,4	% 67,2
24 saat (n=3)	% 43,8	% 47,9
1 hafta (n=3)	% 8	% 12

Tablo 4. Deprenil ve Parjilinin değişik saatlerde oluşturdukları inhibisyon yüzdeleri

ÇALIŞMADA KULLANILAN YÖNTEMLER

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

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

1. Dokuların disseksiyonu ve homojenizasyonu

Sıçanlar dekapite edildikten sonra kalp doku örnekleri çıkarılarak serum fizyolojik ile yıkanmış ve buz üzerine alınarak laboratuvara ulaştırılmıştır. Laboratuvara ulaştırılan örnekler buz üzerinde tutularak hassas terazide tartılmış ve her bir doku üç kısma bölünmüştür. Bir kısım MAO tayini için EDTA-Sakkaroz çözeltisi 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) (1/10, w/v) ile, 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 homojenat 1500 g x 10 dakika santrifüj edildikten sonra MAO, malondialdehid, dien konjugatları, SOD ve katalaz tayinleri elde edilen üst fazlardan sırası ile belirlenmiştir. Tüm santrifüj işlemleri +4°C'de gerçekleştirilmiştir. Analizler aynı gün içinde uygulanmıştır.

2. Monoamin oksidaz tayini

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

MAO enzim aktivitesinin saptanması için hazırlanan homojenattan 0.1 ml alınarak üzerine 2.3 ml distile su konulur. Daha sonra sırasıyla 0.3 ml fosfat tampon ve 0.3 ml kinüramin 2 HBr çözeltisi eklenerek 30 dk su banyosunda (37°C) inkübasyona bırakılır. 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 318 nm eksitasyon ve 385 nm emisyon dalga boyunda Aminco Bowman spektrofotometrede okunur. Standart seri ile her denemede hazırlanan standart grafikten 4 HQ miktarı nanomol olarak hesaplanır. Bulunan miktar mg protein başına bölünerek spesifik aktivite saptanır (nmol / mg prot).

3. Malondialdehid tayini

MDA tayini için kullanılan yöntemin prensibi, homojenatın triklor asetik asitle deproteinize edilmesinin ardından örnekte bulunan MDA'nın TBA ile oluşturduğu TBA-MDA kompleksinin kırmızı renginin spektrofotometrik ölçümüne dayanır (56).

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 ve ekstinksiyon koeffisiyenti kullanılarak hesaplama yapılır.

Hesaplama:

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

Ekstinksiyon koeffisiyenti: 153 000/Mol/cm

4. Dien konjugatları tayini

Dien konjugatlarının tayini için fosfat tampon ile dokunun % 10'luk homojenatı hazırlanır (1gr. doku 10 ml fosfat tampon ile homojenize edilir). Elde edilen homojenatın 0.5 ml'sine 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 spektrofotometrede 233 nm'de sikloheksan körüne karşı okunur ve protein başına miktar belirlenir (4).

Hesaplama: nmol hidroperoksid / mg protein

Ekstinksiyon koeffisiyenti: $2.52 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$

5. Süperoksid 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 (46, 70).

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 ve doku proteinine göre hesaplanır. 2,2 ml. tampon solüsyon ve epinefrin kullanılarak hazırlanan kör için de aynı işlemler uygulanır.

6. 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, 70).

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;

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

(dilüsyon) = Ü/ml

Sonuçlar mg protein başına verilir.

6. Protein tayini

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

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

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bu çalışmada bulguların istatistiksel değerlendirilmesinde MICROSTA ve ANOVA istatistik programlarından yararlanılmıştır. Çoklu karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi ve ikili karşılaştırmalar için Student t testi kullanılmıştır. Ayrıca tüm değerler arasındaki korelasyonlar, iftleřtirilmiř düzenli korelasyon testi ile araştırılmıştır.



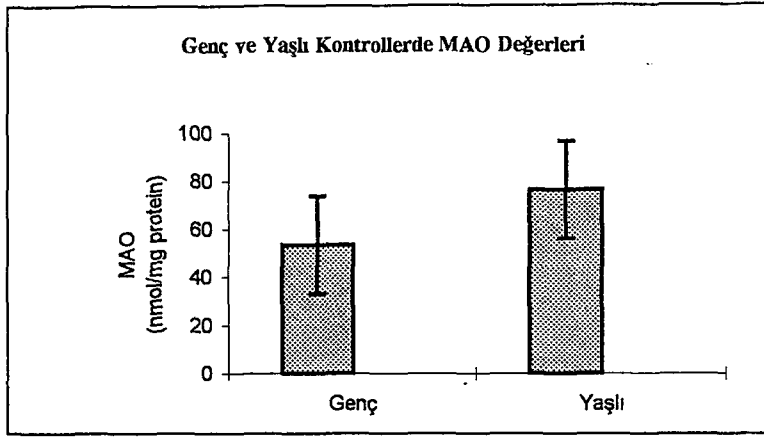
BULGULAR

Genç ve yaşlı sıçan kalplerinde MAO enzim düzeylerinin, MAO enzim düzeyleri ile kıyaslamalı lipid peroksidasyon göstergelerinin (MDA ve dien konjugatları) ve antioksidan enzim (SOD, katalaz) düzeylerinin, ayrıca monoamin oksidaz inhibitörü olan iki ajanın (deprenil ve parjilin) akut uygulanmasının bu parametrelere etkilerinin incelendiği bu çalışmada elde edilen sonuçlar Tablo 1, 2 ve 3'de özetlenmiştir.

Gruplar			MAO	Std.	p
			(nmol/mg protein)	Dev.	
Fizyolojik Kontrol	Genç	n=10	53.35	20.35	p<0.005
	Yaşlı	n=10	76.19	12.93	
Plasebo Kontrol	Genç	n=10	55.72	18.56	p<0.005
	Yaşlı	n=10	72.96	13.05	
Deprenil	Genç	n=10	21.54	4.94	p<0.0005
	Yaşlı	n=10	21.61	3.86	p<0.0001
Parjilin	Genç	n=10	18.12	6.35	p<0.0001
	Yaşlı	n=10	23.31	4.96	p<0.00001

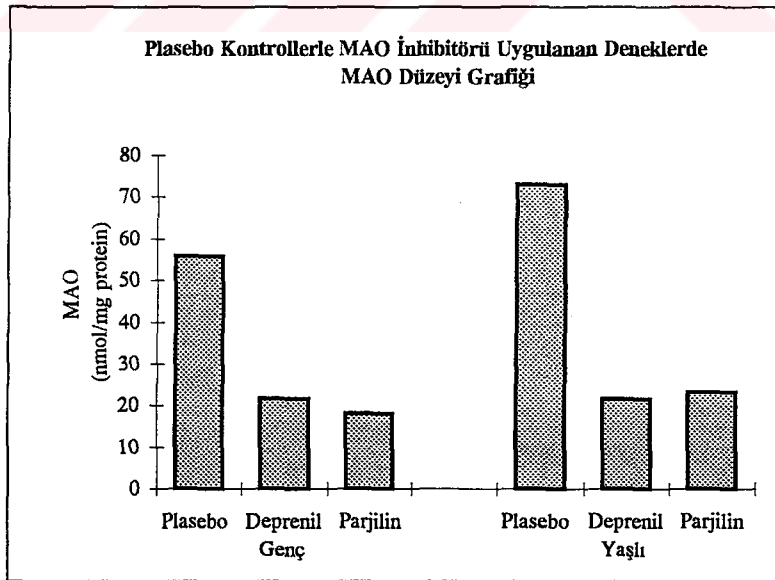
Tablo 1. Fizyolojik kontrol, plasebo kontrol, deprenil ve parjilin uygulanan gruplara ait MAO değerleri

Gruplara ait MAO aktivitesi ile ilgili bulgular irdelenecek olursa; genç ve yaşlı sıçanlarda kalp MAO aktiviteleri düzeylerinin gösterildiği Şekil 1'de de görüldüğü gibi yaşlı sıçanlarda bu değerler anlamlı derecede yüksektir (p<0.005).



Şekil 1. Genç ve yaşlı gruplara ait kontrollerde MAO değerleri

Deprenil ve parjilin uygulanan grupların MAO değerlerine ait bulgular ise Şekil 2'de kıyaslamalı olarak gösterilmiştir. Akut deprenil uygulandıktan sonra hem gençlerde, hem de yaşlılarda MAO aktivitesinin anlamlı bir şekilde azaldığı izlenmiştir ($p < 0.0005$, $p < 0.0001$). Diğer bir MAO inhibitörü olan parjilin akut uygulamasının ardından benzer şekilde hem gençlerde, hem de yaşlılarda MAO aktivitesinin anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür ($p < 0.0001$, $p < 0.00001$). Bu sonuçlar göze alındığında parjilin yaşlı kalp dokularında oluşturduğu MAO inhibisyonunun gençlere göre daha fazla olduğu görülmektedir. Ancak MAO inhibisyonu açısından deprenil ve parjilin arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmemiştir.



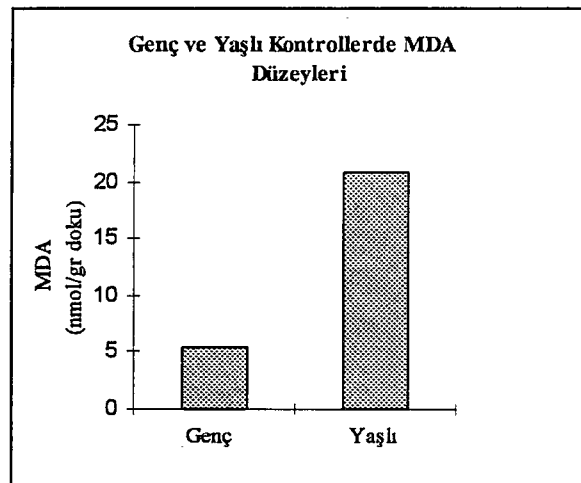
Şekil 2. Plasebo kontrollerle MAO inhibitörü uygulanan genç ve yaşlı sıçanlarda MAO değerleri

Tüm gruplara ait lipid peroksidasyon göstergeleri (MDA ve dien konjugatları) düzeyleri ise Tablo 2'de gösterilmiştir.

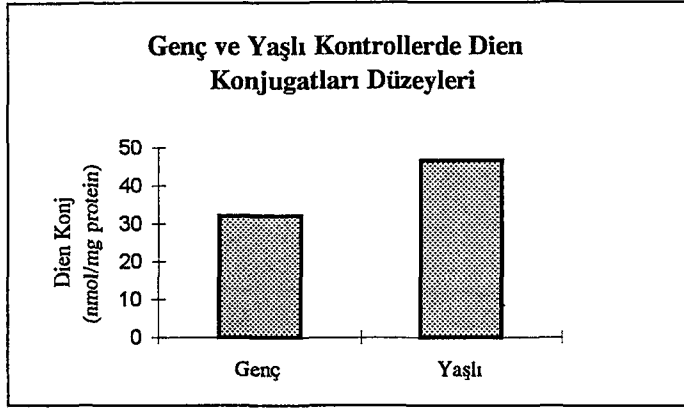
Gruplar			MDA (nmol/g doku)	Std Dev	Dien Konj. (nmol/mg protein)	Std Dev
Fizyolojik Kontrol	Genç	n=10	5.35	1.53	31.98	4.20
	Yaşlı	n=10	20.72	6.92	46.56	17.93
Plasebo Kontrol	Genç	n=10	5.17	1.65	30.96	5.46
	Yaşlı	n=10	18.97	5.43	44.82	6.53
Deprenil	Genç	n=10	3.72	0.57	25.19	5.70
	Yaşlı	n=10	11.86	3.74	25.47	6.74
Parjilin	Genç	n=10	3.65	0.87	24.97	2.47
	Yaşlı	n=10	10.32	2.68	25.96	6.97

Tablo 2. Fizyolojik kontrol, plasebo kontrol, deprenil ve parjilin uygulanan gruplara ait lipid peroksidasyon (MDA ve dien konjugatları) değerleri

Genç ve yaşlı kontrollere ait MDA ve dien konjugatları düzeyleri Şekil 3 ve 4'te gösterilmiştir. Her iki parametrede de yaşlı sıçanlarda anlamlı bir yükselik izlenmektedir ($p<0.0001$ ve $p<0.005$).

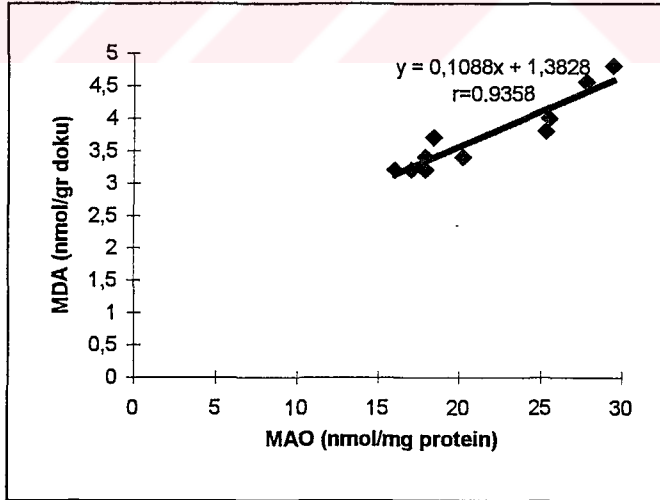


Şekil 3. Genç ve yaşlı kontrollerde MDA değerleri

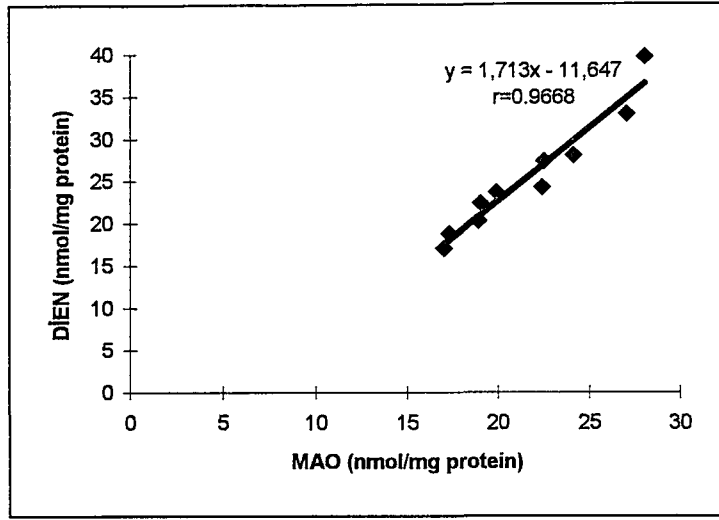


Şekil 4. Genç ve yaşlı kontrollerde dien konjugatları değerleri

Genç ve yaşlı kontrollerde saptanan MAO değerlerinin MDA ve dien konjugatları ile (+) bir korelasyon gösterdiği saptanmıştır ($r=0.9358$ ve $r=0.9668$). Bu korelasyonlar Şekil 5 ve 6'da da izlenmektedir.

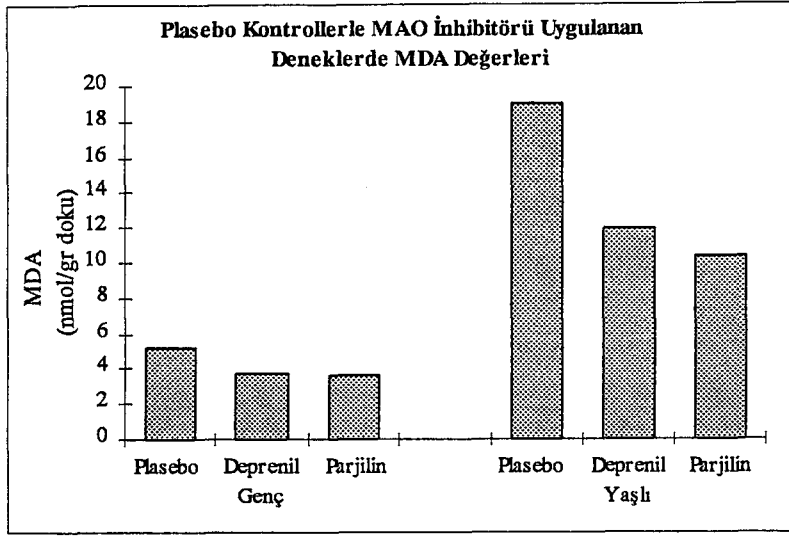


Şekil 5. MAO ve MDA arasındaki (+) korelasyon

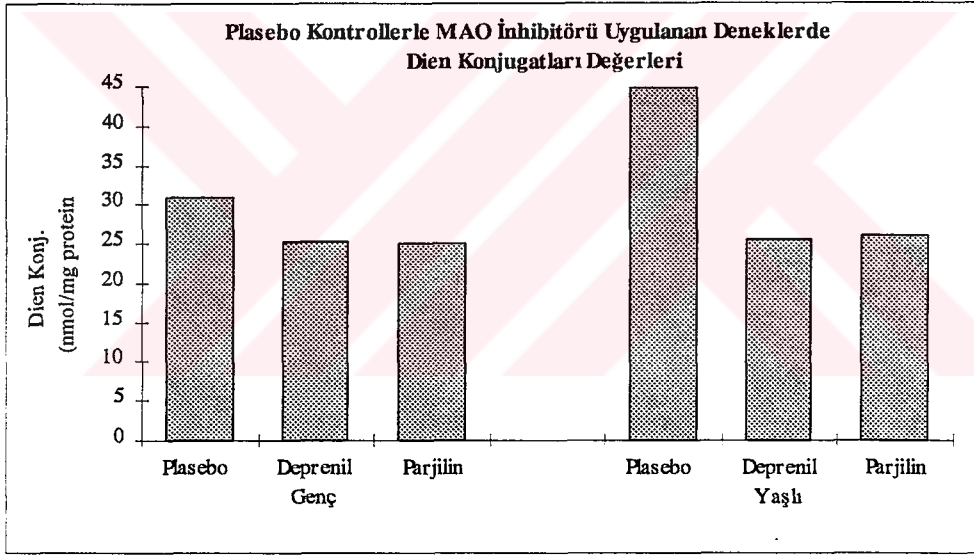


Şekil 6. MAO ve dien konjugatları arasındaki (+) korelasyon

MAO inhibitörü uygulanan gruplarda MDA ve dien konjugatlarına ait değerler plasebo kontrollerle kıyaslamalı olarak Şekil 7 ve 8'de gösterilmiştir. Deprenil ve parjilin uygulamasının ardından hem genç, hem de yaşlı sıçanlarda lipid peroksidasyon göstergelerinde anlamlı düşüşler izlenmiştir. Deprenil uygulanan genç ve yaşlı grupta MDA değerleri plasebo kontrollere göre anlamlı derecede daha düşüktür ($p < 0.005$). Aynı gruplarda dien konjugatları gözönüne alındığında ise benzer p değerleri saptanmıştır ($p < 0.005$). Parjilin uygulanan gruplarda ise MDA değerleri plasebo kontrollere göre yaşlı grupta gençlere göre daha anlamlı olmak üzere düşüktür ($p < 0.005$ ve $p < 0.0005$). Aynı grupta dien konjugatları gözönüne alındığında ise MDA değerlerinin tersine gençlerde daha anlamlı olan bir düşüş izlenmiştir ($p < 0.0005$ ve $p < 0.005$).

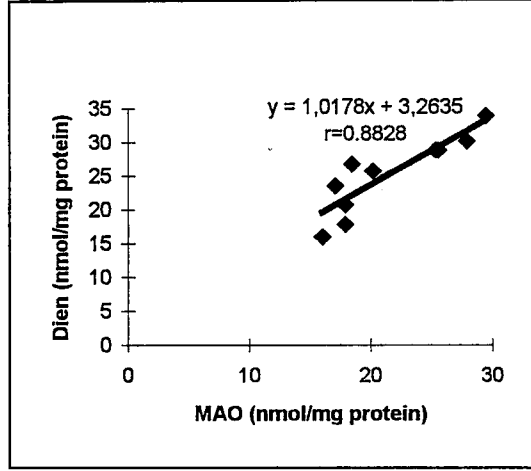


Şekil 7. Plasebo kontrollerle MAO inhibitörü uygulanan gruplarda MDA değerleri

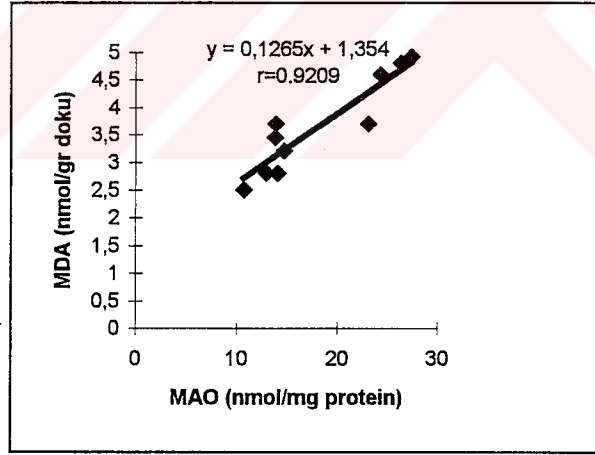


Şekil 8. Plasebo kontroller ve MAO inhibitörü uygulanan gruplarda dien konjugatları değerleri

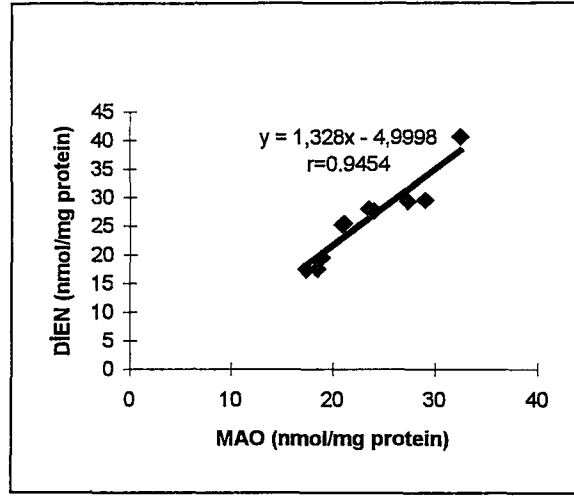
MAO inhibitörlerinin uygulanmalarının ardından MDA ve dien konjugatlarında görülen bu anlamlı düşüşler MAO enziminde görülen düşüşlerle (+) bir korelasyon göstermektedir. Bu korelasyonlardan bazı örnekler Şekil 9, 10 ve 11'de gösterilmiştir.



Şekil 9. Deprenil uygulanan genç sıçanlarda MAO ve dien konjugatları arası korelasyon



Şekil 10. Parjilin uygulanan genç sıçanlarda MAO ve MDA arası korelasyon



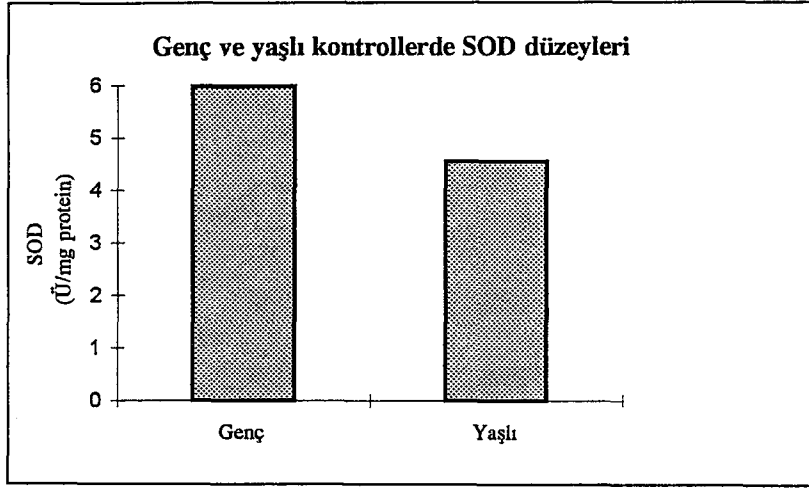
Şekil 11. Parjilin uygulanan yaşlı sıçanlarda MAO ve dien konjugatları arasında (+) korelasyon

Çalışmada incelenen grupların kalp dokusu antioksidan savunma enzimlerinden SOD ve katalaza ait değerler Tablo 3'te gösterilmiştir.

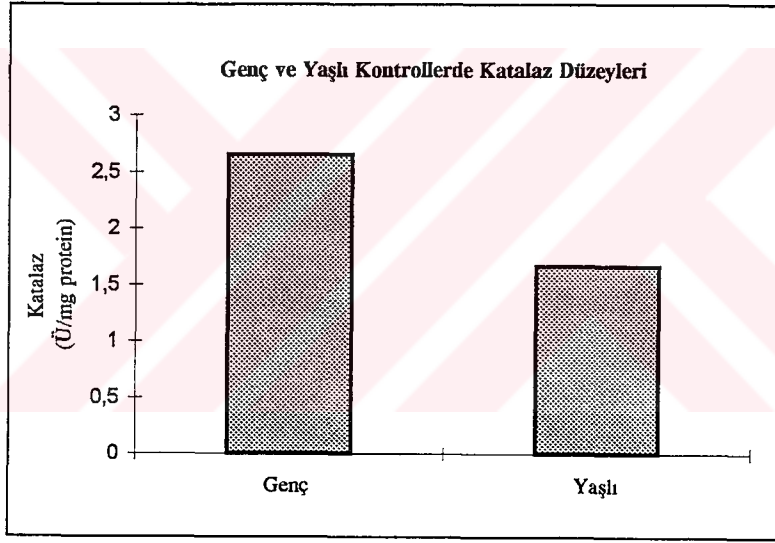
Genç ve yaşlı fizyolojik kontrol gruplarında SOD ve katalaz düzeylerine ait değerler Şekil 12 ve 13'de gösterilmiştir. Hem SOD, hem de katalaz değerlerinde yaşlı grupta genç gruba göre anlamlı bir düşüş saptanmıştır ($p < 0.05$).

Gruplar			SOD (Ü/mg.protein)	Std Dev	Katalaz (Ü/mg.protein)	Std Dev
Fizyolojik Kontrol	Genç	n=10	5.97	1.49	2.65	1.54
	Yaşlı	n=10	4.54	0.97	1.66	0.88
Plasebo Kontrol	Genç	n=10	5.83	1.23	2.74	1.43
	Yaşlı	n=10	4.75	1.03	1.57	0.45
Deprenil	Genç	n=10	6.89	0.99	2.16	0.71
	Yaşlı	n=10	5.20	1.09	2.26	1.01
Parjilin	Genç	n=10	6.27	1.72	2.50	0.91
	Yaşlı	n=10	5.42	1.47	2.06	0.54

Tablo 3. Fizyolojik kontrol, plasebo kontrol, deprenil ve parjilin uygulanan gruplara ait antioksidan savunma enzimleri (SOD ve katalaz) değerleri

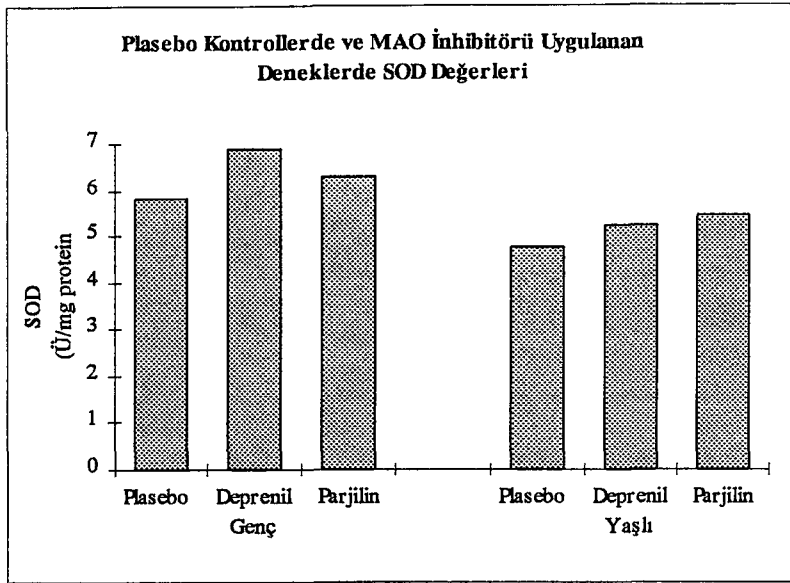


Şekil 12. Genç ve yaşlı kontrol gruplarında SOD düzeyleri

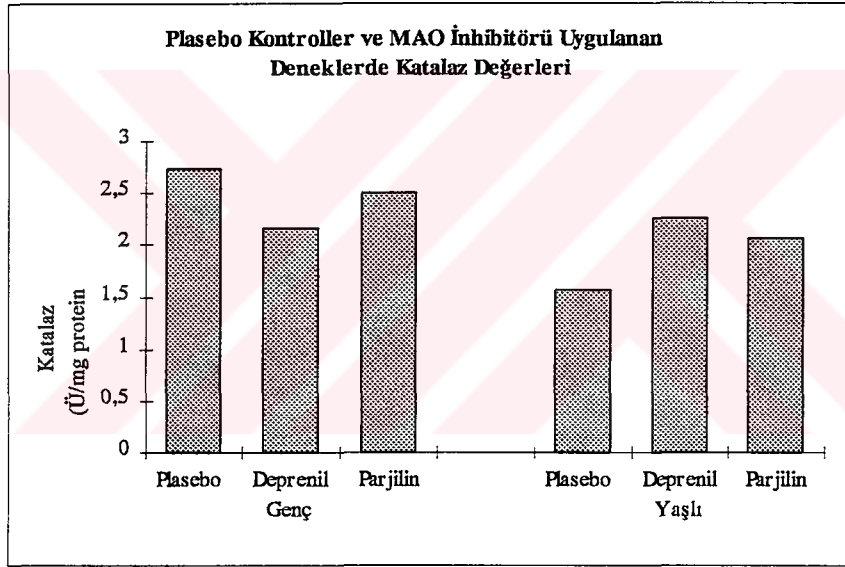


Şekil 13. Genç ve yaşlı kontrol gruplarında katalaz düzeyleri

MAO inhibitörü uygulanan gruplarda SOD ve katalaza ait değerler plasebo kontrollerle kıyaslamalı olarak Şekil 14 ve 15'de gösterilmiştir. Deprenil ve parjilin uygulamasının ardından hem genç, hem de yaşlı sıçanlarda antioksidan savunma sisteminde hafif artışlar saptanmasına karşın bunlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değer bulunmamıştır.



Şekil 14. Plasebo kontroller ve MAO inhibitörü uygulanan gruplarda SOD değerleri



Şekil 15. Plasebo kontroller ve MAO inhibitörü uygulanan gruplarda katalaz değerleri

Sonuçlarımızı özetleyecek olursak; genç ve yaşlı kontroller arasında MAO ve lipid peroksidasyon göstergeleri açısından ileri yaşlarda anlamlı derecede olan artışlar izlenmiştir. MAO düzeylerindeki artışların MDA ve dien düzeyleriyle de korele olması dikkat çekicidir. Plasebo kontroller ve deprenil ile parjilin uygulanan gruplar arasında ise hem genç hem de yaşlılarda ilaç uygulanan grupların MAO değerlerinde anlamlı düşüşler saptanmıştır. Bu düşüşler yaşlı grupta daha belirgindir. Ayrıca yine bu düşüşler ile paralel olarak MDA ve dien

düzeylelerinde de düşüşler izlenmiştir. Hem MAO, hem de MDA ve dien konjugatlarında oluşan bu olumlu değışikliklerde uygulanan iki ajanın etkinliği ağıısından anlamlı bir fark izlenmemiştir. Antioksidan enzimlere bakıldığında genç ve yaşlı kontroller arasında yaşlı grupta anlamlı bir düşüş vardır. Deprenil ve parjilin uygulamasının ardından bu enzimlerin aktivitelerinde anlamlı farklılıklar izlenmemiştir.



TARTIŞMA

Normal koşullar altında tüm aerobik hücreler, solunum, fagositoz, araşidonik asid metabolizması ve yaşlanma sırasında az miktarda serbest oksijen radikalleri oluştururlar. Bu radikallerin normal organizmada antioksidan savunma sistemleri tarafından hızla yok edilmelerine karşın, oksidan stres - antioksidan savunma arasındaki dengenin oksidan stres lehine bozulduğu durumlarda ortamda bulunan serbest oksijen radikallerinin; lipidler, amino asidler, nükleik asidler gibi önemli bileşenlerle etkileşerek hücre, doku ve sonuçta da organizma düzeyinde hasara neden oldukları artık bilinmektedir (9, 11, 16, 52, 57, 65).

Organizmada artmış olan serbest oksijen radikalleri en önemli etkilerinden birini poliansatüre yağ asidlerini perokside ederek gösterirler. Peroksidasyon tepkimeleri sırasında oluşan lipid peroksidasyon ürünlerinin ateroskleroz ve ilişkili olarak koroner kalp hastalıkları, dejeneratif hastalıklar, kanser gibi süreçlerin yanı sıra fizyolojik yaşlanmada da etkileri olduğu artık kesinlik kazanmıştır (15, 24, 43, 50). İlerleyen yaşla beraber işlevlerinde önemli değişimler olan kalp, organizmanın yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmesi açısından en önemli organıdır. Bu organda yaşla beraber gelişen etkileşimleri ve bunların organizmaya yansımalarını incelemek önemli olsa da, bu etkileşimlerden olumsuz olan koşulları anlamaya ve iyileştirmeye yönelik çalışmalar hiç şüphesiz ki daha da anlamlıdır. İlerleyen yaşla beraber kalp dokusunda oksidan stresin arttığı ve bunun kaynakları arasında kateşolamin metabolizmasının kilit enzimi olan MAO'nun önemli yer aldığı savından yola çıkarak geliştirdiğimiz ve yürürlüğe koyduğumuz bu çalışmada, öncelikle genç ve yaşlı sıçanların kalp dokularında MAO, oksidan stres sonucu oluşan lipid peroksidasyon göstergeleri (malondialdehid, konjuge dien) ve antioksidan savunma enzimleri (SOD, katalaz) araştırılarak bu parametreler arasındaki ilişkiler irdelenmiştir.

Kateşolamin metabolizması sırasında yan ürün olarak serbest oksijen radikalleri üreten MAO enziminin inhibisyonu sonucu radikal oluşumunu kontrol altına alabilme yolunda gelişebilecek önemli sonuçlar ise çalışmanın ikinci aşamasını

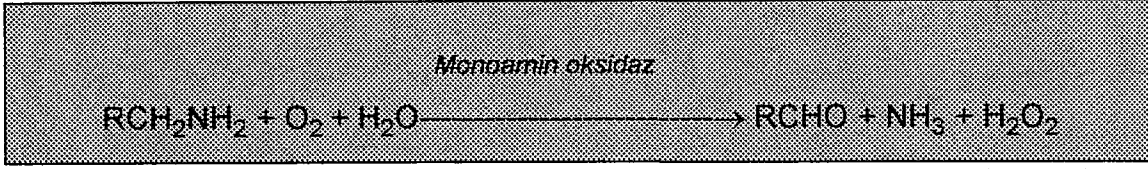
oluşturmuştur. Bu sonuçların izlenebilmesi için iki değişik MAO inhibitörü (deprenil ve parjilin) kullanılarak lipid peroksidasyonu ve antioksidan sistem yönündeki etkileşimler izlenmiştir. Çalışmamızın sonunda deprenil ve parjilinin uygulanımı ile oksidan stres göstergeleri (lipid peroksidasyon ürünleri) ve antioksidan savunmada izlenen değişiklikler olumlu olup, fizyolojik yaşlanma prosesinde serbest oksijen radikallerine bağlı oluşan değişikliklerin MAO inhibitörleri ile kısmen de olsa kontrol altına alınabileceği yolunda ümit verici sonuçlara ulaşılmıştır.

Serbest oksijen radikallerinin organizmadaki önemi göz önüne alındığında bu radikallerin daha etkin bir şekilde anlaşılmasının gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Oksijen atomunda atom numarası yani elektron sayısı 8'dir. Moleküler oksijen dış orbitalinde paylaşılmamış iki elektron içerir. Oksijen molekülündeki aynı yönde dönen iki elektrona sahip 2p orbitalindeki elektron bir orbitali bırakıp diğerine geçtiğinde ya da farklı orbitallerde farklı yönde döndüğünde "singlet oksijen" oluşur. Orbitalden birine ters dönüşlü bir elektron ya da ikisine ters dönüşlü iki elektron daha gelirse "radikal" elde edilir. Radikaller eşleşmemiş elektronları nedeniyle çok reaktif olan ve bu elektronlarını eşleştirmeye yönelik olarak bir dizi tepkimeye giren moleküllerdir (9, 51).

Organizmada normal solunum işlemi sırasında mitokondride açığa çıkan oksijen radikallerinin yanı sıra bir dizi spesifik substratın metabolizasyonu sırasında da radikal oluşumu olduğu artık bilinmektedir. Bunlar arasında son yıllarda üzerinde oldukça fazla sayıda çalışma yapılmış olan MAO (EC 1.4.3.4) enzimi de sayılabilir (23, 43, 70).

MAO; biyojen aminlerden özellikle kateşolaminlerin ve serotoninin metabolizmasında yer alan enzimlerden biri olup biyolojik psikiyatrideki önemi nedeni ile günümüzde yoğun ilgi çekmektedir. MAO monoamin nörotransmitterleri ya da putatif nörotransmitterleri inaktive eder; 5-hidroksitriptamin (5 HT, serotonin), noradrenalin (NA), dopamin (DA), teletetilhistamin (beyinde histaminin ilk metaboliti), feniletilamin, triptamin ya da tiramin gibi beyinde eser

miktarlarda bulunan bazı endojen aminler ile diyetsetel ya da ilaç formunda organizmaya alınan monoaminleri metabolize eder (23). Bu enzim



reaksiyonunu katalizler ve organizmada hidrojen peroksit üretimine katkıda bulunur.

MAO prostetik grup olarak FAD taşır ve mitokondride lokalizedir. Enzim aktivitesi normalde sisteinil tioeter aracılığı ile apoenzime kovalan olarak bağı olan bu FAD bölümünün redüksiyonuna bağıdır (8).

Vücutta hem santral sinir sisteminde, hem de periferel dokularda yaygın bir enzim olarak bulunan MAO substrat spesifisitesine ve inhibisyon özelliklerine göre iki gruba ayrılır (6, 23, 81):

- ◆ 5-HT ve noradrenaline karşı aktivitesi olan ve klorjilin tarafından inhibe edilen A formu
- ◆ Dopamin, benzilamin ile β-feniletülenamine karşı aktivitesi olan ve klorjilin tarafından inhibisyona göreceli olarak dirençli iken deprenil tarafından inhibe edilen B formu

Bu formlar monklonal antikorlar kullanılarak immuno histokimyasal çalışmalarla ve moleküler genetik çalışmalarla da gösterilmiştir (47).

Dokuda MAO enziminin tayini yönünde günümüze dek oldukça değışik yöntemler kullanılagelmiştir. MAO enzim aktivitesi ve kinetiğı bu yöntemlerde spektrofotometri, florometri ya da HPLC aracılığı ile işaretli substratlar ve inhibitörler kullanılarak belirlenmiştir. MAO tayini için kullanılan substratlar arasında; benzilamin, radyoaktif işaretli triptamin, tiramin, feniletüilamin ve dopamin sayılabilir. Bizim çalışmamızda uygulanan yöntem Kraml'ın modifiye spektroflorometrik yöntemi olup kinüramin subsratinın MAO ile oksidasyonu sonucu oluşan 4-hidroksikinolin floresansının ölçülmesine dayanır (37). Bu

yöntem doku çalışmalarında güvenilir sonuçlar vermektedir. Bu yöntemi laboratuvar koşullarımızın uygunluğu, kullanılan maddelerin kolay elde edilmesi ve ekonomik oluşları da üstün kılmaktadır. Kinüraminin substrat olarak seçilmesinin nedeni de benzer şekilde bu substratın elde edilmesinin kolay ve ekonomik olmasıdır.

Yaşlanma ile ilgili mekanizmaların aydınlatılabilmesi için yapılan çalışmalar sırasında, yaşlanma ile tip A ve B MAO enzim aktivitelerinde organ spesifik değişimler izlenmiştir (38). Kalp ve karaciğerde yaşla birlikte her iki enzim aktivitesinde de artış izlenirken, böbrekte her iki tip MAO aktivitesinde yaşla birlikte azalma gözlenmektedir. Dalakta ise bu enzim aktivitelerinde anlamlı bir değişiklik izlenmemektedir (38). Saura ve arkadaşları da yaptıkları radyootografik çalışmalarda yaşla birlikte kalp ve beyinde MAO B'nin arttığını, ancak MAO A'da bir değişiklik olmadığını göstermişlerdir (67). Benedetti de yaşlanma ile MAO düzeylerindeki bu artışın ilişkisini ve ilgili mekanizmaları araştırmış ve MAO A aktivitesinin sıçan kalbinde yaşla paralel olarak arttığını (% 600), farelerde ise yaşla beraber MAO A aktivitesinin değişmemesiyle birlikte, MAO B aktivitesinin % 70 oranında arttığını bildirmiştir (76). Bu literatürlerle uyumlu şekilde biz de çalışmamızda normal yaşlı sıçanlarda kalp MAO aktivitesinin gençlere göre anlamlı derecede ($p < 0.005$) arttığını gözlemledik. Bu artış çalışmanın başlangıcında öne sürdüğümüz yaşla beraber kateşolamin metabolizması ve yan ürünlerindeki artışı da beraberinde getirmekte ve MAO aktivitesindeki artışın kateşolamin metabolizma yan ürünü olarak hidrojen peroksitde de artışa yol açabileceğini kuvvetle düşündürmektedir.

Yaşla beraber MAO enzim aktivitesinin artışı dışında kalp dokusunda meydana gelen bir başka değişiklik de myokardial iskeminin ve kardiyak iskemik lezyonların artmasıdır. İskemi ve reperfüzyon sırasında kateşolaminlerin otooksidasyonu myokardial hasara yol açmaktadır. İskemi /reperfüzyon sırasında salınan kateşolaminler okside olduklarında serbest radikallerin oluşumu için gerekli elektron sağlayıcı kaynakları oluştururlar. İskemik ya da hipoksik dokuya oksijenin tekrar girdiği reperfüzyon aşamasında substrat olarak oksijenin de

temin edilmesiyle hızla serbest oksijen radikalleri oluşur ve bunlar bir dizi hasarlayıcı işlemi tetiklerler (18).

Sonuçta yaşla beraber MAO enzim aktivitesinin dolayısıyla kateşolamin metabolizmasının artması yanı sıra ilerleyen yaşla birlikte myokardial iskemide görülen artış kateşolamin otooksidasyonunda da artışa yol açmakta ve kardiyak dokunun yoğun bir hidrojen peroksid üretimi ile karşı karşıya kalmasına neden olmaktadır.

Normalde mitokondri ve peroksizomlarda belirli miktarlarda üretilen hidrojen peroksid etkin bir serbest radikal temizleyici sistemle ortamdaki uzaklaştırılır. Buna karşılık patolojik koşullarda ortama salınan anormal miktarlarda hidrojen peroksid ve oksijen radikalleri kalbin normal fonksiyonlarını etkiler. İskemik dokuda reperfüzyon aşamasında, ksantin ve ksantin oksidaz tarafından üretilen süperoksid kalbe herhangi bir zarar vermezken, süperoksid anyonunun dismütasyonu sonucu oluşan H_2O_2 ciddi hasar oluşturur. Bu nedenle kalpte gelişen postiskemik reperfüzyon hasarında H_2O_2 'in esas rolü oynadığı öne sürülmüştür (18, 43, 44).

Değişik patolojik koşullarda oksijen metabolitleri (O_2^- , H_2O_2 , OH^\bullet) hücre membranlarında bulunan lipid ve proteinlere direkt ya da indirekt yollarla saldırırlar. İskemi ya da reperfüzyon sırasında oluşan serbest radikallerin hücre membran lipidlerini perokside edip membranın yapısal bütünlüğünü bozdukları ve membran lipidlerinin yakın çevresinde bulunan proteinleri perokside ettikleri ve protein ve lipidlerle bağımsız ya da birlikte tepkimeye girdikleri belirtilmiştir. Radikal aracılı hücre ölümünde, iyon transportunda ve hücre sel iyonik homeostazda önemli olan membran transport proteinlerinin temel hedeflerden oldukları artık bilinmektedir. Radikal üretici sistemlerle karşı karşıya kalan membranların %10-15 oranında protein kaybına uğradığı saptanmıştır. Böylelikle radikal atağın sadece lipid peroksidasyonuna değil membran proteinlerinin yıkılmasına da yol açtığı bildirilmiştir (10, 12, 43, 54).

Myokardial iskemi mitokondrial membranların mikroviskozitesinde de bir artışa neden olur. Membran kompozisyonunda mikroviskozite ya da akışkanlığı etkileyen bir çok faktör vardır: Membranın protein / lipid içeriği, kolesterol / fosfolipid oranı, fosfatidilkolin / sfingomyelin oranı, ansatüre fosfolipid açil zincirlerinin uzunluğu ve doymamışlık derecesi, lipid peroksidasyonu, protein içeriğinin kaybolması bu etkileyici faktörlerdendir (10).

Ekzojen olarak ortama verilen serbest oksijen radikallerinin kalp sarkolemmal membranını, sarkoplazmik retikulumu ve mitokondriyal fonksiyonları etkilediği ve kardiyak kontraktilitede de disfonksiyona yol açtığı bildirilmektedir (32). Serbest oksijen radikallerinin kalp kontraktil proteinlerine olan etkisi ile myofibriler kreatin kinaz aktivitesini inhibe ettiği de saptanmıştır. Myofibriler kreatin kinaz aktivitesindeki değişimler myokardın enerji kullanımını etkileyerek kalpte disfonksiyona neden olabilir. Ayrıca serbest oksijen radikalleri myofibriler sülfhidril grupların içeriğini düşürerek de myofibriler kreatin kinaz aktivitesini etkilerler. Sülfhidril gruplarının bazı membrana bağlı enzim aktivitelerinde gerekliliğinin bilinmesi ve proteinlerdeki bu grupların oksijen radikalleri tarafından okside edilebilmesi, serbest oksijen radikallerine bağlı olarak kreatin kinaz aktivitesinde görülen değişikliklerin sülfhidril grup içeriğindeki bu değişikliklerle ilgili olduğunu düşündürmektedir. Myofibriler kreatin kinaz, myosin ATPaz sistemi ile fonksiyonel olarak eşleşmiş olduğundan önemli bir intramyofibriler ATP-üretici sistem olarak rol alır. Myofibriler kreatin kinazdaki bu etkileşim ATPaz aktivitesindeki değişimler ve kalpte enerji kullanımı ile eşleşmiş olduğundan bu enzim aktivitesinin inhibisyonu serbest oksijen radikallerinin kalp fonksiyonlarını hasarlama yollarından biri olabilir (32, 90).

Oksidan bileşikler kalp kasının enerji dengesini de bozabilirler. Sıçan myositlerinde ve izole sıçan kalplerinde yapılan çalışmalar sonucunda oksidatif stres ve glikolitik inhibisyon arasında indirekt bulgular bulunmuştur. Artmış hidrojen peroksid üretiminin kardiomyositlerde glikoz oksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Hidrojen peroksid tarafından indüklenen oksidatif stres nonperoksidatif bir mekanizmayla kardiomyosit karbonhidrat metabolizmasını

bozar. Gliseraldehid 3 fosfat dehidrogenaz inaktivasyonu sonucu glikolitik blok gerçekleşir (31).

Serbest radikallerin bir diğer etki mekanizması da nükleik asitlerle olan etkileşimleridir. 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. Gen teknolojisindeki son gelişmeler mtDNA mutasyonları arasındaki ilişkileri araştırmaktadır. Bu mutasyonlar hücresel enerji metabolizmasının yıkılmasına (solunum zincirinde defektler) ve yaşla ilgili dejeneratif hastalıkların gelişimine yol açar. mtDNA mutasyonları solunum zincirindeki enzimlerde yol açtığı defektlerle hücre ve dokuda enerji açığına neden olur. Sıçan kalplerinde yapılan bir çalışmada kalp kası mitokondriyal tamir enzimlerinde yaşla beraber bir azalma saptanmıştır. Bu gerçekler yaşla beraber görülen ve engellenemeyen non-aterosklerotik kalp disfonksiyonunu açıklayabilir. Yaşla beraber artan oksijen hasarı, mtDNA'daki delesyonlarla birlikte ilerleyen yaşla birlikte görülen kardiyak disfonksiyona önemli katkılarda bulunuyor olabilir (29).

Yaşla beraber artmış kateşolamin metabolizması ve yan ürünlerinin kardiyak dokuda membranlar üzerinde gösterdiği etkiler, diğer sistem ve dokularda olduğu gibi en iyi şekilde lipid peroksidasyon parametrelerinin araştırılması ile ortaya konabilir. Lipid peroksidasyon basamakları genel olarak özetlenecek olursa, ansatüre yağ asidinden serbest radikallerin etkisi sonucu hidrojen çıkması ile konjuge dienler oluşmakta, konjuge dienlerin oksijen ile tepkimeye girmesi ile lipid peroksidleri meydana gelmekte, bu da son olarak lipid endoperoksidlerine çevrilmektedir. Endoperoksidler hidrokarbonlar gibi bileşiklerle tepkimeye girerek alkil radikallerini ve lipid hidroperoksidlerini oluşturmaktadır. Endoperoksidlerden 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 de tepkimeye girebilmektedir. Böylece amino-imino-propen bileşiği oluşmaktadır (4, 12, 14, 84).

Lipid peroksidasyonunu tayine yönelik olarak yapılan çeşitli çalışmalarla lipid peroksidlerinin diabet, hiperlipidemi, esansiyel hipertansiyon, AMİ, strok, ve aterosklerozda artmış olduğu saptanmıştır. Artmış olan lipid peroksidleri damar duvarında endotel ve intima hücrelerine zarar verir; trombosit agregasyonunu etkiler ve damar tonüsünü azaltan bir bileşik olan prostasiklin sentezini inhibe eder (13, 17).

Lipid peroksidasyonunu tayine yönelik klinik ve kimyasal testler arasında;

- ◆ Lipofüsin benzeri maddelerin serumda florometri ile tayini
- ◆ Plazmadan elde edilmiş lipid ekstralarında konjuge dienlerin spektrofotometrik tayini
- ◆ Plazma lipoperoksidlerinden oluşan MDA'nın spektrofotometri, florometri ya da HPLC ile tayini
- ◆ Dışarı salınan havada bulunan etan, pentan ve diğer alkanların gaz kromatografik tayini sayılabilir (87).

Bizim çalışmamızda da lipid peroksidasyon ürünleri olan konjuge dienler ve malondialdehid spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Lipid peroksidasyon kaskadında ilk ürünlerden olan dien konjugatları doku homojenatında kloroform ve metanol ile ekstrakte edildikten sonra azot gazı altında uçurulmuş ve daha sonra kuru kalıntı siklohekzan ile çözülerek ürünün 233 nm'deki absorbansı tayin edilmiştir. Bu yöntemle kalp doku örneklerinde saptadığımız dien konjugatları düzeylerinde yaşlı kontrollerde gençlere göre anlamlı bir artış izlenmiştir ($p < 0.00001$). Serbest oksijen radikallerinin üretilmesinden sorumlu bir enzim olan MAO ile dien konjugatları arasında da anlamlı bir (+) korelasyon gözlenmiştir ($r = 0.9668$).

Son yıllarda hücre düzeyinde birçok biyolojik makromolekülle etkileşebilen malondialdehid üzerinde de yoğun olarak çalışılmıştır (13, 15, 62, 80). Malondialdehid poliansatüre yağ asitlerinden elde edilen peroksidlerin ortak bir yıkım ürünüdür. Malondialdehid araşidonik asidden, birçok lipoksiden, hidroperoksidlerden, endoperoksidlerden, prostoglandinlerden ve tromboksanlardan sentez edilebilir. Prostaglandin biyosentezi yolu ile MDA oluşumu gerçekleşse de, ansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu MDA oluşumunda ana kaynaktır. Bu üç karbonlu dialdehidin peroksid içeren karbonla ansatüre bağın β - γ pozisyonunda yan yana yer alması sonucu temel olarak yağ asid hidroperoksidlerinden kaynaklandığı öne sürülmektedir (69).

Doku lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA selüler düzeyde metabolize edilir: Karaciğer aldehid dehidrogenazı tarafından enzimatik olarak yıkılıma uğrar, CO₂'e metabolize olur, mitokondriyal yolda yıkılır ya da idrarda asid ile hidrolize edilebilen formda küçük miktarlarda eksrete edilir.

MDA serbest olarak ya da değişik doku bileşenleri ile kompleks şekilde bulunabilir, ancak reaktivitesinden ötürü MDA biyolojik örneklerde serbest olarak uzun süre kalmaz (40).

MDA'nın hücre hasarında yol aldığı ve yaşlanma pigmentleri olan lipofüsinlerin oluşumunda da etkili olduğu bildirilmiştir. Lipofüsinlerde MDA, proteinlerin serbest amino gruplarında kondense olmuştur. MDA'nın bazı amino asitler, DNA ve RNA ile tepkimeye girdiğine ait deliller de vardır; MDA, DNA ve RNA'da aldehid çapraz bağlar meydana getirir. MDA'nın mutajenik özellikleri olduğu ve kimyasal karsinojen gibi davrandığı da bilinmektedir (80).

Membran lipid peroksidasyonunun semikantitatif bir göstergesi olarak, sensitivitesi yüksek bir yöntem olan tiobarbitürik asid tepkimesine dayalı MDA ölçümünden yararlanılmaktadır. Spesifisite ve interferansa dayalı potansiyel problemler nedeniyle bu tayinin in vivo olarak lipid peroksidasyonu için uygun olmadığı düşünülmüşse de, in vitro lipid peroksidasyonunu izlemede göreceli

olarak yararlı bir gösterge olduğu öne sürülmüştür. Bu yöntemde lipidler ekstraksiyon işlemine uğratılıp 2 molekül TBA ile 1 molekül malondialdehidin tepkimeye girmesi sağlanır. Asid pH'da ve sıcakta reaksiyona giren MDA ve TBA'nın oluşturduğu ürün 532 nm'de spektrofotometrik olarak tayin edilir. MDA içeriğinin bu yolla tayininin lipid peroksidasyonunun gerçek derecesini yansıtamayabildiği de öne sürülmüştür, zira bu görüşe göre MDA'nın oluşması için en az 3 ya da daha fazla çifte bağa sahip lipidlerin okside olması gerekir. Ayrıca bu yöntemde interferans yapan bazı maddelerin bulunduğu da bildirilmiştir. İnterferans yapan maddeler arasında en önemlilerinin biliverdin ve hemoliz olduğu düşünülmektedir. Hemolizde rüptüre olan hücre membranından açığa çıkan lipid peroksidleri, plazma malondialdehid düzeylerinin yükselmesine neden olmaktadır. Biliverdin ise TBA ile reaksiyona girerek pembe renkli bir bileşik oluşturmaktadır. Bu nedenlerden ötürü ikterik ve hemolizli kan örneklerinde daha spesifik olan HPLC yönteminin kullanılması önerilmektedir. MDA ölçümlerinin beklenen lipid peroksidasyonundan daha düşük olarak bulunabileceği göz önüne alınarak daha hassas tayinler için diğer lipid peroksidasyon ürünlerinin de ölçülmesi gerektiği bildirilmiştir (13, 80).

Yukarıda öne sürülen dezavantajlara rağmen MDA-TBA tepkimesinin MDA tayininde spesifik ve yararlı bir gösterge olduğu yolunda görüşler de vardır. Di Pierro ve arkadaşlarına göre uygun koşullarda çalışılan MDA peroksidatif hasarın güvenilir bir göstergesidir (15). MDA-TBA yönteminde spesifikliği azalttığı öne sürülen interferansa karşı ekstraksiyon işleminin TBA çalışmasını etkileyen intraselüler bileşikler ve metabolik sistemleri elimine ettiği bildirilmiştir. Ayrıca Comporti ve arkadaşları çalışmalarında örneklerin asid ekstrelerinde MDA tayininin, lipid peroksidasyonunu gösteren diğer işlemlerle (dien konjugasyon absorpsiyonu, membran fosfolipidlerindeki karbonil fonksiyonları miktarı, poliansatüre yağ asidlerinin kaybı) iyi korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir (11). Okside lipidlerde bulunan 2,4-alkildienler ve 2 alkenaller de (+) bir tiobarbitürik asid tepkimesi oluştururlar (69). MDA'nın spesifik olmadığı yolundaki görüşlere rağmen, Esterbauer & Cheeseman'in çalışmalarında TBA'nın diğer bileşiklerle oluşturduğu ürünlerin TBA-MDA'ya göre çok daha düşük ekstinksiyon

koeffisientleri gösterdiği ve bu nedenle MDA tayininin spesifik olduğu belirtilmiştir (17).

Son yıllarda MDA-TBA kompleksinin HPLC ile tayini üzerine de çalışmalar yapılmış ve bu teknikle tatmin edici düzeyde tekrarlanabilirlik saptanmıştır. Bu yöntemin hızlı sonuç vermesine ve hassas olmasına rağmen fazla sayıda örneklerin çalışılması gerektiği durumlarda geleneksel TBA ölçümünün yerini alması beklenmemektedir. Ayrıca bu teknik kolorimetrik yöntemle göre çok daha pahalıdır (80).

Bizim çalışmamızda da doku MDA düzeyleri, yukarıda belirtilen olumlu etkiler gözönüne alınarak TBA tepkimesine dayalı kolorimetrik yöntemle belirlenmiştir (56). MDA düzeylerinde kalp dokusunda yaşlı grupta gençlere göre anlamlı bir artış izlenmiştir ($p < 0.0001$). Bu sonuçlar benzer bir biçimde kalp dokusu MDA düzeylerinde bir artış saptayan Hagihara ve Knight'in çalışmalarıyla da uyumludur. Bu araştırmacılar da lipid peroksid düzeylerine yaş ve cinsiyetin etkili olduğu bildirmişler ve yaş arttıkça lipid peroksidlerin yükseldiğini saptamışlardır (25, 35). Araştırmacıların bulduğu bu yükselme, VLDL ve LDL fraksiyonlarındaki lipid peroksidlerinin artışına bağlıdır. HDL lipid peroksidleri ise yaşla beraber değişiklik göstermemektedir.

Çalışmamızda konjuge dienlerde olduğu gibi yaşlı sıçanlarda kalp MDA düzeyleri ile kalp MAO aktivitesi arasında pozitif bir korelasyon ($r = 0.9358$) gözlenmiştir. Bu bulgu da serbest oksijen radikallerinin oluşumunda yaşlılıkta artan MAO aktivitesinin rolünü yansıtmaktadır.

Yukarıdaki bulguların da yansıttığı üzere serbest radikaller tarafından indüklenen hasarın yaşlanmada görülen dejeneratif etkilerin oluşumunda kısmen sorumlu olduğu artık bilinmektedir. Bu nedenle ateroskleroz, enflamatuvar hastalıklar, kanser ve yaşlanmada etkisi olduğu bilinen serbest radikalleri temizleyen, antioksidan enzimlere verilen önem giderek artmaktadır. Yaşla beraber dokunun radikal hasarına karşı kendi savunmasını belirlemek için bu hasara karşı

koruyucu etki oluşturan enzim aktiviteleri üzerine yaşın etkisi araştırılmıştır (82). Carrillo ve ark. yaptıkları çalışmalarda karaciğer ve beyinde yaşa bağlı olarak izlenen antioksidan enzim değişiklikleri yanı sıra cinsiyete bağlı değişiklikleri de araştırmışlardır (7).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda incelenen antioksidan enzimlerden en önemlisi olan süperoksid dismütaz lipid peroksidasyon reaksiyonlarının başlamasına öncülük eden serbest radikallerden biri olan süperoksid radikalini ortamdaki temizleyerek etkili olmaktadır. Ökaryotik sitozolden elde edilen CuZn-SOD dimerik bir protein olup, disülfid köprüleri ile bağlanmış olan 2 idantik alt birimden oluşmuştur. Her alt birimde 0.9 atom Zn^{+2} ve 0.8 atom Cu^{+2} bulunmakta olup toplam 151 amino aside sahiptir.

Daha uzun yaşam süresine sahip türlerin SOD ve katalaz aktiviteleri de diğer türlere kıyasla paralel bir artış göstermektedir. Sohal ve arkadaşları ilerleyen yaşla beraber antioksidan enzimlerde düşüş olduğunu, artan serbest radikallerin organizmanın antioksidan havuzunu boşalttığını öne sürmüşlerdir (75).

Antioksidan enzim düzeylerini yaşla birlikte gösterdikleri değişimi belirlemeyi amaçladığımız çalışmamızda, SOD düzeyleri epinefrinin adrenokromatoooksidasyonu esasına dayalı kolorimetrik yöntem ile tayin edilmiştir (46, 70). Sonuçlarımız bu konuda çalışmış olan Sohal'ın düzeyleri ile uyumludur ve kalp dokularında antioksidan enzimlerden SOD'un aktivitesi yaşlı grupta genç gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş göstermektedir ($p < 0.05$) (75).

Çalışmamızda incelediğimiz bir başka antioksidan enzim olan katalaz ise yapısal olarak bir hemoproteindir (74). Bu enzim kan, kemik iliği, karaciğer, müköz membran ve böbrekte yüksek miktarlarda bulunmaktadır (86). Katalazın düşük hızlarda hidrojen peroksidin olduğu durumlarda ya da yüksek elektron alıcısı konsantrasyonlarının bulunduğu ortamlarda peroksidatif tepkimeyle, hidrojen peroksid oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkimeyle hidrojen peroksidi suya dönüştürerek ortamdaki uzaklaştırdığı bilinmektedir.

Kalp dokusu yüksek düzeydeki aerobik metabolizması sonucunda ve diğer hücrelere oranla daha yüksek düzeylerde içerdiği solunum bileşenleri (ubikinon) nedeniyle diğer organlara göre daha fazla miktarlarda H_2O_2 üretir. Kalp mitokondrisi tarafından oluşturulan hidrojen peroksid mitokondride intermembranal aralıktan diffüze olarak sitozole geçer ve bu arada mikroperoksizomal katalaza ulaşmadan sitokrom c ve diğer sitokromlarla ve myoglobinle tepkimeye girer. Hidrojen peroksidin bu hem içeren proteinlerle tepkimesi sonucu yüksek derecede oksidasyon gücüne sahip türevler oluşur. Bu nedenle kalp kasında katalazın spesifik aktivitesi diğer organlara göre düşük olsa da, katalazın subselüler dağılımının hidrojen peroksid üreten anahtar bölgelere yakın olması antioksidan kapasitesini arttırmaktadır (64).

Sohal ve arkadaşlarının çalışmalarında 3 aylık sıçan kalp katalaz düzeyleri 2.6 ± 0.5 U/mg protein, 18 aylık sıçan kalp katalaz düzeyleri ise 2.4 ± 0.09 U/mg protein olarak belirlenmiştir. Bu da bizim olgularımızda yaşla beraber izlenen hafif düzeylerdeki katalaz düşüşü ile uyumludur ($p < 0.05$).

MAO inhibitörlerinin klinikte Parkinson ve Alzheimer gibi dejeneratif hastalıkların ve depresyonun tedavisinde etkin olarak kullanıldıkları bilinmektedir. MAO A'ya ya da MAO B'ye spesifik irreversibl inhibitörlerin varlığının yanı sıra son dönemde her iki MAO izozimine de etki eden reversibl inhibitörler ortaya çıkarılmıştır (39). Çalışmamızda uygulanan MAO inhibitörleri; MAO B'nin irreversibl spesifik inhibitörlerden olan ve klinikte yaygın bir şekilde kullanılan deprenil ile karma bir inhibitör olan parjilin'dir.

Bu ajanların MAO inhibisyonu geliştirmeleri ve ardından kalp dokusunda oksidan strese olası gerileme ve antioksidan savunma ilişkilerini inceleme amacıyla uygulamalarında; sadece akut dozun etkileri araştırılabilmektedir. Sıçanların mevcut koşullarda uzun süre yaşatılamamaları ve infeksiyon riskinin yüksek olması nedeni ile kronik uygulamaya gidilememiştir.

Günümüze dek karaciğer ve beyin dokusunda MAO aktivitesinin L-deprenil ile inhibisyonu için yapılan çalışmalarda L-deprenil inhibisyonunun cinsiyet, doz, uygulama yolu ve uygulama sıklığı gibi bir dizi değişkene bağlı olduğu ortaya konmuştur (47).

L-Deprenil sitokrom P-450 sistemi ile metabolize olmaktadır. Bu sistemin genç erkek sıçanlarda dişi sıçanlara göre daha aktif olduğu saptandığından cinsiyete bağlı değişikliklerin elimine edilmesi için çalışmada erkek sıçanlar kullanılmıştır.

Çalışmamızda MAO inhibitörlerinin uygun veriliş yollarını ve inhibitör dozlarını saptamak için literatürlerden yararlanılarak bir dizi deneysel ön hazırlığa gidilmiştir. L-deprenil ile yapılan çalışmalarda ajanın genellikle intraperitoneal ya da subkutan uygulanması gündeme gelmiştir (47). İlacın insanlardaki kullanımında ise oral yol seçilmiştir. Bizim çalışmamızda intraperitoneal yolun seçilme nedeni; oral uygulamada L-deprenil'in ya da parjilin'in karaciğerden geçişleri sırasında kısmen tutulacakları ya da metabolize olacakları, böylelikle hedef dokuya daha az bir konsantrasyonda ulaşacakları gerçeği idi. Hazırlıkların sonucunda hem deprenilin, hem de parjilinin akut uygulamada 25 mg/kg i.p. dozlarda yeterli MAO inhibisyonunu (% 60-70) sağladıklarını gözlemledik.

Bu inhibisyon derecesini ve maksimum inhibisyondaki değişiklikleri saptamak amacıyla MAO inhibitörleri verildikten sonra çeşitli saatlerde dekapitasyon uygulanarak en uygun süre belirlenmeye çalışılmıştır (Bkz. Tablo 4). Bu nedenle ajanların akut olarak i.p. uygulanmalarının ardından belirli saatlerde dekapitasyon uygulanmış ve MAO inhibisyonunun en etkili olduğu 1.5 saatin ardından dekapitasyonun uygulanmasına karar verilmiştir.

MAO inhibitörlerinin uygulanımı sonrası MAO enzimidaki inhibisyon dereceleri irdelendiğinde; deprenil uygulamasının ardından genç ve yaşlı sıçanlarda MAO aktivitelerinin anlamlı bir şekilde düştüğü izlenmektedir ($p < 0.0001$). Parjilin uygulamasının ardından elde edilen değerlerde $p < 0.00001$ olup, deprenil ve

parjilin arasında etkinlik açısından yine de istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmemektedir.

MAO inhibitörlerinin MDA üzerine etkileri incelendiğinde, deprenilin gençlerde ve yaşlılarda ($p < 0.005$) anlamlı bir düşüşe yol açtığı, parjilinin ise yaşlı grupta gençlere göre ($p < 0.0005$) daha da anlamlı bir düşüşe neden olduğu izlenmektedir. Buna karşın her iki ajanın ayrı ayrı MDA düzey değişikliklerine olan etkilerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenememiştir.

Oksidan stresin diğer bir ürünü olan dien düzeyleri incelendiğinde, her iki ajanın da yaşlı grupta anlamlı bir düşüşe ($p < 0.005$) neden oldukları, ancak MDA üzerine olan etkilerinden farklı olarak genç grupta parjilinin etkisinin ($p < 0.0005$) deprenile göre daha anlamlı olduğu görülmektedir.

MDA ve konjuge dienler ile ilgili sonuçlarımız MAO enzim inhibisyonunun kateşolamin metabolizmasını ve bu metabolizmanın neden olduğu oksidan stres ürünlerinin salınımını azalttığını doğrulamaktadır. Benzer şekilde Wu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada substantia nigra'da bulunan hücrelere deprenil uygulanmasının bu hücreleri dopamin nörotoksitesine karşı koruduğunu ve deprenilin hidroksil radikal oluşumuna karşı antioksidan bir etkisi olduğunu öne sürmüşler; ayrıca deprenilin, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP)'in MAO B tarafından toksik piridinyum metabolitlerine biyoaktivasyonunu da bloke ederek ek bir antioksidan etki gösterdiğini bildirmişlerdir (88).

Simonson ve arkadaşları her ne kadar parjilinin oksidatif stres üzerine MAO inhibisyonu dışında bir yolla da etkili olabileceğini öne sürmüşlerse de daha sonraki çalışmalarının sonucunda parjilinin hidrojen peroksid üretimini azaltması dışında bilinen bir antioksidan etkisinin olmadığını ortaya çıkarmışlardır (68).

Sonuçta MAO inhibitörlerinin kateşolaminlerin otooksidasyonunu inhibe ederek lipid peroksidasyon ürünlerinde bir düşüşe neden oldukları gözlemlenmektedir. Bu bulgu da tek başına yaşlanmada artmış olan MAO aktivitesinin kontrol altına

alınması aracılığı ile, yaş ile beraber izlenen ve gelişimleri oksidan stres ve ürünlerine bağlanan bazı proseslerde MAO inhibitörlerinin koruyucu rol oynayabileceklerini göstermektedir.

Her ne kadar Deprenil ve Parjilin'in uygulanmasının ardından oksidan stres ürünlerinde anlamlı bir düşüş saptanmışsa da, bunlara karşın antioksidan enzim düzeylerinde sadece istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış saptanmıştır. Bu sonuçlarımız MAO inhibitörlerinin akut uygulamalarının antioksidan enzimlerin indüklenmesi için yeterli olmadıkları sonucuna yöneltmektedir. Olasılıkla daha uzun süreli uygulama protokolleri ile antioksidan savunma sistemlerinde enzim indüklenmesi gerçekleşebilecektir. Bu görüşümüzü destekleyen bir çalışma Gerlach ve arkadaşları tarafından yapılmış ve bu araştırmacılar kronik deprenil uygulamasının (3 hafta; 2.0 mg/kg sc) ardından SOD ve katalaz düzeylerinde artış gözlemlenmiştir (20).

Çalışmamızın sonucunda fizyolojik yaşlanma prosesinde, kalp dokusunda MAO enzim aktivitesindeki artışla paralel olarak kateşolaminlerin metabolizasyonu sonucu oluşan hidrojen peroksid üretiminde de önemli artışlar saptanmıştır. Bu değişimin lipid peroksidasyon parametrelerine yansımaları MDA ve konjuge dien düzeylerinin belirlenmesi ile gösterilmiştir. Fizyolojik yaşlanmada oksidan stres ürünlerinin artmasına karşılık antioksidan savunma enzimlerinde (SOD ve katalaz) yaşla beraber bir düşüş izlenmiştir.

Deprenil ve parjilin uygulamasının MAO inhibisyonu yanı sıra lipid peroksidasyon ürünlerinde oluşturduğu değişiklikler çarpıcıdır. Bu sonuçlar ilerleyen yaşla beraber serbest oksijen radikallerine bağlı oluşan olumsuz değişikliklerin MAO inhibitörleri ile kontrol altına alınabileceği yolunda ümit vermektedir. Daha uzun süreli MAO inhibitör kullanımının lipid peroksidasyonunda oluşturduğu olumlu etkiler yanı sıra antioksidan savunma enzimlerini de güçlendirebileceği düşünülmektedir. Bu nedenle MAO inhibitörleri fizyolojik yaşlanmada gösterdikleri olumlu etkilerinden ötürü yakın gelecekte araştırmacıların daha da yoğun ilgisini çekmeye devam edecektir.

ÖZET

Serbest oksijen radikalleri yapılarında eşleşmemiş elektrona sahip olan ve bu nedenle yüksek reaktivite özelliği gösteren moleküllerdir. Bu radikallerin kanser, iskemi-reperfüzyon, yaşlanma gibi bir dizi süreçte etkili oldukları artık bilinmektedir. Serbest oksijen radikalleri organizmada normal koşullarda solunum zincirinde oluşan oksijen kaçağı sonucunda ya da kateşolamin, araşidonik asid gibi ürünlerin metabolizmalarında devamlı olarak üretilirler. Bu ürünler membran lipidlerine, proteinlere ve nükleik asidlere verdikleri zararlarla hücrede bir dizi hasarlayıcı mekanizmayı tetiklerler. Poliansatüre yağ asidleri hücre membranlarında yer alırlar ve serbest radikallerin oluşturacakları hasarın temel hedefleridirler. Organizmada serbest radikal hasarına karşı sistemi koruyan bir dizi savunma geliştirilmiştir. Bunlar arasında nonenzimatik sistemler ve süperoksid dismutaz ve katalaz gibi enzimatik sistemler sayılabilir.

Monoamin oksidaz serotonin, dopamin, epinefrin ve norepinefrin gibi biyojen aminleri metabolize eden bir enzimdir. Biyolojik psikiyatideki önemi nedeni ile son yıllarda yoğun ilgi çekmekte olan bu enzimin inhibitörleri, Parkinson ve Alzheimer gibi hastalıklarda ve depresyonda sıklıkla kullanılmaktadır.

Çalışmamızın ilk amacı, sıçan kalp dokularında yaşla beraber monoamin oksidaz, lipid peroksidasyon göstergeleri olan malondialdehid ve dien konjugatları düzeyleri ile antioksidan savunma sistemlerinden süperoksid dismutaz ve katalazın aktivitelerinde oluşan değişiklikleri incelemektir. Sıçanlara monoamin oksidaz inhibitörlerinin uygulanmasının ardından bu parametrelerde oluşan etkileri ve ilişkileri incelemek ise ikinci amacımızdır.

Çalışma iki aşamadan oluşmuştur. İlkinde genç (2-3 aylık, n=10) ve yaşlı (16-18 aylık, n=10) sıçan kalp dokularında monoamin oksidaz, malondialdehid, dien konjugatları, süperoksid dismutaz ve katalaz düzeyleri çalışılmıştır. Ardından akut dozda (25 mg/kg, i.p.) 2 değişik monoamin oksidaz inhibitörü (deprenil ve parjilin) kullanılarak aynı parametreler değerlendirilmiştir.

Yaşlı sıçan kalplerinde hem monoamin oksidaz aktivitesinde, hem de malondialdehid ve dien konjugatları düzeylerinde gençlere göre anlamlı artışlar izlenmiştir. Süperoksid dismutaz ve katalaz düzeylerinde ise ilerleyen yaşla beraber hafif düzeylerde düşüş saptanmıştır. Monoamin oksidaz inhibitörlerinin ardından hem monoamin oksidaz aktivitesinde, hem de malondialdehid ve dien konjugatları düzeylerinde anlamlı düşüşler izlenmiştir. Bu durum da kateşolamim oksidasyonunun ve monoamin oksidaz aktivitesinin oksidan stres oluşturan kaynaklardan biri olduğu görüşünü desteklemektedir. Monoamin oksidaz inhibitörleri yaşla beraber oksidan streste ve lipid peroksidasyonunda görülen artışı dengeleyerek yaşlanma prosesinin kontrol altına alınmasına yardımcı olabilir.



SUMMARY

Oxygen free radicals are highly reactive compounds containing an oxygen atom with an unpaired electron. These species have been implicated in a variety of diseases; including cancer, reperfusion injury, atherosclerosis and aging. Under active conditions mitochondrial electron transport, monoamine oxidase (MAO), xanthine oxidase, arachidonic acid metabolism, and peroxysomal enzymes generate reactive oxygen species (ROS). These species have been postulated to be important in tissue injury via lipid peroxidation and oxidative damage to important cell structures such as membranes, DNA and proteins. Polyunsaturated fatty acids in biological membranes are among the main targets for free radical attack and measurement of the resulting degradation products (malondialdehyde and diene conjugates) are relatively easy. To protect cells from damage by ROS, antioxidant systems exist to detoxify these compounds. These systems include nonenzymatic "scavengers" and antioxidant enzymes such as superoxide dismutases (SOD) that form hydrogen peroxide from superoxide anion and catalases which metabolize hydrogen peroxide by reducing it to water and oxygen.

Monoamine oxidase is an enzyme responsible for the inactivation of biologically important active amines such as serotonin, dopamin, epinephrine and norepinephrine. The enzyme is one of the most intensively studied enzymes, presumably because of its importance for biological psychiatry. MAO inhibition is widely used as a therapeutic strategy in the treatment of depression and Parkinson's disease.

The first aim of this study was to determine the changes in MAO activities in aged rat hearts to show the possible role of this activity in the aging process as a source for free radicals. To observe the changes in MAO activities, lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels after administering MAO inhibitors, and assessing the correlations among these parameters was the second aim.

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 hearts were studied. As the second phase, the same parameters were determined in young and old rat hearts after acute administration of two MAO inhibitors (deprenyl and pargyline) (25 mg/kg i.p.).

The results showed that MAO activities and lipid peroxidation exhibit marked increases in old rat hearts while slight decreases can be observed in SOD and catalase activities in the same group. Administration of MAO inhibitors decreased the MDA and diene conjugate levels as well as inhibiting MAO activities. These results confirm the role of catecholamine oxidation and MAO activity as one of the causative factors in oxidant stress. 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 IB, The Biology and Physiology of Aging. West J Med, 1990, 153: 641-645.
2. Aebi H, Catalase in vitro. Method Enzymol, 1984, 105: 121-126.
3. Bjorneboe A, Bjorneboe Gunn-Elin A, Drevon CA, Absorption, Transport and Distribution of Vitamin E. J Nutr, 1990, 120: 233-242.
4. Bueger JA, Yust SD, Microsomal Lipid Peroxidation, Methods Enzymol, 1978, 52: 302-310.
5. Bulkley GB, The Role of Oxygen Free Radicals in Human Disease Processes. Surgery, 1983, 94 (3): 407-411.
6. Büyüköztürk A, Beyin Monoamin Oksidaz Aktivitesinde Yaşa Bağımlı Değişiklikler ve Hiderjinin Etkileri. 1994, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi.
7. 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, 65 (2-3): 187-198.
8. Cawthon RM, Pintar JE, Haseltine FP, Breakefield XO, Differences in Structure of A and B Forms of Human Monoamine Oxidase. J Neurochem, 1981, 37 (2): 363-372.
9. Cheeseman KH, Slater TF, An Introduction to Free Radical Biochemistry. Brit Med Bull, 1993, 49 (3): 481-493.

10. Coetzee IH, Lochner A, Free Radical Effects on Myocardial Membrane Microviscosity. *Cardioscience*, 1993, 4 (4): 205-215.
11. Comporti M, Pompella A, Toxicological Significance of Free Radicals, Free Radicals in the Environment, Medicine and Toxicology. Edited by H. Nohl, Esterbauer H, Rice-Evans C, 1994, Richelieu Press, London.
12. Coudray C, Charlon V, Leiris J, Favier A, Effect of Zinc Deficiency on Lipid Peroxidation Status and Infarct Size in Rat Hearts. *Inter J Cardiol*, 1993, 41: 109-113.
13. D'Armiento FP, Di Gregorio F, Ciafre SA, 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*, 1993, 82:823-8.
14. Del Maestro, Yagi K, Lipid Peroxides and Human Diseases. *Chem Phys Lipids*, 1987; 45: 337-51.
15. Di Pierro D, Tavazzi B, Lazzarino G, Giardina B, Malondialdehyde is a Biochemical Marker of Peroxidative Damage in the Isolated Reperfused Rat Heart. *Molec Cell Biochem*, 1992, 116 (1-2):193-196.
16. Dizdaroğlu M, Chemistry of Free Radical Damage to DNA and Nucleoproteins: DNA and Free Radicals. Edited by Halliwell & OI Aruoma & E Horwood, New York, 1993, 19-39.
17. Esterbauer H, Wag G, Puhl H, Lipid Peroxidation and Its Role in Atherosclerosis. *Brit Med Bull*, 1993, 49 (3): 566-576.
18. Flitter WD, Free Radicals and Myocardial Reperfusion Injury. *Brit Med Bull*, 1993, 49 (3):545-555.

19. Freeman B, Crapo J, Biology of Disease; Free Radicals and Tissue Injury. Lab Invest, 1982, 47 (5):412-426.
20. Gerlach M, Riederer P, Youdim MB, The Molecular Pharmacology of L-Deprenyl. Eur J Pharmacol, 1992, 226 (2): 97-108.
21. Gey KF, Prospects For The Prevention of Free Radical Disease, Regarding Cancer and Cardiovascular Disease. Brit Med Bullet, 1993, 49 (3): 679-699.
22. Grisham MB, Reactive Meabolites of Oygen and Nitrogen in Biology and Medicine. 1992, RG Landes Comp, Austin / Georgetown:5-28.
23. Glover Vivette, Sandler Merton, Clinical Chemistry of Monoamine Oxidase. 1986, Cell Biochem Func, 4: 89-97.
24. Habif S, Kalsiyum Kanal Blokerlerinin Oksidan ve Antioksidan Savunma Sistemlerine Etkileri. 1992, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi.
25. Hagihara M, Nishigaki I, Maseki M, Yagi K. Age Dependent Changes in Lipid Peroxide Levels in the Lipoprotein Fractions of Human Serum. J Gerontol, 1984, 39:269-272.
26. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE, Free Radicals, Antioxidants and Human Disease: Where Are We Now? J Lab Clin Med, 1992, 119 (6): 598-620.
27. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine (2nd ed), 1989, Clarendon Press, Oxford
28. Harman D, Free Radical Involvement in Aging. Drugs & Aging, 1993, 3 (1): 60-80.

29. Hayakawa M, Sugiyama S, Hattori K, Takasawa M, Ozawa T. Age-associated Damage in Mitochondrial DNA in Human Hearts. *Mol Cell Biochem*, 1993, 119 (1-2):95-103.
30. Holley AE, Cheeseman KH, Measuring Free Radical Reactions in vivo. *Brit Med Bull*, 1993, 49 (3): 494-505.
31. Janero DR, Hreniuk D, Shariff HM, Hydroperoxide-induced Oxidative Stress Impairs Heart Muscle Cell Carbohydrate Metabolism. *Am J Physiol*, 1994, 266: C179-C188.
32. Kaneko M, Masuda H, Suzuki H, Matsumoto Y, Kobayashi A, Yamazaki N, Modification of Contractile Proteins by Oxygen Free Radicals in Rat Heart. *Mol Cell Biochem*, 1993, 125: 163-169.
33. Kılınç K, Oksijen Radikalleri; Üretilmeleri, Fonksiyonları ve Toksik Etkileri. *Biyokimya Dergisi*, 1985, 10:59-89.
34. Klug D, Rabani J, A Direct Demonstration of the Catalytic Action of Superoxide Dismutase Through the Use of Pulse Radiolysis. *J Biol Chem*, 1972, 247:4839-4842.
35. Knight JA, Smith SE, Kinder VE, Anstall HB. Reference Intervals For Plasma Lipoperoxides: Age, Sex, and Specimen Related Variations. *Clin Chem*, 1987, 33:2289-2291.
36. Knoll J, The Pharmacological Basis of the Beneficial Effects of (-) Deprenyl in Parkinson's and Alzheimer's Diseases. *J Neural Transm Suppl*, 1993, 40 P: 69-91.
37. Kraml M, A Rapid Fluorometric Determination of MAO. *Biochem Pharmacol*, 1965, 14: 1684-6.

38. Lai JCK, Leung TKC, Lim L, Monoamine Oxidase Activities in Liver, Heart, Spleen and Kidney of the Rat. *Exp Gerontol*, 1982, 17: 219-225.
39. Laux G, Volz HP, Möller HJ, Newer and Older Monoamine Oxidase Inhibitors. *CNS Drugs*, 1995, 3 (2): 145-158.
40. Lepage G, Munoz G, Champagne J, Roy CC. Preparative Steps Necessary For The Accurate Measurement of Malondialdehyde by High-Performance Liquid Chromatography. *Anal Biochem*, 1991, 197: 277-283.
41. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement With the Folin-Phenol Reagent. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265-75.
42. Luck H, Catalase. "Methods of Enzymatic Analysis"den. Edited by H.U. Bergmeyer, 1965, 2. Baskı, Verlag Chemie GmbH, USA.
43. McCord Joe M.; Oxygen-Derived Free Radicals in Postischemic Tissue Injury. *New Eng J Med*, 1985, 312 (3), 159-63.
44. Menasche P, Piwnica A, Free Radicals and Myocardial Protection: A Surgical Viewpoint. *Ann Thorac Surg*, 1989, 47: 939-45.
45. Menteş G, Gabay S, İtil T, In vivo Inactivation of Human Blood Platelet Monoamine Oxidase by 2-phenyl-cyclopropylamine and Its Effect on Platelet Serotonin.
46. 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): 3170-3175.

47. Murphy MP, Wu PH, Milgram NW, Ivy GO, Monoamine Oxidase Inhibition by L-Deprenyl Depends on Both Sex and Route of Administration in the Rat. *Neurochem Res*, 1993, 18 (12): 1299-1304.
48. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, Harper's Biochemistry, 22nd edition, 1991, Typopress, Lübnan.
49. Muscari C, Guarnieri C, Biagetti L, Finelli C, Caldarera CM, Influence of Age on Oxidative Damage in Mitochondria of Ischemic and Reperfused Rat Hearts. *Cardioscience*, 1990, 1: 275-278.
50. Mutaf I, Eksperimental Diabette Plazma ve Doku Lipid Peroksidleri. 1990, EÜTF Biyokimya Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi
51. Naqui A, Chance B, Reactive Oxygen Intermediates in Biochemistry. *Ann Rev Biochem*, 1986, 55:137-166.
52. NATO/ASI Kurs notları. Modulation of Cellular Responses in Toxicity, 1994, İtalya.
53. Oberley LW, Buettner GR, Role of Superoxide Dismutase in Cancer: A Review. *Can Res*, 1979; 39:1141-1149.
54. Oguro T, Onodera T, Aida K, Ashraf M, Ultrastructural Effects of Hydrogen Peroxide on the Sarcolemma of Rat Heart. *Am J Cardiovasc Path*, 1992, 4 (3): 265-276.
55. Oksidan Stress ve Hücre Hasarı Kurs Notları-TTB Tıpta Temel Bilimler Kolu, 1993, Ankara.
56. Omar R, Nomikos I, Piccorelli G, Savino J, Agarwal N, Prevention of Postischemic Lipid Peroxidation and Liver Cell Injury by Iron Chelation. *Gut*, 1989, 30:510-514.

57. Özdemir G, Reaktif Oksijen Partikülleri, Roche Bilimsel Eserler Serisi, 1993, Eskişehir.
58. Özer NK, Boscoboinik D, Azzi A, New Roles of Low Density Lipoproteins and Vitamin E in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Biochem Mol Biol Int*, 1995, 35 (1):117-124.
59. Pedersen JZ, Finazzi-Agro A, Protein Radical Enzymes. *FEBS Letters*, 1993, 325 (1,2):53-58.
60. Pompella A, Comporti M, The Use of 3-hydroxy-2-naphthoic acid hydrazide and Fast Blue B For The Histochemical Detection of Lipid Peroxidation in Animal Tissues. *Histochemistry*, 1991, 95: 255-262.
61. Pompella A, Maellaro E, Casini AF, Ferrali M, Cixoli L, Comporti M. Measurement of Lipid Peroxidation in vivo: A Comparison of Different Procedures. *Lipids*, 1987, 22:206-211.
62. Pordany GB, Richter J, Koltai M, Aranyi Z, Pogatsa G, Schaper W, Is Malondialdehyde a Marker of the Effect of Oxygen free Radicals in Rat Heart Tissue? *Basic Res Cardiol*, 1991, 86: 266-272.
63. Porter NA, Chemistry of Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol*, 1984, 105: 273-282.
64. Radi R, Sims S, Cassina A, Turrens JF, Roles of Catalase and Cytochrome c in Hydroperoxide-Dependent Lipid Peroxidation and Chemiluminescence in Rat Heart and Kidney Mitochondria. *Free Radical Biology & Medicine*, 1993, 15: 653-659.
65. Rangan U, Bulkley GB, Prospects For Treatment of Free Radical-Mediated Tissue Injury. *Brit Med Bull*, 1993, 49 (3): 701-717.

66. Ray RS, McCord JM, Ischemia Induced Conversion of Xanthine Dehydrogenase to Xanthine Oxidase. *Fed Proc*, 1982, 41: 767.
67. Saura J, Richard JG, Mahy N. Age-related Changes on MAO in B1/C57 Mouse Tissues: A Quantitative Radioautographic Study. *J Neural Transm Suppl*, 1994, 41 P: 89-94.
68. Simonson SG, Zhang J, Canada AT, Su YF, Benveniste H and Piantadosi C, Hydrogen Peroxide Production by Monoamine Oxidase During Ischemia-Reperfusion in the Rat Brain. *J Cereb Blood Flow and Metab*, 1993, 13 (1): 125-134.
69. Sevanian A, Hochstein P. Mechanisms and Consequences of Lipid Peroxidation in Biological Systems. *Ann Rev Nutr*, 1985, 5:365-390.
70. Sözmen E, Doku Hasarında Antioksidan Enzim Değişiklikleri. 1994, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Tezi.
71. Slater TF. Overview of Methods Used For Detecting Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol*, 1984, 105: 283-293.
72. Slater TF, Free Radical Mechanisms in Tissue Injury. *Biochem J*, 1984; 222: 1-15.
73. Slater TF, Del maestro RF, An Approach to Free Radicals in Medicine and Biology. *Acta Physiol Scand*, 1980, suppl 492:153-68.
74. Smith EL, Hill RL, Lehman IR, Lefkowitz RJ, Handler P, White A, Principles of Biochemistry, 7th edition, 1983, Mc-Graw Hill Inc, USA.

75. Sohal RS, Sohal B, Brunk UT, Relationship Between Antioxidant Defenses and Longevity in Different Mammalian Species. *Mech Ageing Dev*, 1990, 53 (3): 217-227.
76. Strolin Benedetti M, Thomassin J, Tocchetti P, Dostert P, Kettler R, Da Prada M, Species Differences in Changes of Heart Monoamine Oxidase Activities with Age. *J Neural Transm Suppl*, 1994, 41P: 83-87.
77. Szelenyi I (ed). *Inhibitors of Monoamine Oxidase B: Pharmacology and Clinical Use in Neurodegenerative Disorders*. 1993, Birkhauser Verlag, Basel.
78. Tipton KF, *Enzymology of Monoamine Oxidase*. *Cell Biochem Func*, 1986, 4: 79-87.
79. Tipton KF, *Kinetic Mechanism and Enzyme Function*. *Biochem Soc Trans*, 1980, 8: 242.
80. Valenzuela A, *The Biological Significance of Malondialdehyde Determination in the Assessment of Tissue Oxidative Stress*. *Life Sciences*, 1990, 48: 301-309.
81. Veral A, *Serum ve Trombositlerde Yaş ve Cinse Bağlı Monoamin Oksidaz Değişimleri*. 1996, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi.
82. Vertechy M, Cooper MB, Ghirardi O, Ramacci MT, *Antioxidant Enzyme Activities in Heart and Skeletal Muscle of Rats of Different Ages*. *Exp Gerontol*, 1989, 24: 211-218.
83. Vladimirov YA, Olenev VI, Suslova TB, Cheremisina ZP. *Lipid Peroxidation in Mitochondrial Membrane*. *Adv Lipid Res*, 1980, 17: 173-249.

84. Ward PA, Till GO, Hatherill JR, Annesley TM, Kunkel RG. Systemic Complement Activation, Lung Injury and Products of Lipid Peroxidation. *J Clin Invest*, 1985, 76:517-527.
85. Weisiger RA, Fridovich I. Superoxide Dismutase, Organelle Specificity. *J Biol Chem*, 1973; 248 (10): 3582-3592.
86. Wendel A, Enzymes Acting Against Reactive Oxygen. *Adv Clin Enzymol*, 1988, 6:161-167.
87. Wong SHY, Knight JA, Hofer SM, Zaharia O, Leach CN, Sunderman FW, Lipoperoxides in Plasma as Measured by Liquid-Chromatographic Separation of Malondialdehyde-Thiobarbituric Acid Adduct. *Clin Chem*, 1987, 33 (2): 214-220.
88. Wu RM, Chiueh CC, Pert A, Murphy DL, Apparent Antioxidant Effect of L-Deprenyl on Hydroxyl Radical Formation and Nigral Injury Elicited by MPP+ in vivo. *Eur J Pharmacol*, 1993, 243 (3): 241-247.
89. Yagi K, Lipid Peroxides and Human Diseases. *Chem Phys Lipids*, 1987, 45: 337-351.
90. Yuan G, Kaneko M, Masuda H, Hon RB, Kobayashi A, Yamazaki N, Decrease in Heart Mitochondrial Creatine Kinase Activity Due to Oxygen Free Radicals. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1140: 78-84.
91. Zhang J, Piantadosi CA, Prevention of H₂O₂ Generation by Monoamine Oxidase Protects Against CNS O₂ Toxicity. *Am Physiol Soc*, 1057-1061.
92. Zoller DP, The Physiology of Aging. *Am Fam Phys*, 1987, 36 (1): 112-116.

ÖZGEÇMİŞ

05.01.1964 tarihinde İzmir'de doğdum.

İlköğrenimimi İzmir Hakimiyet-I Milliye İlkokulu'nda, orta ve lise öğrenimimi İzmir Özel Amerikan Kız Lisesi'nde tamamladım.

1981 yılında Ege üniversitesi Tıp Fakültesi'ne girdim. 1987 yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden tıp doktoru olarak mezun olduktan sonra zorunlu hizmetimi tamamladım. 1990 yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde doktora eğitimime başladım.

