

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

**DENEYSEL OLARAK KARACİĞER İSKEMİ
REPERFÜZYON HASARI OLUŞTURULAN
KOBAYLARDA OKSİDAN VE ANTİOKSİDAN
SİSTEMİN İNCELENMESİ**

79490

DOKTORA TEZİ

Dr.Nevin İLHAN

FIRAT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

79490

YÜKSEK ÖĞRETİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
FIRAT ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DANIŞMAN
Y.Doç.Dr.İhsan HALİFEOĞLU

ELAZIĞ-1998

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
1-ÖNSÖZ	1
2-GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
3-GENEL BİLGİ.....	3
4-MATERYAL VE METOT.....	48
5-BULGULAR	65
6-TARTIŞMA VE SONUÇ.....	75
7-ÖZET.....	96
8-SUMMARY.....	98
9-KISALTMALAR.....	100
10-KAYNAKLAR.....	102
11-ÖZGEÇMİŞ.....	115
12-TEŞEKKÜR.....	116

I.ÖNSÖZ

Serbest radikaller bir veya daha fazla sayıda çiftleşmemiş elektron içeren oldukça reaktif ve toksik bileşiklerdir. En önemli radikaller oksijenden türetildiği için serbest oksijen radikalleri (SOR) olarak da adlandırılmaktadır. Doku hasarının fizyopatolojik mekanizmasında SOR'lar en önemli yere sahiptir. Vücutta normal metabolizmanın işleyişi sırasında oluşan serbest radikaller yine intraselüler antioksidan ajanlar tarafından berteraf edilirler.

Reaktif oksijen metabolitlerine ve bunların toksik etkilerine karşı, çok sayıda antioksidan madde ile karşı koyulur, radikal hasarı sınırlandırılmaya çalışılır. Birbirinden bağımsız olarak çalışan çok sayıdaki antioksidan sonuçta fonksiyonel olarak aynı işlevi yerine getirirler. Hücre içinde oksijenin metabolize olduğu her yerde, oksijen ara metabolitlerini azaltmak için çalışan süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz antioksidan defans sisteminin major enzimleridir. Yine membranda oluşan lipofilik radikallerle savaşılan vitamin E ve β -karoten, hücre dışında bulunan düşük molekül ağırlıklı bir çok molekül de (ürük asit,bilirubin, haptoglobulin, askorbik asit v.b. gibi) antioksidan olarak görev yapar.

İskemi, organa gelen kan akımında yetersizlik, reperfüzyon ise yeniden kanlanmanın olması diye kısaca özetlenir. İskemi ve daha fazla olarakta reperfüzyondan sonra doku üzerine ek bir hasar yüklenir ve böylece iyon pompalarında bozukluk, lipid peroksidasyonu, enzim sisteminde değişiklikler ve serbest radikaller ortamda artmaya başlar. Lipid peroksidasyon ürünlerinin artması, serbest radikal oluşum teorisini destekler.

Karaciğer hayatın sürekliliği için önemli metabolik reaksiyonlara ev sahipliği yapan bir organdır. Bu nedenle son yıllarda karaciğer transplantasyon işleminin gerçekleştirilmesi esnasında en az zararın oluşmasını temin etmek açısından çalışmalar bu konu üzerine yoğunlaşmıştır. Deneysel olarak, koyalarda karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarı ile oluşan yapısal değişiklikler ve yapılan uygulamaların etkinliğini araştırmak amacı ile gerçekleştirdiğimiz çalışmamız bir çok biyokimyasal çalışmaya ışık tutacağı kanaatindeyiz.

II. GİRİŞ VE AMAÇ

Serbest oksijen radikalleri (SOR) olarak isimlendirilen süperoksit, serbest hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen metabolitleri, karaciğer gibi yoğun fizyolojik ve metabolik olayların seyrettiği bir organda sürekli olarak üretilmekte ve detoksifiye edilmektedir. Çeşitli karaciğer girişimleri, şok, travma, karaciğer transplantasyonu gibi patolojik olaylar esnasında oluşan doku hasarları serbest oksijen radikallerinin etkisini daha da artırmaktadır (48,136).

SOR'un özellikle iskemi-reperfüzyon hasarındaki rolü son yıllarda en çok çalışılan konular arasına girmiştir. İskeminin neden olduğu patolojik olaylar, özellikle hayatı tehdit eden iskemik kalp hastalığı, serebral iskemi gibi sık karşılaşılan durumlar ve bunlara karşı geliştirilen tedavi yöntemleri ile iskemik dokunun reperfüzyonunun ciddi bir doku hasarı oluşturduğu saptanmıştır (87). Özellikle süperoksit ve hidroksil radikallerinin reperfüzyon sırasında oluştuğu gösterilmiştir. Reperfüzyon hasarı sonucu oluşan fonksiyonel bozukluklar çeşitli organlara göre değişiklikler göstermekle beraber hasardan SOR'un sorumlu olduğu konusu daha da güncellik kazanmıştır. Hasarda adenozin trifosfat (ATP) ve adenozin difosfat (ADP) gibi yüksek enerjili fosfatlar birkaç dakika içinde yıkılmakta ve hücrede protonlar ve inorganik fosfatlar birikmektedir. Bu olay Adenozin-5'-trifosfataz (ATPaz) enzim sistemi gibi hücre içi iyon dengesini sağlayan pompaların bozulmasına neden olmaktadır (87,110). Karaciğer iskemi ve reperfüzyon hasarı; karaciğer transplantasyonu, büyük karaciğer rezeksiyonları, şok, travma, konjestif kalp yetmezliği sırasında oluşur. Bu etkilere karşı koruyucu sistem, vücutta oluşan reaktif oksijen metabolitlerini etkisizleştirmeye yönelik olan antioksidan defans mekanizmasıdır. Reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumu ile ortadan kaldırılması arasındaki denge, antioksidan defans sistemi tarafından düzenlenir. Bu denge radikal oluşumu yönünde bozulunca, oksidatif stres denilen ve hücre nekrozu ve ölümü ile sonuçlanabilen olaylar zinciri oluşur. İskemi-reperfüzyon hasarından karaciğeri korumak için çok sayıda farmakolojik ajanlar kullanılmaktadır (100).

Doku hasarının şiddetini belirlemek amacıyla lipid peroksidasyonu ve değişimleri saptanmış, elde edilen bulguların $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz ile etkileşimleri

tartışılmış, peroksidatif hasarın tedavisi amacıyla çeşitli farmakolojik antioksidan ajanlar kullanılmış ve histopatolojik olarak derecelendirme yapılmıştır.

Bu alışma; deneysel olarak oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarında hasarın derecesini tespit etmek, kullanılan antioksidan ajanların etkinliğini göstermek, hasarda $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz ve diğer enzim sistemlerinin rolünü açıklamak, histopatolojik deşiklikleri incelemek amacı ile yapılmıştır.

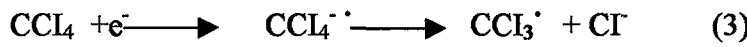


III.GENEL BİLGİLER

III. A. Serbest Oksijen Radikallerinin Tarihçesi ve Anlamı

Organik serbest radikallerin ilk tanımı 1900 yılında GOMBERG tarafından yapılmıştır. Araştırmacı, canlı organizma içerisinde doğal olarak serbest radikallerin oluşabileceğini ileri sürmüştür. MİCHEALİS ise enzimatik reaksiyonlar sırasında serbest radikallerin oluşabileceğini ve metabolik reaksiyonlarda oluşan tek elektron reaksiyonlarının önemli olabileceğini belirtmiştir. Ancak 1966 yılında karbontetraklorürün (CCl₄) neden olduğu doku hasarlarındaki biyokimyasal patolojinin ortaya çıkması bu mekanizmanın önemini artırmıştır (113).

Radikal kelimesi latince “KÖK” anlamına gelen radix kelimesinden türetilmiştir. 1969 yılında Mc CORD ve FRİDOWICH, oksijen ile yaşayan tüm canlılarda normal metabolik işlemler sırasında serbest oksijen radikallerinin üretildiğini ve bunun biyolojik bir bozukluk olmadığını belirtmişlerdir. Terminoloji olarak serbest radikaller, en az bir çiftleşmemiş elektron taşıyan atom veya molekül anlamına gelir. Serbest radikaller diğer moleküllerle birleşerek dış yörüngelerindeki elektron sayısını çiftleştirmeye böylece kararlı bileşiklere dönüşmeye çalışmaktadırlar. Anyonik, katyonik ve nötral karakterde olan serbest radikallerin kimyasal reaktiviteleri oldukça güçlüdür.



1 no’lu reaksiyonda fenotiazin grubu bir ilaç olan prometazin, hidroksil radikali tarafından okside olarak prometazin radikal katyonu oluşmakta, 2 no’lu reaksiyonda oksijen, bir elektron alarak süperoksit radikal anyonuna indirgenmekte, 3 no’lu reaksiyonda ise CCl₄ dissosiyatif elektron alışverişiyle nötral triklorometil radikal formu şeklinde bulunmaktadır (55,120).

Atmosferde oksijenin çok uzun yıllardan beri bulunduğu kabul edilmektedir. Buna karşın ölçülebilir yoğunluğa ulaşması 2 milyar yıl öncesinde fotosentez yapabilen mavi-yeşil alglerin ortaya çıkmasıyla birlikte olmuştur. Canlılar için oksijenin önemi, iki temel fonksiyon görmesinden kaynaklanır. İlki, canlı organizmaları oluşturan moleküllerin yapısına katılması ve besin maddelerinin ana

elementlerinden biri olmasıdır. İkincisi, oksijenin canlılarda meydana gelen oksidasyon tepkimeleri ile solunum sisteminde rol almasıdır. Bu durum aerobik canlılar için geçerlidir (31,48,62,65,71,106).

Canlılar moleküler oksijene olan gereksinimlerine göre Aerobik, Anaerobik ve Fakültatif anaeroblar olmak üzere üç sınıfta toplanabilir. Yaşamları için oksijene devamlı olarak gereksinim duyan aerobik canlılarda oksijene acil ve mutlak gereksinim, oksijeni elektron transport zincirinde (ETZ) son elektron alıcısı olarak kullanmalarından ileri gelir. Anaerobik canlılar moleküler oksijenin varlığına tolerans göstermezler. Fakültatif anaeroblar ise oksijenli ortamda yaşayabilseler bile ya oksijeni hiç kullanmazlar veya oksijeni sınırlı bir düzeye kadar metabolize ederler. Fakat hiçbir zaman oksido-redüksiyon tepkimelerinde oksijeni son elektron alıcısı olarak kullanmazlar (71).

Aerobik metabolizmaya bağımlı olan organizmaların gelişebilmeleri için biyokimyasal bir savunma sistemine gerek vardır. Bu sistem; hücrelerdeki işlemler sırasında ortaya çıkabilecek aşırı oksidasyondan hücrenin ana elemanlarını ve dolayısıyla canlıyı korumaktadır. Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve Katalaz (CAT) gibi hücre içi enzimler bu koruyucu sistemde görev almaktadır (31,48,65,71,106).

Aerobik canlılarda metabolik işlemler sırasında serbest oksijen radikalleri kaçınılmaz bir şekilde üretilmektedir. Bu nedenle normal metabolizma sırasındaki oksido-redüksiyon reaksiyonlarının ürünleri olan SOR oluşması, biyolojik bir bozukluk olarak değerlendirilmemelidir (30,31,65). Ancak; hiperoksi, iskemi, inflamasyon, radyasyon, antibiyotik tedavisi gibi bazı hücresel metabolik durumlarda büyük oranda üretilen SOR, membranlar, enzimler, nükleik asitler ve polisakkaritler üzerinde toksik etkiler yaparak çeşitli dokuların hasarına neden olmaktadır (19,74,140).

III.B.Serbest Radikal Kaynakları

Membran bütünlüğünün ve membran fonksiyonunun hücrenin yaşayabilmesinde temel önemi vardır. Plazma membranı; membrana bağlı enzim destekleyicisi olan doymamış yağ asidinden zengin olduğu için serbest radikaller ile kolaylıkla reaksiyona girebilir ve peroksidasyona uğrayabilirler. Bu toksik maddeler

plazma membranını bozarak hücrenin iç biyokimyasal çevresinin düzenlenmesini etkileyebilir, yaralanmasına yol açabilir, membranın fonksiyonu ve akışkanlığını değiştirebilirler. Bu mekanizma şöyle özetlenebilir: Serbest radikal oluşumu ile hücrede glukoz-6-fosfataz enzimi inaktive olur, membran permeabilitesi artar. Lipid peroksidasyonuna bağlı olarak organellerde fonksiyon bozukluğu oluşur, lizozomal frajilite artışı ile mikrozomal enzimlerde değişiklikler meydana gelir, hücre ölümü ve kollajen oluşumunda artış görülür. Biyomembranlardaki peroksidatif olaylar hücre ve organel membranlarının yapısal bütünlüğünün değişmesine ve lipidlerin basit harabiyetinden daha şiddetli olarak biyofiziksel ve biyokimyasal değişikliklere yol açar. Oksidasyon oluşurken membranlar daha sertleşir ve akışkanlığı azalır, membrandaki iyon pompaları ve membran permeabilitesi değişir. Potasyum iyonları dışarı sızar, kalsiyum iyonları içeri girer (17,74,121). Bu durum ise birçok hastalığın patolojisinin açıklanmasında önemli bir göstergedir.

Hiperoksijenasyon, iskemi/reperfüzyon, inflamasyonlu hastalıklar, toksik doku yaralanmaları gibi durumlarda SOR'ların önemli rol oynadığı açıktır. Bununla birlikte SOR aracılığıyla nötrofiller; bakterileri öldürmekte, radyasyon; normal ve malign dokulara zarar vermekte, bir çok ilaç karsinojen, toksik ajan etkisi göstermektedir (18,37,106,108,142). Serbest radikallerin geniş bir hastalık grubunda etkin olduğu Bulkley tarafından basitleştirilmiş bir tablo ile şu şekilde özetlenmiştir (18):

1-Normal biyolojik işlemler;

a-Oksijenli solunum

b-Katabolik ve anabolik işlemler

2-Oksidatif stres yapıcı durumlar

a-İskemi-reperfüzyon sendromları

Miyokard infarktüsü

Mide mukozasında stres ülseri

Nekrozitan enterokolit

Organ prezarvasyonu ve transplantasyon

Şok sonrası karaciğer yetmezliği

Serebral iskemi

Kol ve bacak iskemisi (postreperfüzyon sendromu)

Akut renal túbüler nekroz

b-Toksik doku yaralanmaları

Aspirasyon pnomonisi

Pankreatit

Özefajit

c-İltahabi hastalıklar

Nötrofil fagozitozu

Artrit

İltahabi barsak hastalıkları

Bağ dokusu hastalıkları

İmmün yetmezlikler

d-Eksojen toksik ajanlar

Radioaktivite

Alloksan

Karbon tetra klorür

Kemoterapötik ajanlar

Nitrofurantoin

Paraquat

e-Ksenobiotiklerin etkisi

İnhale edilenler

Alışkanlık yapan maddeler

İlaçlar

f-Stres ile artan katekolaminler

g-Fagositik inflamasyon hücrelerinde salgılanma

h-Genel

Yaşlanma

Dolaşım şoku

Periferik ödem

III.C. Oksijen Molekülünün Temel Durumu

Bir atomda elektron dağılımını inceleyecek olursak, elektronların alt kabuklardan ve bunlarında elektron içeren orbitallerden oluştuğu düşünülmektedir.

Birincil kuantum sayısı olarak isimlendirilen n kabuk sayısını, açısal momentum kuantum sayısı β ise alt kabuk sayısını ifade eder. n kuantum sayısı, elektronların bulunduğu esas enerji seviyesini verir. Aynı zamanda, elektronların çekirdeğe olan uzaklığını da yaklaşık olarak belirtir. n baş kuantum sayısı, sıfır dışında 1'den itibaren tam ve pozitif sayıdır. β veya ℓ ikincil kuantum sayısı (orbital kuantum sayısı) ile n arasındaki ilişki ise; ℓ , 0 ile $(n-1)$ arasında değer alır. Magnetik kuantum sayısı $m\beta$ ise; orbital sayısını gösterip $m\beta = +\beta, +(\beta-1), \dots, 0, \dots, -(\beta-1), -\beta$ değerlerini alabilir. $\beta=0$ için bulunan orbital s, $\beta=1$ için ise bulunan orbital p dir. P orbitali uzayda birbirlerine dik x,y ve z olmak üzere 3 orbitale ayrılır.

Tüm orbitaller iki elektron içerir ki bunlara çiftlenmiş elektron denir. Her bir orbitaldeki bu çift elektronlar birbirilerine zıt spinlerdedir ($\uparrow\downarrow$). Atom numarası 8 olan 8 elektronlu oksijen atomunun orbitalleri ve orbital sembolleri şöyledir;

Orbital diyagramı	Elektronik sembolleri
$ \begin{array}{c} \underline{1s} \quad \underline{2s} \quad \underline{\quad} \quad \underline{2p} \\ 8^0 \uparrow\downarrow \quad \uparrow\downarrow \quad \uparrow\downarrow \quad \uparrow \quad \uparrow \end{array} $	$1s^2 \quad 2s^2 \quad 2p^4$

s ve p atomik orbitallerinin oluşturduğu moleküler orbitaller sigma (σ) ve pi(π) sembolleriyle gösterilirler. s atomik orbitallerinde nükleuslar arası mesafede elektron dansitesi fazla ise "sigma bağ yapan moleküler orbital" (σ), nükleuslar arası mesafe dışında elektron dansitesi fazla ise "sigma bağ yapmayan moleküler orbital" (σ^*) ifade ve sembolleri kullanılır. p atomik orbitalleri için de aynı şekilde "pi bağ yapan moleküler orbital" (π) ve "pi bağ yapmayan moleküler orbital" (π^*) leri mevcuttur ve daha yüksek enerji seviyelerini gösterir (37).

Oksijen atomunun değerlik elektronları 6'dır. İki atomda toplam 12 değerlik elektron mevcuttur. Her bir atomda 8 elektrona sahip olan oksijen molekülünün oktet kuralına göre 16 elektronu olmalıdır. $16-12=4$. Bu 4 elektron iki atom arasında ortak olarak kullanılır. Bu ortaklaşmada ki herhangi bir bozukluk toksik oksijen veya serbest oksijen radikali olarak ifade edilmektedir. Yukarıda bahsedilen, son yörüngelerinde tek sayıda elektron taşıyan bu toksik bileşikler (serbest radikaller) metabolik olaylar esnasında kendiliğinden meydana gelir. Birçok kararlı molekül dış yörüngelerinde çift sayıda elektron içerirler. Her elektron ise birbirinin ters yörüngeye sahiptirler. Böylece molekül stabilize olmuş olur. Serbest radikaller dış

yörüngelerinde tek sayıda elektron içerdiklerinden kararsız ve çok reaktif bileşiklerdir. Sözkonusu olan serbest radikaller diğer moleküllerle birleşerek dış yörüngelerindeki elektron sayısını çiftleştirmeye ve böylece kararlı bileşiklere dönüşmeye çalışırlar (21,37).

III. D. Oksijen Kaynaklı Ajanlar

Oksijen, havada nitrojenden sonra en yüksek oranda bulunan moleküldür. Canlılarda iki temel fonksiyonu vardır. Birincisi yapısal bir fonksiyon olup organizmayı oluşturan ve besin kaynağı olan maddelerin yapısına katılmak, ikincisi fonksiyonel nitelikte olup; aerobik canlılarda meydana gelen oksidasyon tepkimeleri sonucu solunum sisteminde rol alması şeklindedir. Oksijenin bu fonksiyonel görevi aerobik canlılar için geçerlidir. Bu oksidasyon tepkimeleri yaşam için şart olup tepkimeler esnasında oksijen molekülünden toksik olabilecek ara ürünlerde oluşur ki bunlara genel olarak "Reaktif Oksijen Türevleri" denir ve daha çok serbest oksijen radikalleri (SOR) diye isimlendirilir (58,62,143).

Serbest radikaller, bir yada daha fazla sayıda çiftleşmemiş elektronlara sahip moleküllerdir ve oldukça reaktiftirler. Bu tanımın içine hidrojen atomu, geçiş metal iyonları ve oksijen molekülü girmektedir. Serbest radikallerdeki çiftleşmemiş elektron, ya oksidasyon reaksiyonuna girerek kaybedilmeye veya kendine bir eş elektron alarak redüksiyona uğrama eğilimindedir. Bu sayede çiftleşerek daha stabil ürünler oluştururlar. Bundan dolayı serbest radikaller oksidasyon-redüksiyon tepkimelerinde genellikle reaktan veya ürün olarak karşımıza çıkarlar. Çiftleşmemiş elektronların bu eğilimleri serbest radikallerin yüksek reaktivitelerinin temelini oluşturur (13,56,62,143).

Serbest oksijen radikalleri inorganik veya organik olabilirler. Organik olan radikaller, poliansatüre yağ asidi gibi kompleks moleküllerden türeyen peroksi (ROO[•]), allil (R[•]), ve alkoksil (RO[•]) radikali, inorganik olanlar ise süperoksit (O₂^{-•}), hidroksil radikali (OH[•]), nitrik oksit (NO[•]) dir (53).

Serbest radikaller üç yolla üretilir:

1-Normal bir molekülden bir elektron kaybıyla; $A + e^- \rightarrow A^{\bullet}$

2-Normal bir molekülün kovalent bağının homolitik birleşmesi ile;



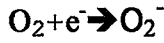
3-Normal bir moleküle bir elektronun eklenmesiyle (Heterolitik birleşme);



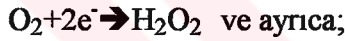
Ultraviyole (U.V) ışınları veya radyasyon enerjisi heterolitik füzyonda elektronlardaki fragmanlardan sadece birisini tutar. Kaynak molekülden serbest radikal meydana gelmez, fakat iyon oluşturur ki bu da yüklüdür. Serbest radikaller pozitif, negatif veya nötral yüklü olabilirler (21,120).

Biyolojik sistemlerin önemli radikalleri, moleküler oksijenin kendisi veya çiftleşmemiş iki elektron içeren dioksijendir. Özet olarak diyebiliriz ki; biyolojik sistemin en önemli radikalleri oksijenden türetilir (21,37,50,53,63,129).

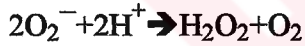
Oksijenin bir elektronunun indirgenmesi sonucu süperoksit anyonu oluşur.



Oksijenin iki elektronunun indirgenmesi sonucu hidrojen peroksit oluşur.



H_2O_2 , biyolojik sistemde iki süperoksit anyonunun birleşmesiyle de oluşur.

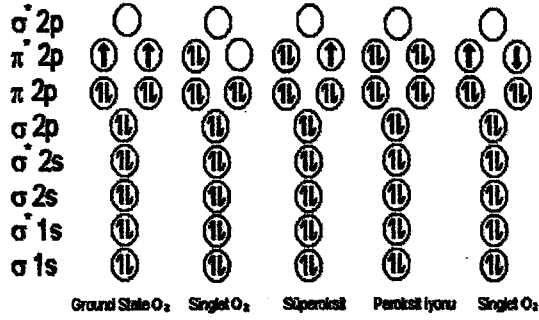
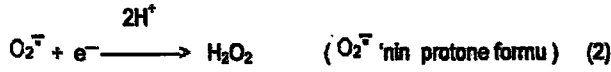


MOLEKÜLER OKSİJENİN İNDİRGENME DURUMU

<u>e⁻ sayısı</u>	<u>proton almamış</u>	<u>proton almış</u>
0	O_2	O_2
1	$O_2^{\cdot-}$	HO_2^{\cdot}
2	$O_2=$	H_2O_2
3	$O^{\cdot-} + O=$	$OH^{\cdot} + H_2O$
4	$O= + O=$	$H_2O + H_2O$

Kısaca; moleküler oksijene bir, iki veya üç elektron eklenmesi sonucu sırasıyla süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali oluşmaktadır (85,86).

Oksijenin temel durumu ve elektron dağılımı, değişmiş ürünlerinin moleküler yapıları Şekil 1' de gösterilmiştir (37,63).



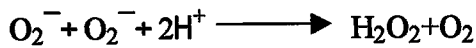
Şekil 1. Oksijen molekülünün orbital konfigürasyonu

III .D.1.Süperoksit Radikali Ve Üretimi (O₂⁻)

Süperoksit radikali, başlangıçta sadece radyasyon kimyasında kullanılan bir form iken son yıllarda hem biyotik hemde abiyotik sistemde dioksijenin indirgenmesiyle birçok biyolojik substansın otooksidasyonu sırasında üretilmektedir. Bunlara örnek; epinefrin, tetrahidroksipterin, lökoflavinler, tioller, redükte ferrodoksinlerdir. O₂⁻, oksidatif enzimler oluşumuyla mitokondri, kloroplast, nükleus, mikrozomlarda ve hatta fagozitik tipteki bütün hücrelerde; monosit, makrofaj ve nötrofillerde daima oluşmaktadır (15,48,50).

O₂⁻; süperoksit dismutaz (SOD) adı verilen enzim ailesinin katalize ettiği reaksiyonlar ile elimine edilir.

SOD



Bu reaksiyonun spesifik katalizörü olmadığı halde nötral pH da oldukça hızlıdır. SOD'un potansiyel fonksiyonu kendiliğinden ve enzimatik dismutasyon reaksiyonlarının karşılaştırılmasıyla iyice aydınlatılmıştır. Dismutasyon tepkimelerinde; enzimatik yol birinci derece iken, kendiliğinden oluşan yol ise ikinci derece olup, kendiliğinden dismutasyonda O₂⁻ nin yarılanma ömrü O₂⁻ in

konsantrasyonunda azalma nedeniyle daha uzun, enzimatik dismutasyonda ise yarılanma ömrü O_2^- nin konsantrasyonundan bağımsızdır.

Süperoksit radikalleri sulu ortamda önemli ölçüde birikmeyip kendiliğinden dismutasyon ile ortamdaki temizlenirler. Kendiliğinden dismutasyon hız sabiti pH:7.4'de; $O_2^- = 2.08 \times 10^{-8}$ mol/L/sn dir. Bu dismutasyon reaksiyonuyla üretim hızının eşitlenmesi ile denge durumu oluşabilir.

$$2.08 \times 10^{-8} \text{ M s}^{-1} = 7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} [O_2^-]^2$$

$$[O_2^-]^2 = 0.3 \times 10^{-12} \text{ M}^2$$

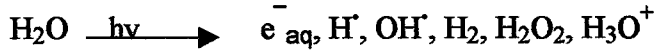
$$[O_2^-] = 0.5 \mu\text{M}$$

Superoksidin denge durumu bu enzim reaksiyonunda, nötral pH'da $0.5 \mu\text{M}$ dur (15,71).

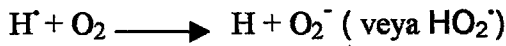
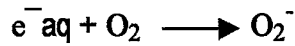
Süperoksit radikali solunum hücrelerinde çoğunlukla suya indirgenerek tüketilir. Bu reaksiyon, süperoksit radikali gibi ara ürünler salınmaksızın siyanür tarafından inhibe edilen sitokrom oksidaz ve 'mavi' bakır oksidaz tarafından gerçekleştirilir (50).

Canlılarda süperoksit radikalının oluşumuna neden olan olay ve etkileri iki grupta toplamak mümkündür.

1-Çevresel etkiler: Çeşitli kimyasal bileşikler ve fiziksel etkenler canlılarda süperoksit radikali oluşumuna neden olurlar. Görünür bölge ışınları, özellikle yüksek enerjili elektromanyetik ışınlar (beta, gama ve X) her oksijenli ortamda süperoksit radikalleri yanısıra, doğrudan diğer radikallerin oluşumunu da sağlarlar. Böyle bir ışın dalgası sulu ortamdan geçince suyun radyolitik parçalanmasına neden olur.

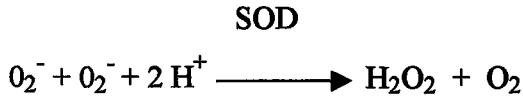


Sulu ortam oksijen içeriyorsa aşağıdaki tepkimelerle süperoksit radikali kolaylıkla oluşur (71).

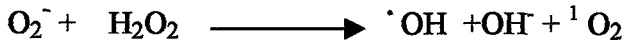


Organik moleküllerin bulunduğu sulu ve oksijenli ortamda radikal oluşumu iki kat artar. Süperoksit radikali; sulu ortamlarda çok zayıf oksidan ve zayıf redüktan ajandır. O_2^- sulu ortamlarda zayıf reaktivitesine rağmen protonsuz ortamlarda kuvvetli baz gibi etki gösterir. Sulu ortamlarda oluşan süperoksit radikali normalde

birikime uğramaz ve kendiliğinden veya enzimatik dismutasyonla ortadan kaybolur (62,71,143).



SOD enziminin yetersiz kaldığı bir ortamda, süperoksit radikalleri kendi dismutasyon ürünü olan H_2O_2 ile tepkimeye girerek hidroksil radikali ve singlet oksijenin üretimine neden olur (Haber-Weiss reaksiyonu)(37,71).



2- Canlı organizmalar radikal oluşumuna neden olan çevre koşullarından tümüyle izole edilseler bile; eğer moleküler oksijeni metabolize ediyorlarsa , organizmalarındaki pekçok tepkimelerle O_2^- üretirler . Canlılarda O_2^- en başlıca önemli tepkimeler şunlardır:

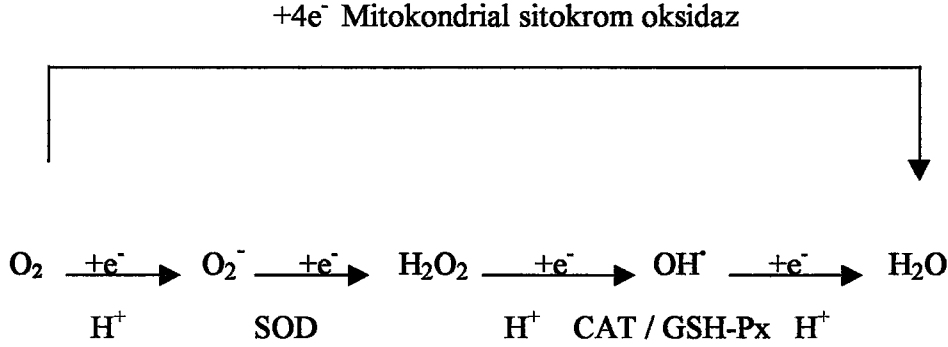
a-Hidrokinonların, lökoflavinlerin ve katekolaminlerin, indirgenmiş boyaların, tetrahidropterin, ferrodoksin ve hemoproteinlerin otooksidasyonu tepkimelerinde O_2^- üretebilirler (15,71).

b-Ksantin oksidaz, dihidrooratat dehidrogenaz ve bir grup flavoprotein dehidrogenazlar gibi enzimatik tepkimelerde O_2^- oluşur.

c-Mikrozomal hidroksilaz, triptofan deoksijenaz, galaktoz oksidaz türü enzimlerin katalitik etkileri sırasında ara ürün olarak O_2^- üretirler.

d-Canlılarda süperoksit radikalinin üretildiği bölgelerin başında mitokondri gelir. Moleküler oksijenin en önemli kullanım yerinin mitokondri iç zarındaki elektron transport zinciri (ETZ) olduğu hatırlanırsa radikal üretimi beklenen bir sonuçtur. Bilindiği gibi mitokondrideki oksijen tüketiminin çok büyük bir kısmından ETZ sorumludur ve sistemdeki son elektron alıcısı oksijendir. Mitokondri iç zarındaki elektron transportu sırasında moleküler oksijen 4 adet elektron alarak suya dönüştürülür ve bu arada ATP sentezlenir (Şekil 2). Bu kademedeki toksik oksijen metabolitleri sentezlenmez. Ancak bu reaksiyon esnasında %1-5 oksijen kaçağı mevcuttur. Kaçak, moleküler oksijene elektron eklenmesiyle redüksiyon başlar ve toksik oksijen metabolitleri oluşur. Mitokondri elektron transport sisteminde O_2^- üreten iki bölgenin bulunduğu gösterilmiştir. Bunlardan birincisi bir flavin bağımlı

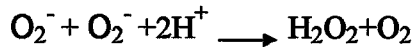
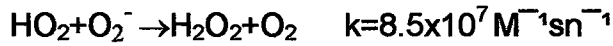
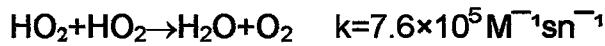
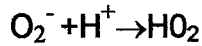
NADH dehidrogenazdır ve mitokondri zarında üretilen süperoksit radikallerinin üçte biri bu bölgeden kaynaklanır. İkinci bölge ise koenzim Q-sitokrom b bölgesi olup, ubikinonun otooksidasyonu ile ETZ de üretilen süperoksit radikalının üçte ikisini oluşturur (71,85,86).



Şekil 2. Serbest oksijen radikallerinin oluşması ve temizlenmesi

e-Önemli ölçüde süperoksit radikalleri fagositoz sırasında, fagositoz yapan hücreler tarafından (nötrofil, eozinofil ve makrofajlar) amaçlı ve enzimatik olarak üretilirler. Bu hücreler bakteriyi fagosit edince NADH oksidaz enziminin etkisiyle moleküler oksijenden süperoksit üretirler ve bunu da bakterilerin parçalanmasında kullanırlar.

Süperoksit radikalleri sulu ortamda önemli ölçüde birikmezler, kendiliğinden dismutasyon ile ortamdan temizlenir veya H₂O₂ oluşturabilir. Kendiliğinden dismutasyon aslında bir tek tepkime değil, bir seri tepkimelerin toplamıdır:



Yukarıdaki bu dismutasyon reaksiyonlarından en tercih edileni süperoksit radikali ile perhidroksi radikali arasındaki tepkimedir. Fakat SOD ile katalizlenen enzimatik dismutasyon hücre içi koşullarda kendiliğinden dismutasyondan 10⁹ kez daha hızlıdır (71,72).

Süperoksit radikali, pKa'sı zayıf bir baz olduğundan, kendiliğinden dismutasyon hızı pH'dan önemli ölçüde etkilenir. Bu nedenle asidik ortamda kendiliğinden dismutasyon daha hızlıdır ve bu koşullarda O₂⁻ den kolaylıkla H₂O₂

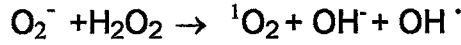
yapılır. Oysa nötral pH veya daha yüksek alkali pH'da iki süperoksit anyonu arasındaki elektrostatik itme nedeniyle kendiliğinden dismutasyon çok daha yavaş ilerler.

Süperoksit radikali üreten tepkimelerde yapılan bu ilk radikal bir seri tepkimelerle oksijenin diğer radikallerinin oluşumuna neden olur. Ortamda biriken süperoksit radikalının girebileceği başlıca tepkimeler şu şekilde özetlenebilir:

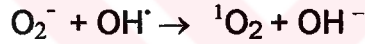
1-Süperoksit radikali, yukarıda verilen tepkimelerle kendiliğinden dismutasyon olabilir.

2-Ortamdan bir proton alarak perhidroksi radikali oluşturabilir.

3-Hidrojen peroksit ile tepkimeye girerek hidroksil radikali (OH[•]) ve singlet oksijen (¹O₂) oluşturabilir:



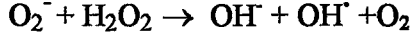
4- Veya diaçil peroksitlerle olduğu gibi, diğer tepkimeler ile singlet oksijen yapımına neden olur:



Oluşumlarına süperoksit radikallerinin neden olduğu yukarıdaki radikaller diğer radikalik tepkimeleri başlatırlar ve süperoksidin kendisinden çok daha reaktif ve toksik radikaller oluşur. Bu nedenle süperoksit radikalleri oluştukları anda uzaklaştırılmazlarsa, diğer radikallerin oluşması kaçınılmazdır. Oksijenin toksik ürünlerinden H₂O₂'in katalaz tarafından parçalanarak ortamdan uzaklaştırıldığı uzun yıllardan beri bilinmektedir. Oysa O₂⁻ radikaline karşı benzer bir enzimatik korunma 1968 yılına kadar bilinmiyordu. Organizmalarda pek çok tepkimelerle üretilen ve diğer radikallerin oluşumunu başlatan O₂⁻ olduğuna göre, aerobik canlılarda oksijenin toksik etkilerine karşı korunma mekanizmasının süperoksit radikallerinin birikmesini önlemek şeklinde olması beklenmelidir. Gerçekten de, canlılarda oksijen toksisitesine karşı savunma bu basamaktadır ve enzimatik bir mekanizmadır. Bu korunma Süperoksit Dismutaz (SOD) tarafından başarılmakta olup, enzimin görevi süperoksit radikallerinin dismutasyonunu katalizlemektedir (37,49,71,85,129).

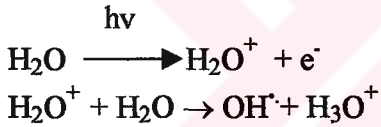
III.D.2.Hidroksil Radikali (OH[•])

Hidroksil radikali son derece saldırgan bir oksidan ajan olup, yüksek hız sabiti ile birçok hücrenel bileşenle reaksiyona girme potansiyelindedir. 1934 yılında Haber ve Weiss, hidrojen peroksitin O₂⁻ ile indirgenmesiyle hidroksil radikali oluşabileceğini göstermişlerdir (21,37,71).

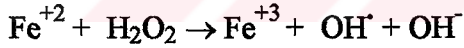


1978 yılında redoks katalizör olarak fonksiyon gören bir metal, örneğin şelat yapmış demir varlığında Haber-Weiss tepkimesinin biyolojik sistemlerde de çalıştığı ve önemli miktarda OH[•] üretildiği gösterildi (Fenton reaksiyonu). *İn vitro* olarak ksantin-ksantin oksidaz sisteminde OH[•] üretildiği daha önceden biliniyordu. Bu deney sisteminde oluşan O₂⁻ radikallerinin bir kısmı kendiliğinden dismutasyonla H₂O₂ oluşturmakta ve biriken H₂O₂, O₂⁻ ile etkilenerek OH[•] yapmaktadır. *İn vivo* olarak hidroksil radikali yapımına neden olabilen önemli tepkimeler şunlardır (71):

1) İyonlaştırıcı radyasyonun suya etkisi ile.

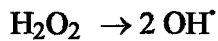


2) Fenton tepkimesi ile.

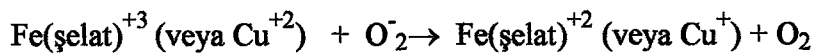


3) Ozona elektron transferiyle OH[•] oluşabilir. Bu nedenle ozon toksisitesinde OH[•] in rolü vardır.

4) Hidrojen peroksitin fotolizisi ile.



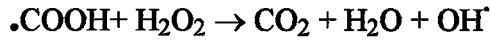
5) *İn vivo* olarak OH[•] üretimi bakımından en önemli tepkime Haber-Weiss tepkimesidir. *İn vivo* olarak, O₂⁻ radikalının H₂O₂ ile OH[•] üretmesi şelat yapmış demir tarafından katalizlenir.





Şelat yapmış demir gereksinimi bakımından bu tepkime Fenton tepkimesine benzemektedir (21,71,129).

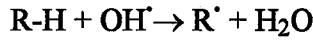
6) Radikal tepkimeleri ile oluşabilen bir organik radikal, H_2O_2 ile tepkimeye girerek OH^\cdot üretebilir.



OH^\cdot üretildiği yerde hemen her molekül ile tepkimeye girebilir ve radikal tepkimelerini başlatabilir. Bu nedenle oksijen radikalleri içinde en reaktif ve en toksik olanı hidroksil radikalidir.

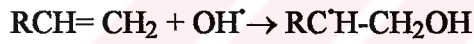
Hidroksil radikalinin katıldığı başlıca tepkimeler üç grupta toplanabilir (71).

1) Hidrojen çıkarma tepkimeleri.



Böylece, lipid peroksidasyonunun başlatarak organik radikal oluşumuna neden olurlar.

2) Hidroksil radikali katma tepkimeleri ile çift bağ içeren aromatik bileşiklere katılır, aromatik amino asitlerin hidroksilasyonuna neden olur.



Aromatik halkaya katma tepkimeleri ile hidroksilasyonların yanısıra, toksik etkili aldehitlerin oluşumuna da neden olur. DNA'nın pürin ve pirimidin bazları gibi aromatik halka yapısındaki bileşiklere eklenebilir.

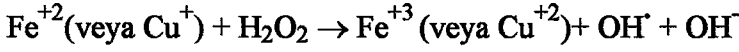
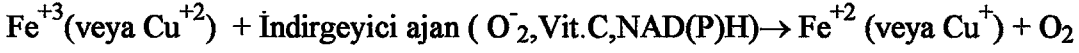
3) Organik ve inorganik bileşiklerde elektron transfer tepkimelerine neden olur. Aynı etkiyi O_2^- radikali de gösterir.



Sülfidril gruplarının kendiliğinden disülfidlere oksidasyonu, oksijen radikallerinin neden olduğu bir oksidasyondur.

Hidroksil radikalinin yüksek reaktivitesi nedeniyle istenmeyen toksik etkileri yanısıra, üretimleri normal biyolojik fonksiyon için de gereklidir. Fagositoz ve pek çok enzimatik katalizin zorunlu bir parçası olarak OH^\cdot üretilir ve kataliz olayına doğrudan katılır. Bazı kimyasal bileşikler, canlıda radikal yapımına neden

oldukları için toksik etkilidirler. Hidroksil radikalının yapım mekanizması esas olarak şöyledir:



Görüldüğü gibi, O_2^- radikalının elektron verici olduğu tepkime (Haber-weiss tepkimesi) dışında da biyolojik moleküller metal iyonlarını indirgeyerek, H_2O_2 varlığında OH^- yapımını sağlar (21,53,71).

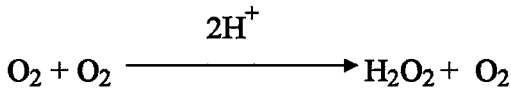
III.D.3.Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Süperoksit radikaline ikinci bir elektron ilavesiyle peroksit iyonu oluşmaktadır. Peroksit iyonunda çiftleşmemiş elektron bulunmaz ve serbest radikal değildir. Fizyolojik pH'da oluşan peroksit iyonu pKa'sı yüksek olduğundan hızlıca proton alarak hidrojen peroksit oluşturur. Sulu ortamlarda süperoksit üreten herhangi bir sistem sonunda H_2O_2 oluşturur ve bu reaksiyon dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir (21,56,62).

Bütün aerob hücrelerde çok çeşitli oksidazlar bulunur. Bu enzimler karakteristik olarak redükte substrattan $2e^-$ ve $2p^+$ un transferini katalizler. AH_2 , okside substrat (A) ve H_2O_2 'i oluşturmak üzere oksijene bu transferi yapar.



H_2O_2 , okside edici bir ajan olarak özellikle reaktif değildir. Bununla birlikte geçiş metallere varlığında Fenton kimyası derhal anlamlı miktarlarda OH^- serbestleştirir (37). Ksantin oksidaz enzimi ksantinin ürik asite dönüşümünü kataliz etmektedir. Deaminoasit oksidaz ve amino oksidaz, SOD enzimlerinin katalize ettiği reaksiyonlar sonucu hidrojen peroksit oluşmaktadır.



III.D.4.Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$)

Enerji absorpsiyonu ile oksijenin paylaşılmamış dış elektronları spinlerini değiştirebilirler. Oksijenin bu şekilde uyarılmış durumunda, dış iki elektron ayrı ayrı

veya aynı orbitali işgal edebilir. Oksijenin uyarılmış bu iki formuna singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) denir (71). Normal oksijen molekülünün iki ayrı dış orbitalinde ortaklanmamış iki elektron mevcuttur ve bunların spinleri aynı yöndedir. Ancak singlet oksijende ise spinler birbirine zıttır ve ortaklanmamış iki elektron aynı orbitalde yer alır. Singlet oksijen yapı olarak çifleşmemiş elektron içermediğinden serbest radikal değildir. Diğer oksijen radikallerinden daha uzun ömürlü olması ve elektronların duruşu nedeniyle kolayca kimyasal reaksiyonlara girebilmesi bu oksijen bileşiğinin çok reaktif olmasına neden olur. Orbitalde paralel gezinen elektronlar enerji girişiyle antiparalel olurlar ve sonuçta oksidan kapasiteyi artırır (21,62,120,143).

Singlet oksijen iki formda bulunur. Biyolojik olarak daha önemli olanı delta formudur ($^1\Delta_g\text{O}_2$). Diğeri ise sigma formudur ($^1\Sigma_g^+\text{O}_2$). Sigma formu çok daha enerjitik olduğundan yarı ömrü kısadır, hızlıca bozunarak delta formuna dönüşür (56,62,143).

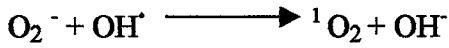
Singlet oksijen radyasyon sonucu oluşabileceği gibi invivo olarak sitokrom P-450, prostaglandin endoperoksit sentetaz ve miyeloperoksidaz reaksiyonları ile de enzimatik olarak oluşabilmektedir (120).

İnvivo olarak $^1\text{O}_2$ üretimine neden olan başlıca önemli tepkimeler şunlardır (71):

1- Süperoksit anyon radikali üretilen ortamda kendiliğinden dismutasyonla;



2- O_2^- ile OH^\cdot nin etkileşmesi ile;

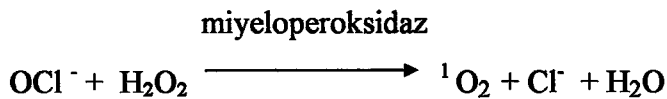


3- Haber-Weiss tepkimesi ile;



4- Süperoksit radikallerinin diaçil peroksitlerle tepkimesinde.

5- Fagositoz yapan hücrelerde fagositoz sırasında H_2O_2 ve halojen bağımlı miyeloperoksidaz enzimi ile.

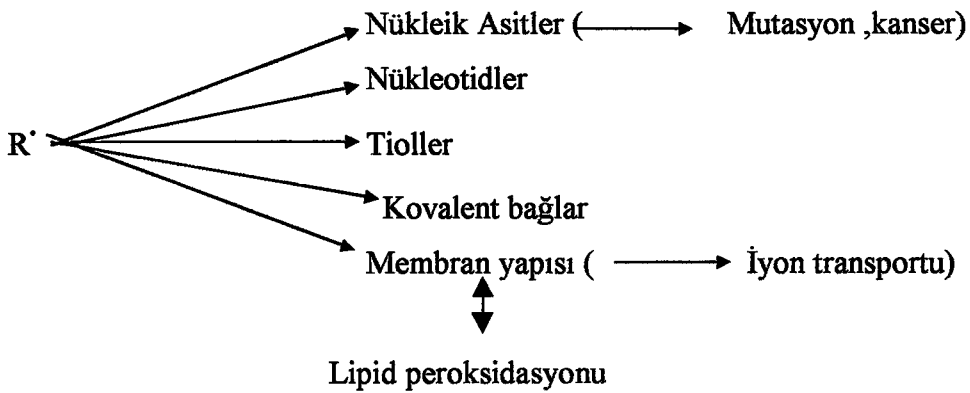


Karotenler, bilirubin, histidin, methionin, 2,5-difenilfuran, 1,4-diazbisikloalefan, singlet oksijeni temizlerler. Bu inhibitör bileşikler olay sırasında

oksidlenmez ve tüketilmezler, singlet oksijenin enerjisini almaktadırlar. Dienlerden endoperoksit, kolesterolden 5- α -hidroperoksid türevi oluşması gibi bir tepkimede $^1\text{O}_2$ üretildiği, kemilüminesans veya $^1\text{O}_2$ bağımlı bir tepkimenin çalışmasıyla tesbit edilmektedir.

III.E .Oksijen Radikallerinin Toksik Etkileri

Hücrede koruyucu mekanizmaları aşacak kadar serbest radikal oluştuğunda, farklı şekillerde metabolik ve sellüler bozukluklar meydana gelmektedir. Genel olarak serbest radikaller DNA'nın yapısında değişikliğe neden olarak mutasyon veya sitotoksite oluşturmaktadır (109,120,121). Oksijen serbest radikalleri NAD^+/NADH ve $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ redoks çiftlerini etkileyerek NAD(P) meydana getirmektedir. Şekil 3'de belirtildiği gibi serbest radikaller nükleotidlerin biyolojik özelliklerini değiştirmekte, protein ve non protein tiol gruplarını oksitleyerek tiyl radikalleri oluşturmaktadır. Serbest radikaller kovalent bağları etkileyerek protein, nükleik asit ve lipidlerin yapı ve fonksiyonlarını bozmaktadır. Bu hasar radikallerin membran enzimlerine ve reseptörlerine kovalent bağlanarak antijenik karakter ve transport fonksiyonunu bozması, poliansatüre yağ asidi / protein oranını değiştirmesi ve lipid peroksidasyonunu başlatması ile olmaktadır. Hasar sekonder olarak, lipid peroksit radikalleri, lipid hidroperoksitleri ve diğer lipid parçalanma ürünler ile devam ettirilir. Lizozom hasarı ile salınan lizozomal enzimler (hidrolitik enzimlerde) hücre hasarını daha artırmaktadırlar (18,120).



Şekil 3. Oksijen Radikallerinin hücre metabolik fonksiyonlarını bozma yolları.

Oksijenin diğer radikalleri ile kıyaslandığında, süperoksit radikalının reaktivitesi çok azdır. Oluşumlarına neden olduğu diğer radikallerle birlikte organizmada genel bir oksitleyici gibi davranmaktadır. O_2^- sülfidril gruplarının disüflitlere oksidasyonuna ve ferrik demirin ferroz formuna oksitlenmesine neden olmaktadır. Ayrıca diğer metallere elektron vererek veya elektron alarak, organizmada fonksiyonel metallerin oksidoredüksiyon düzeyini bozmaktadır (71). Sülfidril gruplarının ve metal iyonlarının canlıdaki sayısız fonksiyonları hatırlandığında, radikallerin hücrede metabolik olayları ve oksido-redüksiyon potansiyelini değiştirerek sayısız etkilere neden olacağı açıktır.

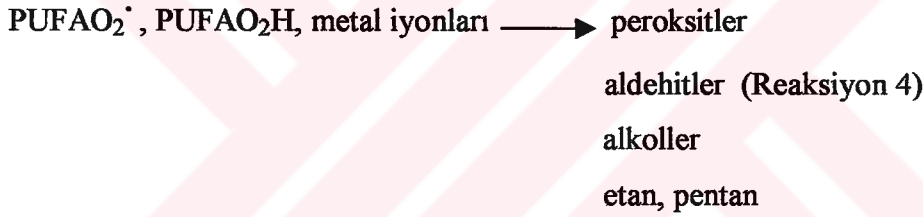
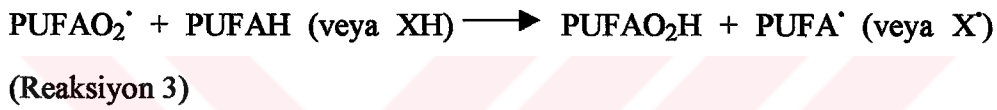
Süperoksit radikali başta sistein, triptofan ve tirozin olmak üzere bütün amino asitlerle, perhidroksi radikali ise O_2^- den daha etkili olarak sistein, fenilalanin, histidin, serin ve methionin başta olmak üzere bütün aminoasitlerle tepkimeye girmektedir. Buna rağmen bu iki radikalin aminoasitlerle tepkimesi, hidroksil radikalinden 10^6 - 10^9 kez daha yavaştır. O_2^- ve HO_2^\cdot (perhidroksi radikali) radikalleri ile H_2O_2 nin biyolojik moleküllerle tepkimelerinin yavaş olması nedeni ile radikallerin gözlenen toksik etkisinin 1O_2 ve OH^\cdot den kaynaklandığı kabul edilmektedir (71).

Singlet oksijen ve hidroksil radikali lipid peroksidasyonuna neden olan en önemli etkenlerdir. Hem 1O_2 hem de OH^\cdot nükleik asitler ile pürin ve pirimidin arasında ayırım yapmaksızın tepkimeye girmektedirler. OH^\cdot nükleik asitlerin doymuş karbon atomlarından hidrojen çıkarır veya çift bağlara katma tepkimeleri ile sonuçlanan tepkimelere girer. 1O_2 nin nükleik asitlerle tepkimeye girme yeteneği daha sınırlıdır. 1O_2 güçlü bir oksitleyici olduğundan, guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren moleküllerle daha kolay tepkimeye girmektedir (71,72).

III.F.Lipid Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu membran yapısını teşkil eden poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) SOR tarafından sekonder ürünlere (peroksitler, alkoller, aldehitler örneğin; malonildialdehit, etan, pentan v.b) yıkılma reaksiyonudur (74,119,121). Biyolojik materyaller içinde yer alan zar sisteminde bulunan

fosfolipitlerin yapısında yer alan doymamış yağ asitlerinin oksidatif oksijen bağımlı yıkılımı olarak tarif edilen lipid peroksidasyonu dallanan bir zincir reaksiyonudur. Bu zincirleme reaksiyonunda da üç aşama bulunmaktadır: başlangıç aşaması (initiation), yayılma aşaması (propagation) ve sonlanma aşaması (termination). Lipid peroksidasyonuna yol açan serbest radikaller içerdikleri eşleşmemiş elektronları nedeniyle kararsız yapıdaki moleküler oksijenin redüksiyonu yada eksitasyonu sonucu SOR oluşturmaktadır. Biyolojik membranlarda serbest radikallerle indüklenen lipid peroksidasyonu şu reaksiyon zincirini izler (13,17,56,58, 62,109,117,121).



Lipid peroksidasyonu; serbest radikalın PUFA'nın metilen grubundan (- CH₂ -) bir hidrojen atomu çıkarmak için yaptıkları atakla başlar (reaksiyon 1). Demir ve bakır gibi eşleşmemiş elektronlara sahip geçiş metal iyonlarının varlığı bu işlem için gereklidir. Oluşan karbon merkezli lipid radikali (PUFA[•]) aerobik hücrelerde konjuge dien şekline çevrildikten sonra moleküler oksijenle reaksiyona girerek peroksi radikalini (PUFAO₂[•]) oluşturur (reaksiyon 2). Bu peroksi radikali diğer bir peroksi radikaliyle birleşebilir ya da membran proteinleriyle etkileşebilir. Fakat en önemlisi, peroksi radikallerinin membrandaki komşu yan zincirlerden hidrojen atomlarını çıkartabilmeleri ve peroksidatif zincir reaksiyonunu yaymalarıdır. Böylece yan zincirden hidrojen atomunun çıkarılması ile, her defasında lipid hidroperoksitleri (PUFAO₂H) ve yeni bir peroksi radikali oluşmaktadır (reaksiyon 3). Peroksidasyon, bir kere başladıktan sonra, otokatalitik olarak

yayılabilmekte ve yüzlerce yağ asidi zincirleri, lipid hidroperoksitlerine çevrilebilmektedir (21,120).

Yayılma zincirinin uzunluğu şu faktörlere bağlıdır;

1- Membrandaki lipid / protein oranı: Membran proteinin içeriği yükseldikçe lipid peroksidasyon oranı artacaktır.

2- Yağ asidi birleşimi: Membranda poliinsatüre yağ asidi içeriğinin artması, peroksidasyona olan duyarlılığı artırmaktadır. Halbuki kolesterolün varlığı peroksidasyonu baskılamaktadır. Normal insan eritrositlerinde lipid peroksidasyon derecesi ile, membran kolesterolü arasında belirgin bir negatif korelasyon bulunmuştur. Plazma membranında kolesterolün varlığı, bazı radikallerin yollarının kesilmesine neden olduğu gibi; yağ asidi yan zinciriyle kolesterolün hidrofobik halkasının etkileşmesi, membranın iç yapısını değiştirmektedir.

3- Oksijen konsantrasyonu: Oksijen konsantrasyonu arttıkça karbon merkezli lipid radikaliyle reaksiyon (reaksiyon 2) artacağından, lipid peroksidasyonunu stimüle edecektir.

4- Vitamin E gibi zincir reaksiyonlarını kesen antioksidanları varlığı: Biyolojik membranlarda serbest radikal toplayıcısı olarak görev yapan vitamin E, kendi hidrojen atomunu peroksi radikaline vererek hidroperoksitlerinin oluşumuna yol açar. Bu hidroperoksitler, daha sonra, glutatyon peroksidaz ile kendilerine karşılık gelen nontoksik hidroksi bileşiklerine ayrılmaktadır.

Demir ve bakır iyonları ya da bu iyonların fosfat esterleriyle oluşturduğu basit şelatları (Fe^{+2} -ADP), hem, hemoglobin ve miyoglobini de içeren bazı demir proteinleri, lipid hidroperoksitlerini bozarak peroksidasyonu sonlandırmaktadırlar (reaksiyon 4). Bu kompleks bozunma reaksiyonlarının ürünleri; etan, pentan gibi hidrokarbon gazları, ROOH, RCOOH, ROH ve RCHO gruplarını içeren kısa zincirli yağ asitleridir (13,21,56,60,143). Lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan bu ürünler, membran permeabilitesini ve mikroviskozitesini önemli ölçüde etkilemektedir. Oluşan kısa zincirli yağ asitleri ve triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin ve sistein gibi aminoasitleri içeren yapısal proteinlerin oksidasyonu, membran permeabilitesinin artmasına ve membrandaki akışkanlığın azalmasına neden olmaktadır (62,73, 74,143).

Lipid hidroperoksitleri ve lipid peroksi radikalleri, serbest oksijen radikalleri gibi, aynı hücrenin birçok komponentiyle reaksiyona girerek, hücrenel ve metabolik fonksiyonlar üzerinde toksik etkilerini gösterirler (32,109). Bu toksik etkiler;

-Membrana bağlı reseptörlerin ve enzimlerin inaktivasyonuna yol açar.

-Membranın sekretuar fonksiyonunun kaybına neden olur.

-Transmembran iyon gradiyentini bozarak Ca^{+2} gibi iyonlara karşı non-spesifik permeabiliteyi artırır.

-Mitokondride oksidatif fosforilasyonu çözerler, mikrozomal enzim aktivitelerinde değişikliğe yol açarlar, subselüler organellerin (lizozom gibi) bütünlüğünün kaybolmasına neden olurlar.

-Üç yada daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu, malondialdehit (MDA) üretimi ile sonuçlanmaktadır. Membran komponentlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmalarına neden olan MDA; deformabilite, iyon transportu enzim aktivitesi ve hücre yüzeyindeki determinantların agregasyonu gibi, iç membranın bazı özelliklerini değiştirmektedir. Ayrıca, diffüze olabildiğinden, DNA'nın nitrojen bazlarıyla reaksiyona girmektedir. MDA bu özelliklerinden dolayı, mutajenik, genotoksik ve karsinojeniktir (37,62,74,143).

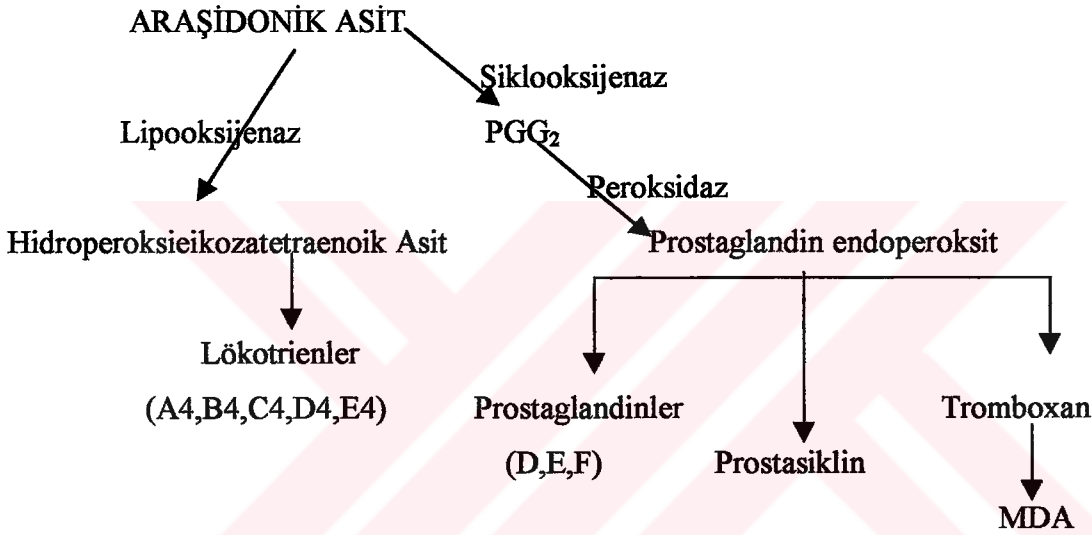
Serbest radikaller, peroksidasyonun yanısıra membran bütünlüğünün bozulmasına, eritrosit enzimlerinin inaktivasyonuna ve hemoglobin molekülünün denatürasyonuna neden olmaktadır. Çekirdeği olmayan olgun eritrosit protein sentezleyemediği için hasar görmüş komponentleri yerine koyamamaktadır. Böylece oksidatif hasar, eritrositlerde sürekli olarak defekti indüklemekte, hemolitik hastalıklara ve yaşlanmaya iştirak etmektedir (74,134,142). Yaşlılık pigmenti olarak bilinen lipofuskin, MDA'nın lipid ve proteinle reaksiyona girmesi sonucu oluşan çözünmeyen konjuge schiff bazlarının lizozomal akümüasyonu ile meydana gelmektedir (74).

Serbest radikallerin karbonhidrat metabolizmasına olan etkisi üzerinde proteinlere oranla daha az çalışılmıştır. Glukoz, mannoz ve deoksi şekerler serbest radikallerin etkisiyle otookside olarak intraselüler seviyede H_2O_2 meydana getirirler. Aynı zamanda glukoz ve albumin kompleksinin birlikte otooksidasyonu oksijen radikalının meydana gelmesine neden olmakta ve bu da çeşitli hastalıkların

patogenezinde rol oynamaktadır. Bunun yanında oksijen radikalleri hiyaluronik asit gibi karbonhidrat polimerlerinde fragmantasyona neden olmaktadır (37,74,138)

Biyolojik sistemlerde lipid peroksidasyonu tayininde en sık ölçülen bir ürün olan MDA, CO₂'e metabolize olmasına rağmen, idrarda asit ile hidrolize edilebilen formda küçük miktarda ekskrete edilmektedir (33,119).

Şekil 4'de görüldüğü gibi lipooksijenaz ve siklooksijenaz gibi, mikrozomal ve plazma membranlarıyla ilişkili enzimlerin substratı olan araşidonik asit; prostaglandin, prostasiklin, tromboksan, lökotrien gibi biyolojik olarak aktif ürünlere çevrilmektedir (74,109,137).



Şekil 4. Araşidonik Asit Metabolizması

Prostaglandin ve lökotrienlerin biyosentezinde ara bileşik olarak ortaya çıkan hidroperoksitler, prostasiklin ve tromboksan sentezinden sorumlu sentez enzimlerini, farklı feed-back mekanizmalarla inhibe etmektedirler. Prostasiklin ve tromboksan etki bakımından birbirinin antagonisti olduğundan, prostasiklin/tromboksan oranının düzenlenmesi, birçok vasküler hastalığın gelişmesinde önemli faktör olarak kabul edilmektedir. Lipid peroksit üretimi ve katabolizması arasındaki denge normal prostasiklin seviyesinin sürdürülmesini sağlamaktadır. Yüksek lipid peroksit seviyeleri prostasiklin sentezini güçlü bir şekilde inhibe edeceğinden, araşidonik asit metabolizması tromboksan sentezine

doğru yeniden dzenlenecektir. B6ylece n6trofil stim6lasyonu s6peroksit anyonu 6retimi ve plateletlerin agregasyonu mod6le edilebilmektedir (74,84,137).

III .F.1. Lipid Peroksidasyonunun Kontrol Mekanizmaları

Lipid peroksidasyonu h6crede altı fakt6r tarafından dzenlenmektedir.

1-Demir iyonları

2-Fe⁺³'6 Fe⁺²'e indirgeyen bileşikler.

3-Fe iyonlarını Őelatlayan bileşikler.

4-Lipid hidroperoksitlerini indirgeyen maddeler.

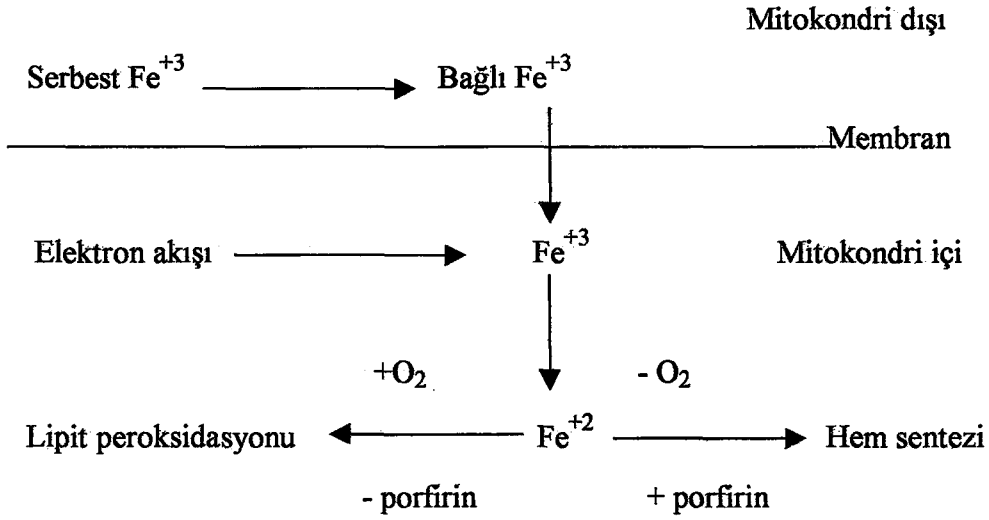
5-Oksijen

6-Serbest radikal reaksiyonları inhibit6rleri (antioksidanlar)

Bunlara bazı yeni fakt6rler de ilave edilebilir. Membran lipitlerinin fiziksel durumları (akıŐkanlık ve elektrik y6kleri), membran permeabilitesi, elektron transport zincirinin fonksiyonu gibi fakt6rlerde lipid peroksidasyonunun kontrol6nde etkilidirler. H6cre i6inde bir6ok sistem, ferrik iyonlarını ferro hale indirgeyebilmekte ve bu Şekilde lipid peroksidasyonu tepkimelerini aktive etmektedir. Buna 6rnek olarak askorbik asit, tioller, hem, NADH, NADPH-sitokrom b₅ red6ktaz, s6peroksit anyon radikali verilebilir.

Tioller tarafından lipid hidroperoksitleri indirgenmekte, bu d6n6Ő6m glutasyon peroksidaz enzimi tarafından hızlandırılmaktadır. Yine tioller, Fe⁺³'6 Fe⁺²'e indirgeyerek lipid peroksidasyonunu aktive edici bir etki g6stermiŐtir.

S6lfidril bileŐiklerinin de lipid peroksidasyonunu başlatan s6peroksit ve hidroksil radikali ile direkt etkileşimi bulunmuştur 6strojenler, kortikosteron ve kortizon gibi bazı glukokkortikoidler antiradikal etki g6stermektedir. Dişi seks hormonlarının antioksidan etkileri; yapılarındaki fenolik OH gruplarının bulunmasına bağlıdır. Hemoglobin, sistein, FeCl₃ kompleksi, EDTA-Fe⁺³ gibi demir taşıyan kompleksler kataliz olaylarında etkilidirler. Demirin y6ksek konsantrasyonları antioksidan etkilidir. Antioksidan etkide Fe⁺² ile Fe⁺³ arasındaki denge oranı 6nemli olup konsantrasyonları ne olursa olsun bu oran 1 olduğu durumda maksimal lipid peroksidasyonunun oluştuğu ileri s6r6lmektedir. Hem sentezi ile lipid peroksidasyonu arasındaki m6mk6n olan ilişki Şekil 5'de g6sterilmiŐtir (60,117,133).



Şekil 5. Hem sentezi ile lipid peroksidasyonu arasındaki ilişki

III.G.Eritrosit Zarında ATPaz Aktivitesi ve İyon Hareketleri

Eritrosit zarı suya ve anyonlara geçirgen olmasına karşılık içerdikleri pozitif yük nedeniyle sodyum, potasyum ve kalsiyum gibi katyonlara karşı farklı davranışlara sahiptir. Zar iyonik dengeye karşı, enerjisi ATP'den sağlanmak üzere iyonların aktif hareketini geliştirmektedir. Farklı katalitik özelliklere sahip en az üç ATPaz enzim sistemi ortaya konmuştur. Bu enzim sistemleri işlevi henüz kesinlik kazanmamış, aktivasyon için magnezyum ve ATP gerektiren Mg^{+2} -ATPaz, eritrositte sodyum ve potasyum taşınmasını sağlayan, oubain tarafından inhibe olan sodyum-potasyum adenozin 5'-trifosfataz ($Na^+ - K^+ / Mg^{+2}$ ATPaz) ve kalsiyum taşınmasından sorumlu olan Ca^{+2} / Mg^{+2} ATPaz'dan oluşmuştur (130).

III.G.1. $Na^+ - K^+ / Mg^{+2}$ ATPaz (E.C.3.6.1.3) Sistemi

Bu enzim, eritrosit zarının iç bölümünde gerçekleşen her mol ATP hidrolizi ile hücre dışı sıvıya üç sodyum iyonu transfer ederken, elektrokimyasal farkın temelini oluşturan iki potasyum iyonunun hücre içine girişini sağlamaktadır. Bu mekanizma aynı zamanda hücre dışı sıvıya göre sitoplazmanın yüksek potasyum (100-160mM), düşük sodyum (3-30mM) konsantrasyonuna sahip olmasının nedenini de açıklamaktadır. $Na^+ - K^+ / Mg^{+2}$ ATPaz enzimi, biri 100.000 diğeri 50.000 dalton moleküler ağırlıkta iki farklı alt üniteye (α ve β) sahiptir. $Na^+ - K^+ / Mg^{+2}$ ATPaz

enziminin substrat bağlaması magnezyum varlığında olmakta ancak gerçek substrat Mg-ATP kompleksi olarak önerilmektedir. Aktivite için magnezyumun yerini diğer divalent katyonlar 1/10 oranında verimle alabilmekte, ancak sodyum gereksinimi başka bir katyonla karşılanamamaktadır. Ayrıca potasyum gereksinimi düşük aktivite ile olmak üzere rubidyum ve sezyum gibi diğer katyonlarla da karşılanabilmektedir. Sodyum ve magnezyum varlığında diğer monovalent katyonların eklenmesi aktiviteyi artırırken sodyum gereksiniminin lityum ile karşılanması durumunda bu katyonlar etki gösterememektedir (130).

Zara bağımlı birçok enzim gibi taşıma işleminden sorumlu ATPaz enzimleri de aktivite için fosfolipitlerin varlığına gereksinim duymaktadırlar. Fosfolipit bağımlı aynı zamanda zara bağlı olan $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{Mg}^{+2}$ ATPaz serbest radikal reaksiyonlarına ve lipid peroksidasyonuna çok hassas olup artmış olan membran potansiyelinden zara koruma görevi üstlenmiştir (68).

Deterjan ve organik çözücülerle lipitlerin zarıdan izolasyonu ve bunların tekrar zara eklenmesi sonucu zar bütünlüğünün, fosfolipit içeriğinin ve fosfolipitlerin yapısındaki yağ asitlerinin enzim aktivitesine etkisi ile ilgili birçok çalışmalar bu bağımlılığı kanıtlamaktadırlar. Fosfolipaz A enziminin zarındaki tüm fosfolipitleri, fosfolipaz C enziminin de lesitinleri 2/3 oranında parçalayarak $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{Mg}^{+2}$ ATPaz enzim aktivitesini önemli derecede azalttığı bulunmuştur. Yanlızca, fosfatidil serinin kaldırılmasında hem defosforilasyon hem de fosforil enzim oluşumunda önemli işlevi olması nedeniyle $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{Mg}^{+2}$ ATPaz aktivitesini düşürmektedir. $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{Mg}^{+2}$ ATPaz'ın çeşitli glikozidler, sülfidril bileşikleri oligomisin, butadion ve vanadat tarafından inhibe edildiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (130).

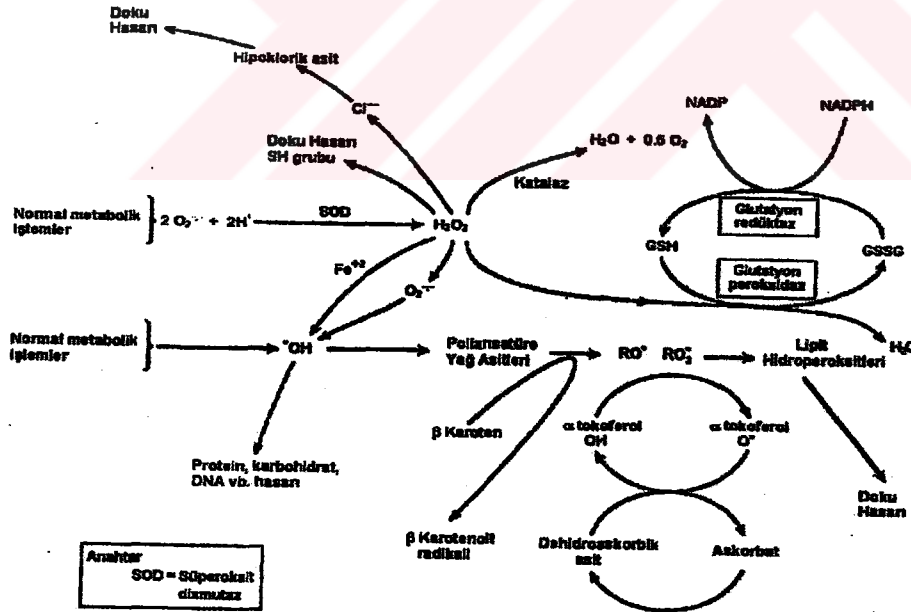
III.G.2.Ca⁺² -Mg ATPaz Sistemi

Daha çok sarkoplazmik retikulumda çalışılan bu enzim, kalsiyum iyonlarının taşınmasından sorumludur. Kas hücrelerinin sarkoplazmik retikulumundan başka sarkolemma ve eritrosit zarında, trombositlerde, beyin mikrozomlarında, plasenta, sinir hücresi, böbrek tübül hücreleri ve salgı bezlerinde $\text{Ca}^{+2} / \text{Mg}^{+2}$ ATPaz enziminin varlığı gösterilmiştir. Eritrosit zarı $\text{Ca}^{+2} / \text{Mg}^{+2}$ ATP az 150.000 d moleküler ağırlıktadır. Bir ATP bağlama, bir fosforilasyon ve iki kalsiyum

bağlama bölgesine sahiptir. Ca^{+2}/Mg^{+2} ATPaz, eritrositlerde her mol ATP hidrolizi ile bir yada iki kalsiyum iyonu taşınmasını sağlamaktadır. Etki mekanizmasında ATP'nin Ca^{+2}/Mg^{+2} ATPaz'a bağlanması için magnezyum iyonuna gereksinim duyması bu enzimi $Na^{+}-K^{+}/Mg^{+2}$ ATPaz'dan ayırt edici niteliktedir. Vanadatın inhibitör etkisinin olduğu, aktivitesinin fosfolipitlere, fosfolipitlerdeki yağ asitlerinin doymuşluğuna, dolayısı ile rotasyon yeteneğine bağlı olduğu bildirilmiştir (130).

III. H. Antioksidan Sistem

Reaktif oksijen metabolitlerinin potansiyel zararlarına karşılık çok sayıda hücre koruyucu enzimleri ile karşı koyulur ve antioksidan maddeler ile radikal hasarı sınırlandırılmaya çalışılır. Vücutta denge içerisinde çalışan oksidan ve antioksidan sistem bunlardan herhangi birisi yönüne değişimler olduğu zaman baskın hale gelmektedir. Hücrelerin metabolik yollarının işleyişinin doğal bir sonucu olarak farklı derecelerde radikaller oluşmaktadır. Organizmada bu oluşum sürekli olmasına rağmen güçlü savunma sistemleriyle bunlara karşı defansif yapı oluşturularak insan doğası korunmaktadır.



Şekil 6. Hüresel antioksidan enzimler, antioksidan maddeler ve serbest radikallerin birbirleri arasındaki ilişki

Yani; Şekil 6'da gösterilmiş olduğu gibi biyolojik sistemleri etkileyen çeşitli peroksidatif faktörlerle, bunlara karşı gelen antioksidan sistem kapasitesi arasında bir denge oluşmaktadır (21,30,62,140,143). Peroksidatif faktörler hızla değişime uğradığından kısa sürede yeterli düzeye erişirse biyolojik sistemin antioksidan sistem kapasitesi yetersiz kalmakta ve patolojik olaylar ortaya çıkmaktadır (37,71).

Antioksidan defans sistemi şu yollarla radikal hasarını engellerler:

- a) Oksijenin uzaklaştırılması veya lokal oksijen konsantrasyonlarının azaltılması,
- b) Katalitik metal iyonlarının (Fe, Cu) uzaklaştırılması,
- c) Anahtar rolündeki serbest oksijen radikallerinin (O_2^- ve H_2O_2) uzaklaştırılması,
- d) Hasarı başlatıcı serbest radikallerin (OH^\cdot , LO^\cdot ve LOO^\cdot) temizlenmesi ,
- e) Zincirleme devam eden reaksiyonları kırılması,
- f) Singlet oksijenin temizlenmesi,

Antioksidanları, endojen ve eksojen kaynaklı olarak iki ana grupta toplayabiliriz (110).

III.H.1.Endojen Antioksidanlar

Enzimatik

a-Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi

b-Süperoksit dismutaz

c-Katalaz

d-Glutatyon peroksidaz

Nonenzimatik

a-Lipid faz(membran)

- α -tokoferol

- β -karoten

b-Sıvı faz(non-membran)

- Glutatyon

-Askorbik asit

-Ürat

-Sistein

-Seruloplazmin

- Transferin
- Laktoferin
- Albumin
- Billurubin
- Ferritin
- Melatonin

III.H.1.1.Enzimatik Korunma Mekanizması

Mitokondrial oksidaz sistemi, hücre oksijeninin büyük bir kısmını yakma özelliğine sahiptir. Böylece toksik oksijen metabolitlerinin yapımında kullanılan %95-99 oranındaki moleküler oksijen kullanılmış olur. Bu sistem içerisinde enerji diğer bir ifade ile ATP sentezi de söz konusudur. Ancak sitokrom oksidaz sisteminin moleküler oksijeni detoksifiye etme özelliği büyük bir öneme sahiptir (110).

Hücre içerisinde oksijenin metabolize edildiği her yerde, antioksidanlar, oksijen ara metabolitlerini azaltmak için hızlı ve spesifik (enzimatik) olarak çalışırlar. Enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) antioksidan defans sisteminin majör enzimleri olup başlıca hücre içi antioksidanlar tablo 1’de verilmiştir (110,143).

Tablo 1. Hücre içi antioksidanlar

Adı	Fonksiyonu
Sitokrom Oksidaz Sistemi	Hücre içi oksijenin %95-99 ‘unun detoksifikasyonu
Süperoksit dismutaz (Cu, Zn, Mn, Fe)	Süperoksit radikalinin (O_2^-) katalitik olarak uzaklaştırılması
Katalaz	H_2O_2 ’in – yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu - uzaklaştırılması
Glutatyon peroksidaz	H_2O_2 ’in ve lipid hidroperoksitlerinin uzaklaştırılması

III.H.1.1.1.Süperoksit Dismutaz

Süperoksit Dismutaz (SOD)(EC 1.15.1.1); süperoksit anyon serbest radikalinin(O_2^-) hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eden hücre içi bir enzimdir. Oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunur. Oksijen

toksitesine karşı önemli bir savunma sistemidir. Bütün canlılardaki SOD, kofaktör olarak içerdiği metal iyonuna göre üç grupta toplanabilir (15,48,71,99). Bunlar; Demir içeren (Fe-SOD), manganez içeren (Mn-SOD), bakır ve çinko içeren (Cu/Zn-SOD) dır ki; hepsi aynı tip reaksiyonu katalize ederler. Ancak bazı özellikleri nedeniyle birbirleriyle karşılaştırılabilir. Demir içeren (Fe-SOD) ve manganez içeren (Mn-SOD) enzimler prokaryotların karakteristik enzimleridir, mitokondri matriksinde bulunur ve sıkı sıkıya bağlı aminoasit sıraları benzerlik gösterir. Bakır ve çinko içeren (Cu/Zn-SOD) enzim ökaryotların karakteristik bir enzimidir, sitoplazmada bulunur, FeSOD ve MnSOD ile benzer aminoasit sırası içermez.

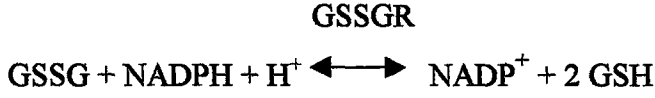
Fe-SOD ve Mn-SOD bakterilerde bulunur ve son çalışmalar göstermiştir ki; gram (+) bakteriler çoğunlukla sadece Mn-SOD içerir, gram (-) bakteriler ise genellikle hem Fe-SOD hem de Mn-SOD'u içerirler. Fakat bazı gram (+) bakteriler, örneğin *Stafylokokus aureus* Fe-SOD ve Mn-SOD'u beraber içerirken bazıları (ör. *Basillus cereus*) sadece Fe-SOD içerir. Bununla birlikte gram (-) bakterilerden *Alcaligenes faecalis* sadece Fe-SOD içerir (48). Cu/Zn-SOD, ökaryotların sitoplazmasında bulunur ve simbiyotik bakterium *Photobacterium leiognathi* Fe-SOD'a ilaveten Cu/Zn-SOD da içerir (72).

Ökaryotlar çoğunlukla hem Cu/Zn-SOD'ı hem de Mn-SOD'u içerirler. Mn-SOD mitokondrial matrixde bulunur. Mn-SOD aktivitesinin değişik tümör hücrelerinde azaldığı da rapor edilmiştir. Cu/Zn-SOD enzimi ise sitozolik bir enzim olup fare hepatositlerinde %70 oranında sitozolde ve %12 oranında çekirdekte bulunduğu gösterilmiştir. Ökaryotlarda bulunan bu iki intraselüler izoenzimden başka süperoksit radikalinin bozulmasını katalizleyen bir üçüncü izoenzim daha tanımlanmıştır ki buna da extraselüler SOD (EC-SOD) denilmiştir. Bu enzim 4 bakır atomu ve muhtemelen 4 çinko atomuna sahip tetramerik, hidrofobik glikoprotein görünümündedir. Molekül ağırlığı ~135.000 dir. Dokuların birçoğunda gösterilebilir, fakat intraselüler SOD'dan daha düşük konsantrasyondadır. Daha çoğunlukla insan akciğerinden saf formu izole edilebilmiştir. SOD enzimine plazma, lenf ve sinovyal sıvıda rastlamak mümkündür (79,80,98).

III.H.1.1.2. Glutatyon Redüktaz

Glutatyon redüktaz (GSSGR) [NAD(P)H: okside glutatyon oksido redüktaz, EC 1.6.4. 2], okside glutatyonu (GSSG), redükte nikotinamid adenin

dinükleotid fosfat (NADPH) kullanarak, redükte glutatyona (GSH) indirgeyen bir flavoenzimdir.



Enzimin substrat özgülüğü çok fazladır. Fizyolojik şartlarda reaksiyon tek yönlüdür ve GSSGR bu şekilde hücre içindeki GSH:GSSG oranının yüksek tutulmasını sağlar. GSH ise hemen hemen bütün hücrelerde bulunan en önemli protein dışı tiyoldür ve hücrenin metabolizmasında, bazı bileşiklerin transportunda ve hücrenin korunmasında rol alır. Bu görevleri glutatyonun indirgenmiş durumda bulunmasını gerektirdiğinden, GSSGR glutatyon biyokimyasında anahtar rol oynar (1,88).

GSSGR aktivitesi hücrenin sitosol, mitokondri ve kloroplastlarında bulunur. Molekül ağırlığı 70-140 bin dalton arasında değişir. Enzim, birbirinin aynı olan iki alt birimden oluşur ve her altbirim başına bir FAD^+ taşımaktadır. GSSGR ısıya dayanıklı bir enzimdir. İnsan alyuvar enzimi 60 ve koyun beyin enzimi 65 derecede bir saat ısıtıldığında aktivitesini korumaktadır. İnsan alyuvar enziminin her alt birimi 478 aminoasitten oluşur ve her alt birimin dört bölge içerdiği; bunlardan birinin FAD^+ , diğerinin NADPH bağlamadan sorumlu olduğu; iki alt birim arasında yer alan üçüncü bölgenin GSSG'un ürüne dönüştürülmesinde rolü olduğu; bu üç bölge arasında ise merkezi bir bölgenin bulunduğu yapılan çalışmalar sonucunda ortaya çıkartılmıştır. GSSGR, glutatyon peroksidaz ile birlikte hücre içinde glutatyon redoks döngüsü yoluyla hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasında rol alır. Dokularda GSH konsantrasyonu ve GSSGR aktivitesinin yaşlanma ile azaldığı gösterilmiştir. Buna bağlı olarak hücre içi lipid peroksidasyonu artmakta, hücre zarlarında yapısal ve fonksiyonel değişmeler görülmektedir. Klinikte en çok çalışılan alyuvar GSSGR eksikliğinin daha çok riboflavin eksikliğine bağlı olduğu görülmüştür. Bu tip şahısların alyuvarlarındaki enzim FAD^+ ile inkübe edildiğinde aktivitesi normal enzime göre çok daha fazla artmaktadır. Apoenzimdeki kalıtsal bozukluklar ise nadir olarak görülmektedir (1).

Biskloronitrozüre (BCNU), glutatyon redüktazın spesifik inhibitörüdür. Kemoterapi amacıyla BCNU alanlarda GSSGR aktivitesinde azalma görülmektedir.

Kalıtısal G6PD yetmezliği olan bazı şahısların alyuvarlarında ise GSSGR aktivitesinin normale göre yüksek olduğu bulunmuştur (1,130).

III.H.1.1.3. Katalaz

Katalaz (CAT; EC 1.11.1.6); karbonik anhidraz enzimi ile beraber bilinen en hızlı enzimdir. Glikoprotein yapısında olup, dört hem grubu içeren bir hemoproteindir. Peroksizomlarda lokalizedir, hücre dışında yoktur veya çok az miktardadır. Kanda, kemik iliğinde, müköz membranlarda, böbrekte ve karaciğerde bulunur. Oksidazların aktivitesi ile oluşan toksik H₂O₂'i direkt olarak suya çevirir. Böylece ikinci derecede sentezlenen toksik hidroksil radikallerinin sentezlenmesi ve H₂O₂'nin vücutta birikimi engellenmiş olur.

Katalaz

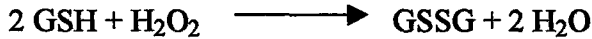


Bu reaksiyon daha çok H₂O₂ konsantrasyonunun arttığı durumlarda büyük öneme haizdir. Düşük H₂O₂ konsantrasyonlarında diğer peroksidazlar (mesela glutatyon peroksidaz) devreye girer (3,143).

III.H.1.1.4. Glutatyon Peroksidaz

Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px; EC 1.11.1.9) intraselüler bir enzim olup aktif merkezinde selenosistein içerir. GSH-Px; iki adet tiol grubu ihtiva eden glutatyonu, glutatyon disülfide okside ederken hidroperoksitleri redükte eder. Redükte glutatyon, glutatyon redüktaz enzimi tarafından NADPH kullanarak rejenere edilir. NADPH ise pentoz fosfat yolundan elde edildiğinden bu yol detoksifikasyon mekanizmasını destekleyici bir görünümde (1,53,104, 145).

GSH-Px



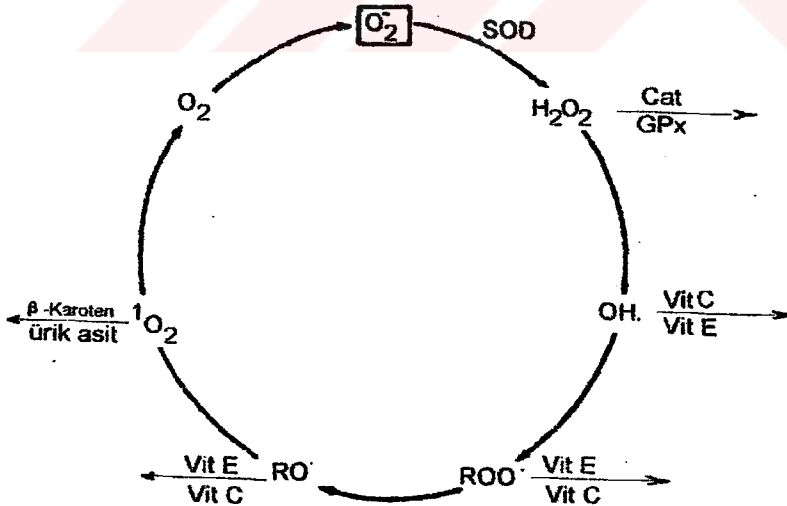
Glutatyon peroksidaz, peroksitlerin alkollere dönüşümünü katalize ederek selüler ve subselüler membranların oksidatif etkiden korunmasını sağlar. Bu enzimin aktivitesi, diyetle alınan selenyum miktarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir ve eritrositleri okside olmaktan korumaktadır (26).

Glutasyon peroksidazın selenyum bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki şekli mevcuttur. Selenyum bağımlı enzim hem H_2O_2 'e hem de hidroperoksitlere etki eder. Selenyuma bağımlı olmayan ise H_2O_2 yıkımını kataliz etmez, ancak lipid hidroperoksitlerinin yıkımında görev alır. Karaciğer ,böbrek korteksi ve iskelet kasında bulunur. Böbrek medullasında selenyum bağımlı ve bağımsız GSH-Px eşit miktardadır (145). H_2O_2 'in bu enzim tarafından yıkılmasının önemi KEŞHAN hastalığı ismi verilen bir kardiyomiyopati türünden tanımlanmıştır. Bu hastalık selenyumdan fakir topraklarda yaygın olarak görülür. Diyet yoluyla selenyum verilmesi ile engellenebilmektedir (5,59,143).

Glutasyon peroksidaz enziminin katalize ettiği reaksiyon ile, membran lipidlerinin ve hemoglobinin, peroksitler tarafından oksidasyonu önlenir. Bu reaksiyon hemoglobinin methemoglobine oksidasyon oranını azaltarak eritrositin ömrünü uzatır (62,143).

III.H.1.2. Non Enzimatik Korunma Mekanizması

Normal hücrede birçok non enzimatik korunma mekanizması mevcuttur. Lipid ve sıvı faz antioksidanları olarak adlandırdığımız düşük molekül ağırlıklı serbest radikal toplayıcılarının dışında glutasyon da, lipid peroksidasyonunu önlemeye çalışır (30,31).



Şekil 7. O_2 'nin Univalent Redüksiyonu sonucu SOR üretimi ve Oluşan SOR'ların Uzaklaştırılması.

Moleküler oksijenden türeyen kimyasal olarak reaktif olan prooksidantlar, çeşitli enzimatik ve nonenzimatik ajanlar tarafından ortamdaki uzaklaştırılmaya çalışılırlar. Şekil 7’de gösterildiği gibi moleküler oksijene bir elektron transferi ile oluşan süperoksit radikali, ortamda hızla SOD tarafından hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürülür. Bu hidrojen peroksit hem katalaz hemde GSH-Px için bir substrat olup derhal biyolojik sistemler için oldukça reaktif bir metabolit olarak bilinen hidroksil radikaline çevrilir. Hidroksil radikali birinci basamakta peroksil radikaline, ikinci basamakta alkoksil radikaline ve daha sonra oksijenin eksite formu olan singlet oksijene çevrilir. Vitamin E ve vitamin C birlikte kendi kendine oluşan bu zincir reaksiyonlarını ya hidroksil radikalinin direkt iç reaksiyon oluşumuna yada organik radikal ara ürünlerinin yayıldığı kimyasal reaksiyonlara girerek sonlandırır. Kararsız olan singlet oksijen ise bir veya iki mol reaksiyonlarla foto-emisyon yöntemine yol açar. Alternatif olarak bu enerjiyi karbonil grupları gibi diğer moleküllere aktarır. β - karoten uyarılmış singlet oksijeni zincir reaksiyonundan temizleyen doğal bir ajan olarak görev yapar (94).

Membranların hidrofobik kısmında, hücre içi aköz çevrede oluşan radikallerden farklı olarak lipofilik radikaller oluşur. Bu lipofilik radikallerin uzaklaştırılması için farklı tipte antioksidanlar gerekir. Bu antioksidanlar Tablo 2’de özetlenmiştir (42,143).

Tablo 2. Membran antioksidanları

Adı	Fonksiyonu
Vitamin E	Yağda erir, zincir kırıcı antioksidandır. Plazmadaki lipoprotein lipitlerini koruyabilir.
β - Karoten	Yağda erir, radikal temizleyicidir. Singlet oksijeni ortadan kaldırır.
Koenzim Q	Majör rolü enerji metabolizmasındadır. Redükte durumda antioksidan olarak görev yapabilir.

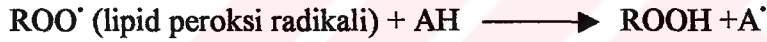
a-Lipid Faz Antioksidanlar

Alfa tokoferol: Lipidlerle yakın ilişkili biyolojik bir antioksidandır. Selüler ve organel zarlar arasına girerek serbest radikalleri daha az reaktif bileşiklere çevirerek zarları lipid peroksidasyona karşı korumuş olur. Alfa tokoferol’ün antioksidan etkisi *invivo* olarak gösterilmiş ve hayvanlar üzerinde yapılan

çalışmalarda normalin üzerinde E vitamininin alınması sonucu vücudun birçok kimyasal toksik ajana karşı korunduğu saptanmıştır. Serbest radikallere karşı koruyucu etkisi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi eksik olan bireylerde de gösterilmiştir. Örneğin talasemi majörde serum α -tokoferol düzeyinde bir azalma söz konusudur (4,27,30,64).

E vitaminini meydana getiren tokoferollerin antioksidan ve antisterilite özelliği yanında, bu vitaminin birçok hastalıkları içerisinde alacak kadar geniş bir tedavi değerine sahip olduğu da ileri sürülmüştür. E vitamini yağda eriyen bir vitamin olup alfa, beta, gama ve delta tokoferollerden meydana gelir ki bunlardan sadece alfa tokoferol E vitamini etkinliği gösterir (27,64).

Vitamin E, peroksit ve hidroperoksitleri hidrojen iyonları ile doyurup, peroksit radikallerinin aktivitesini azaltarak otooksidasyonun başlatıcısı olan bu reaksiyonları inhibe eder (26,146). GSH-Px'e benzer etki göstererek hücre zar oksidasyonunu önleyerek dokuların yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü sağlar (146). Vitamin E (AH), etkisini zar fosfolipitlerinde bulunan araşidonik aside bağlanarak gösterir ve kendi başlattığı reaksiyon ile bir radikale (A') dönüşerek peroksidasyon zincir reaksiyonunu keser.



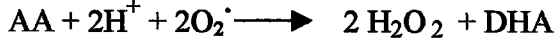
Her bir E vitamini iki oksidasyon zincirini durdurur. Çünkü vitamin E radikali zincirin devamı için çok az reaktiftir. Vitamin E; askorbik asit (AA) tarafından rejenere edilebilir (37).

Beta karoten: A vitamininin öncü maddesi olup, plazmada α -tokoferolden elli kat daha az bulunmasına rağmen benzer şekilde serbest radikal tutucu olarak görev yapar ve doku hasarlarını önler. Yağda eriyen bir vitamin olan β -karoten, alkoksil ve peroksil radikallerinin etkin temizleyicisidir (20,143).

b-Sıvı Faz Antioksidanlar

Askorbik asit (AA, Vitamin C): Askorbik asit, non membranöz serbest radikal toplayıcısı olarak görev yapar. İnsanlar, diğer primatlar, kobaylar ve meyve yiyen yarasaların, L-glukonolakton oksidaz enzimini içermedikleri için sentezleyemedikleri esansiyel bir diyet vitaminidir. AA, kollagen biyosentezinde

kullanılan prolin hidroksilaz ve dopamini noradrenaline dönüştüren dopamin-beta-hidroksilaz için önemli bir kofaktördür. AA, güçlü bir redükleyici ajan ve antioksidan olup süperoksit, peroksit ve hidroksil radikalleriyle reaksiyona girerek bir ara ürün olan semidehidroaskorbat yoluyla metaboliti dehidroaskorbik asiti (DHA) oluşturur (37).



Bazı fizyolojik durumlarda askorbat ferrik demirin (Fe^{+3}) ferröz demire (Fe^{+2}) redüksiyonu ile lipid peroksidasyonuna yol açabilir.



Bundan sonra ferröz iyon, hasarlayıcı hidroksil türlerini oluşturmak üzere bir Fenton reaksiyonuna girebilir.

AA, dehidroaskorbat redüktaz tarafından katalizlenen bir reaksiyon ile glutatyon tarafından rejenere edilir.



Diğer Sıvı Faz Antioksidanlar

Ürik asit, sistein, seruloplazmin, transferrin ve albumin primer olarak toksik oksijen metabolitlerine etki ederek onları daha dayanıklı bileşiklere çevirirler (143).

Çeşitli araştırmacılar son yıllarda insan plazmasının güçlü bir antioksidan olduğunu açıklamışlar ve antioksidan potansiyelin ölçümü için biyolojik ölçüm yöntemleri geliştirmişlerdir.

Seruloplazminin (bakır bağlayan protein) basit lipid emülsiyonlarında ve doku homojenatlarında oldukça etkili serbest radikal inhibitörü olduğu görülmüştür. Bakır, bu işlem için tek başına etkisiz olup apoproteini ise seruloplazminden Cu atomlarının uzaklaştırılması ile elde edilir. Seruloplazminin en önemli özelliklerinden biri oksidaz benzeri aktivite göstermesidir. Enzim ailesinde oksidazlar, çeşitli organik substratların atmosferik oksijen tarafından direkt oksidasyonunu kataliz ederler. Bu etkisinin dışında “ferroksidaz” olarak ferröz demiri ferrik demire çevirir.

Sonuçta; serüloplazmin bir serbest geçiş metali gibi davranarak dengenin değişmesini önler. Aynı zamanda bir akut faz reaktanı olup doku hasarından sonra

düzeyi artmaktadır ve böylece diğer akut faz reaktanları gibi lokal hasarın meydana getirdiği etkileri önlemektedir (30). Ekstraselüler antioksidanlar aşağıda Tablo 3’de özetlenmiştir (143).

Tablo 3. Ekstra selüler antioksidanlar

Adı	Fonksiyonları
Transferrin	Ferrik iyonlarını bağlar
Laktoferrin	Fagositik hücrelerden salınır. Düşük pH’larda ferrik iyonlarını bağlar.
Haptoglobilin	Hemoglobini bağlar ve lipid peroksitlerinin parçalamasına karşı korur.
Hemopeksin	Hem’i bağlayarak lipid peroksitlerinin parçalanmasına engel olur.
Albumin	Bakır, hem ve demiri bağlar. Hipoklorik asidi (HOCl) temizler.
Seruloplazmin	Ferroz iyon ve komplekslerin oksitlenerek ferrik duruma geçmesini katalizler (ferroksidaz aktivite). Sitokiometrik olarak süperoksit temizleyicisidir. Bakır iyonlarını non spesifik olarak bağlar ve bakıra bağlı radikal reaksiyonlarını inhibe eder. $\text{Fe}^{+2} \longrightarrow \text{Fe}^{+3} \text{ (ferroksidaz aktivite)}$ $\text{CpCu}^{+2} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{CpCu}^{+} + \text{O}_2$
Ekstraselüler SOD	Süperoksit radikallerini katalitik olarak temizler.
Ekstraselüler GSH-Px	H ₂ O ₂ ve lipid hidroperoksitlerini katalitik olarak temizler
Billurubin	Peroksil radikallerini temizler ve albumine bağlı yağ asitlerini oksidasyondan korur.
Mukus	Hidroksil radikallerini temizler. Metal iyonlarını bağlar.
Glukoz	Hidroksil radikallerini temizler.
Ürik asit	Radikal temizleyici ve metal bağlayıcı olarak davranır.
Askorbik asit	Hidroksil radikallerini temizler.

c-Redükte Glutasyon

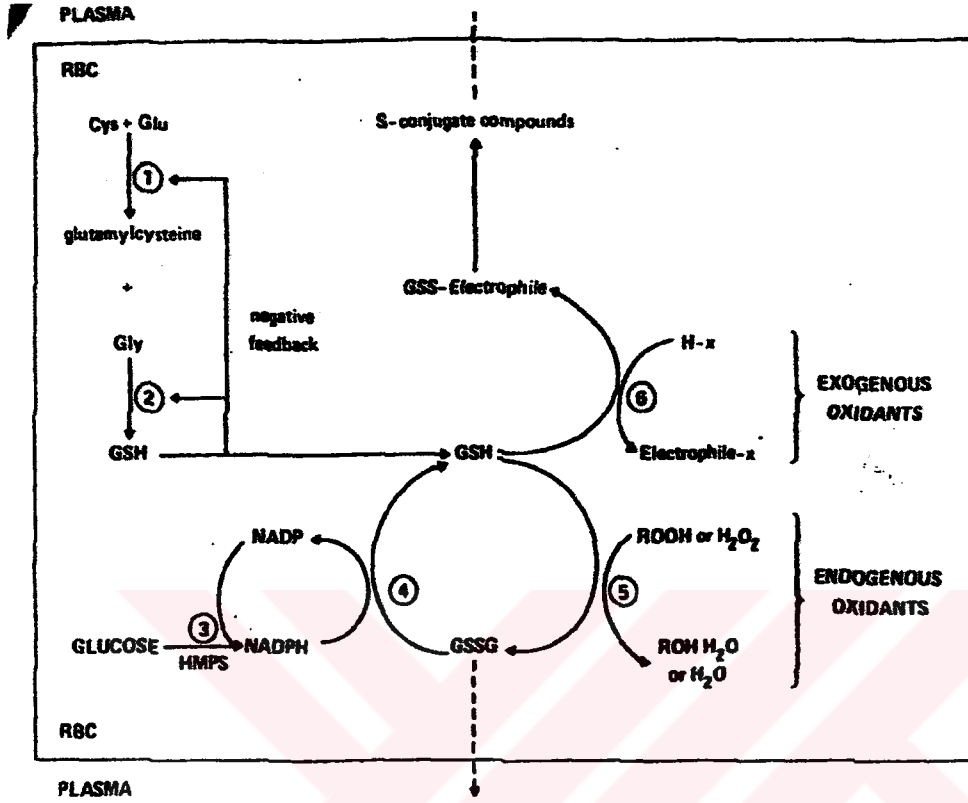
Redükte glutasyon (l- γ -glutamyl-l-cysteinyl-glycine; GSH) içerdiği tiol gruplarıyla hemen hemen bütün hücrelerde, metabolizmanın fonksiyonlarında, transportta ve hücre sel korumada rol oynayan bir tripeptittir (88).

Yapısında 14 karbon atomu taşıyan L-glisin, L-glutamik asit verilmesi ile gerçekleştirilen radyoizotop çalışmalar eritrositlerin glutasyonu ikinci basamakta sentezlediği görüşünü desteklemektedir. Glutasyonun en fazla olduğu dokular eritrosit ve lens dokularıdır (123).

37°C 'de GSH'ın bütün içeriği eritrositlerde 10 dakika'da sentezlenir ama buna rağmen bir çok dokuda GSH'ın kesin rolü hala anlaşılmamıştır. İzotopik çalışmalarla hızla dönüşüme uğradığı ve ADP, GSH ve NADPH+ H⁺ tarafından allosterik olarak inhibe edildiği saptanmıştır. GSH'ın fonksiyonları; proteinler ve diğer moleküllerin disülfid bağlarının redüksiyonu, DNA'nın deoksiribonükleotid prekürsörlerinin sentezi ve metabolizmanın normal işleyişi esnasında oluşan serbest radikal ve reaktif oksijen metabolitlerinin etkilerinden hücreyi korumaktır. GSH hücre dışına taşınır. Bu yol ; γ -glutamil aminoasidi için bir taşıma sistemi ile birleşir ki, hücre membranında bulunan aminoasitdeki sülfür grubunun hücreler ve organlar arasında taşınmasını gerçekleştirir. GSH bir çok ilaç ve metabolik ürünün (endojen bileşiklerden; östrojen, prostaglandin, lökotrien gibi) inaktivasyonunda rol oynar. Aynı zamanda birçok enzim için de koenzimdir (82,88).

Şekil 8'de görüldüğü gibi eritrositlerde hemoglobinin oksidasyondan korunması için glutasyon redüktaz (GSSGR) ve bu enzim sisteminin gerekli komponentleri birlikte düzenlenmektedir. GSH'ın yüksek düzeyleri NADPH bağımlı enzim olan GSSGR'ın katalizlemesiyle GSSG'den GSH'a redüksiyonla sürdürülür. Glukoz daima G6PDH enziminin aktivitesi sayesinde heksoz monofosfat şantından geçerek devamlı oluşan NADPH+ H⁺ tarafından GSH'ın rejenerasyonunu gerçekleştirir. Eritrositlerdeki GSSG düzeyi daima düşüktür. GSSG, eritrosit membranından hızla geçebilme özelliğine sahiptir. Oksidatif stres altında eritrositlerden GSSG salınır bu da muhtemelen GSH-Px'in aktivitesi sonucu intraselüler GSSG içeriğinin artışı ile sonuçlanır. Plazma kompartımanı eritrosit oksidatif stresine kısmen uyabilir, çünkü kırmızı hücreler dışarıya aşırı GSSG salınımı etkisiyle düşük GSSG'nin intraselüler konsantrasyonunu korumaya gayret

ederler. Böylece intraselüler GSSG/GSH oranındaki küçük değişiklikler plazmada geniş yankılar uyandırabilir (24,143).



Şekil 8. Glutatyonun rol oynadığı mekanizmalar. Kısaltmalar: 1= γ -glutamilsistein sentetaz; 2=glutatyon sentetaz; 3=G6PDH; 4=glutatyon redüktaz; 5=glutatyon peroksidaz; 6=glutatyon-S-transferaz; HMPs=Heksozmono fosfat şantı; Cys=sistein; Glu=glutamik asit; Gly=glisin; GSH= redükte glutatyon.

Buraya kadar anlatılan antioksidanların çoğu radikallerin etkisini önlemek amacıyla hastalıkların tedavisinde kullanılır. Ancak katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri tedavi amaçlı kullanılamazlar. Çünkü barsak enzimleri tarafından inaktive edilirler. Ancak oral yol ile alınan selenyum, glutatyon peroksidaz ve katalaz etkisini *in vivo* olarak artırıp serbest radikallerin toksisitesini ortadan kaldırmaya çalışır. Fenton reaksiyonu sonucu oluşan bu metallerin meydana getirdiği serbest radikaller, metallere bağlı serbest radikal oluşumunu engeller. Desferal veya desferoksamin, Fe ve Cu ile şelat oluşturarak vücuttan atılır ve bu şekilde Fenton reaksiyonuna bağlı olarak demirin oluşturduğu serbest radikal oluşumu ortadan kalkmış olur (8,30).

III.I .İskemi ve Reperfüzyon

İskemi; organa gelen kan akımının yetersizliği veya dokunun bozulmuş perfüzyonu olup, uzayan iskemide hücrelerin bütünlüğü kaybolmakta ve hücre ölüm meydana gelmektedir. Serbest oksijen radikallerinin iskemi-reperfüzyon hasarındaki rolü bu alanda en çok çalışılan konular arasında yer almaktadır. İskeminin neden olduğu patolojik olaylar; özellikle iskemik kalp hastalıkları, serebral iskemi ve organ transplantasyonu gibi hem sık karşılaşılan hem de yaşamı tehdit eden durumlardır. Bununla beraber tedavi yöntemlerinin gelişmesi ile iskemik dokunun reperfüzyonunun ciddi bir doku hasarı oluşturduğu saptanmıştır. Bu durum önceleri “Oksijen paradoksu” olarak isimlendirilmiştir (87,106,110,136).

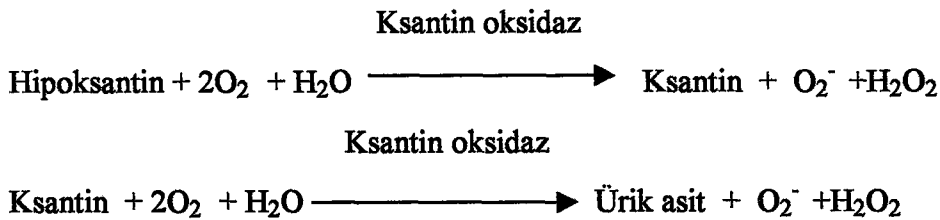
İskeminin ilk dakikalarında aşırı stimüle olan glikolitik yol, ortamda sitrat, laktat, NADH birikimi ve doku asidozunun gelişmesiyle inhibe olur. İskemik doku da var olan oksijen ise oksidatif fosforilasyonu desteklemek için yetersiz kalır ve glikolizis sonucu oluşan piruvatın Krebs siklüsüne değil de laktata dönüşü gerçekleşir. ATP'nin anaerobik olarak üretimi doku ihtiyacını karşılayamaz ve iskemi devam ettikçe ATP'nin doku düzeyleri düşer, hücre için zararlı olayları başlatır. Sonuçta hücre içi Na^+ girişi olur ve reperfüzyon esnasında Ca^{+2} ile yer değiştirir. Hücre içine kalsiyum girişiyle kalsiyumdaki net artış hücrenin iyonik dengesini bozar. Bundan sonra kalsiyum mitokondri içine sızmaya başlar. Mitokondrinin kalsiyumla yüklenmesi ATP üretimi için uygun olmayıp, kalsiyumun varlığıyla proteazlar ve fosfolipazlar aktive olur. Fosfolipazların aktivasyonu serbest yağ asidi ve lizofosfolipidlerin salınımına bağlı olarak hücre membranında toksik etkiler oluşturur. Bu etkilerinin yanında araşidonik asit metabolizmasını başlatarak, reperfüzyon esnasında sitotoksik ürünler ve radikal türevleri üretilir. Proteazların aktivasyonu, hücre iskeletinin parçalanmasına neden olur. Enzim sisteminde değişmeler meydana gelirken yine reperfüzyon esnasında SOR oluşumu gerçekleşir ve hatta artar. Böylece iskemi esnasında oluşan bir çok olay reperfüzyon esnasında oluşacak olan hasarları hazırlar. McCord tarafında yapılan bir çok çalışmada, iskemi sırasında oluşan hasarların reperfüzyon hasarları için başlangıç teşkil ettiği ileri sürülmüştür (44,87).

Deneysel çalışmalar, reperfüzyonun (yeniden kanlanma) akut fazı esnasında önceki iskemik doku üzerine ek bir hasar yüklediğini göstermiştir. Reperfüzyon

hasarı olarak bilinen bu ardışık olaylar; intraselüler enzimlerin salınımını potansiyalize eder, Ca^{+2} 'un hücre içine girişi, sarkolemmal fosfolipitlerin bozunumu ve hücre membranlarının dağılması; bütün bunlar tek başına veya kombine olarak sonunda hücre ölümüyle sonuçlanır. Bu değişiklikler, iskemi esnasında değil de, daha çok reperfüzyon esnasında meydana geldiğinden “reperfüzyon hasarı” olarak bilinir. Reperfüzyon hasarının en az üç bileşeni vardır. Bunlar; mikrovasküler hasar, hücre nekrozu ve hemorajidir. Aslında iskemiye maruz kalan her organda reperfüzyon hasarı oluşur ki; iskemi esnasında biyokimyasal olayların oluşumuyla kendini gösterir ve sonuçta süperoksit anyonu, hipoklorik asit (HOCl) ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen metabolitleri yanında Ca^{+2} artar ve sarkolemmal fosfolipitlerin kaybı meydana gelir (41,44,137,143).

Karaciğerde serbest oksijen radikalleri oluşturan birçok önemli potansiyel mekanizma bulunmaktadır. Bunlardan birincisi ksantin oksidazdır. Ksantin oksidaz, iskemik dokuda serbest radikal oluşturan ve karaciğer dokusunda bol miktarda bulunan bir enzimdir. Nükleik asit yıkımında hız kısıtlayıcı bir enzim olan ksantin oksidaz, tüm pürinlerin terminal oksidasyonunu katalizler. Bu ilk basamak ATP'nin yıkım ve tüketilme işlemi olup, bu da hipoksantin tarafından indirgenir. Normalde hipoksantin, ksantin dehidrogenaz enzimi tarafından okside edilir. Ksantin NAD^{+} 'i kullanarak NAD^{+} 'nin $NADH$ 'a dönüşümünü sağlayarak oksidasyon işlemini gerçekleştirir (137).

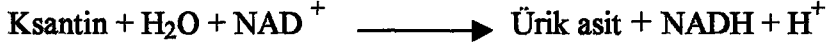
İskemik dokuda O_2^{\cdot} nin ana kaynağının ksantin oksidaz olduğu ileri sürülmekte ve hipoksantin ve ksantin oksidasyonu esnasında, H_2O_2 ve süperoksit radikali oluşmaktadır.



Bu görüşe göre; iskemik dokuda iskemi ve reperfüzyon sonrası oluşan vasküler permeabilite artmakta ve mukozal lezyonlar bir ksantin oksidaz inhibitörü olan allopurinol kullanılarak inhibe edilmektedir (122,136,143).

Ksantin oksidaz endotel hücrenin önemli bir serbest radikal kaynağıdır. Ksantin oksidaz enziminin Tip D ve Tip O olmak üzere iki şekli bulunur. Ksantin dehidrogenaz (Tip D) NAD^+ -redükleyici olarak ksantinün ürik aside dönüşümünü sağlar. Bu dehidrogenaz formu molekuler oksijene elektron transferi yaparak süperoksit veya hidrojen peroksit gibi radikal formlarının oluşumu gibi işlemleri yapmaz sadece NAD^+ 'ın indirgenmesini gerçekleştirir.

Tip D



Ksantin oksidaz Tip O ise bu reaksiyonda oksijeni kullanarak süperoksit radikali oluşumuna neden olur. Süperoksit radikali postiskemik dokuda ksantin oksidaz enzimi tarafından oluşturulan majör üründür (87,105,106).

Tip O



İskemi sırasında yüksek enerjili bir fosfat bileşiği olan ATP katabolizması sonucu hipoksantin ve ksantin gibi pürin metabolitlerinin konsantrasyonu yükselir ve aşırı miktarda hipoksantin birikir. Bunun iki nedeni vardır.

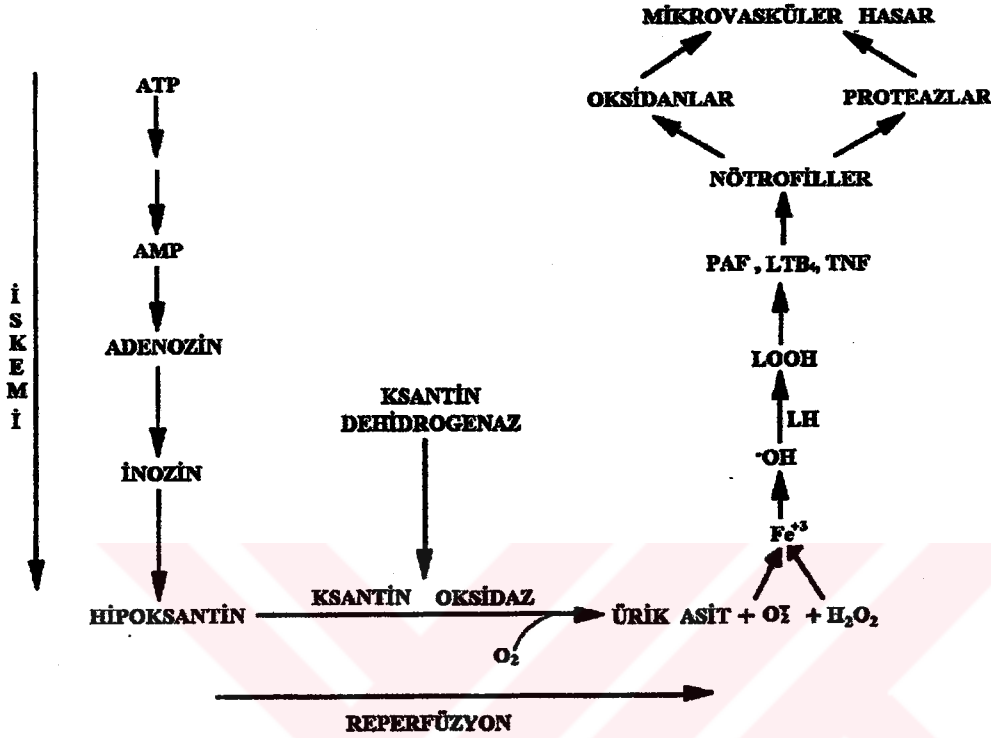
1-Artık dokuda ksantin mevcut değildir

2-Ksantin substrat olarak NAD^+ yerine oksijeni kullanır ve böylece hipoksantin ksantine dönüşemez.

ATP'nin yıkımının artışı sırasında hücre içine kalsiyum girişi ile kalsiyum proteazının artışına bağlı olarak ksantin oksidaz Tip D, Tip O'ya dönüşmektedir (D-O-D dönüşümü olarak isimlendirilir) (47,87,137,143).

Normal koşullarda hipoksantin, ksantin dehidrogenaz enzimini kullanarak ve $\text{NADPH} + \text{H}^+$ varlığında ksantin ve NADP^+ oluşur. Ancak iskemi sırasında Şekil 9'da görüldüğü gibi ksantin dehidrogenaz enzimi bol miktarda bulunur ve ksantin oksidaz enzimine çevrilir. Reperfüzyon sırasında aniden ve çok miktarda oksijen sisteme dahil olur. Bu da pürinlerin çok süratli bir şekilde okside olmasına neden olur. Oluşan urat ve süperoksit anyonundan süperoksit; Haber-weiss ve Fenton reaksiyonlarını kullanarak demir veya bakır varlığında serbest hidroksil radikallerinin üretilmesine neden olur. Ancak son yıllarda doku hasarına neden olan

kompleksin Fe^{+3} -dioksijen- Fe^{+2} (perferil) radikalinin olabileceği görüşü ileri sürülmektedir (47,87,105,110).

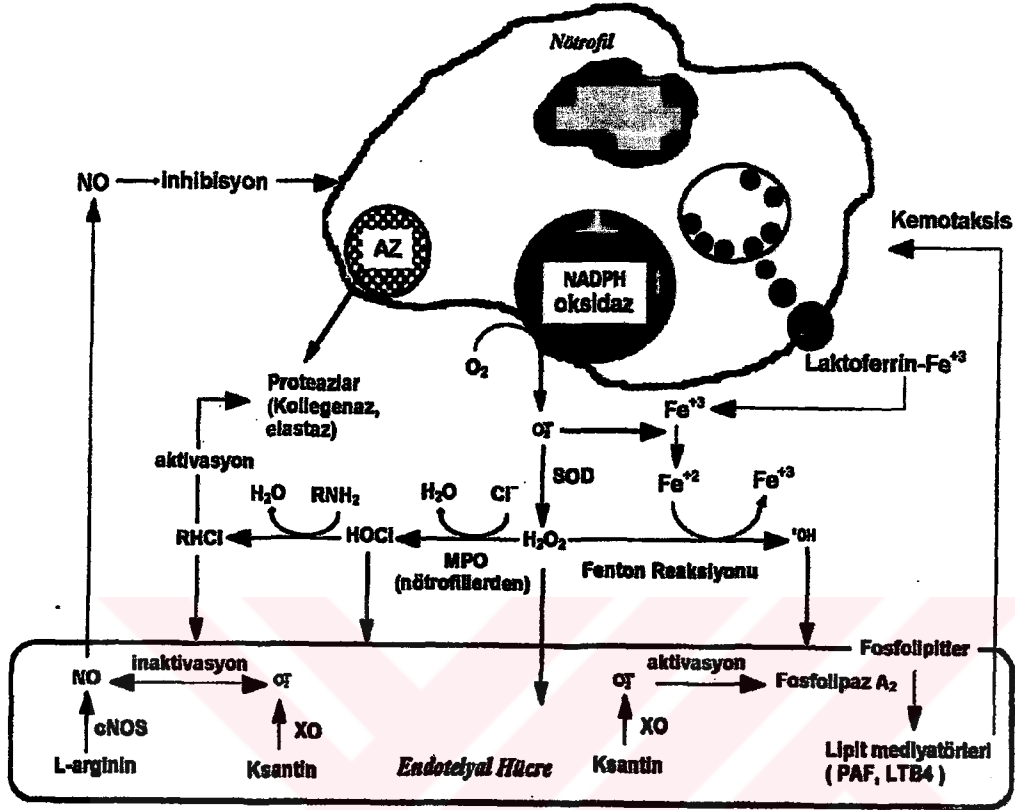


Şekil 9. Ksantin oksidaz enzimi ile oksidan maddelerin üretilmesi

Süperoksit anyonu endotelial hücrelerde H_2O_2 , OH^- ve HOO^- gibi diğer oksijen metabolitlerinin de açığa çıkmasına neden olur. Doku yaralanmalarında endotelial hücre bir tetik görevi görmektedir. Ksantin oksidaza bağımlı serbest radikal oluşumuna esas teşkil eden sistem endotelial hücrenin kendisinde mevcuttur. Ksantin oksidaz ve nötrofil sistemi doku zedelenmesine esas teşkil eden mekanizmayı meydana getirir. Süperoksit anyonu H_2O_2 'e nötrofillerde mevcut olan SOD etkisiyle dönüşür. Bu olay daha çok ince barsak ve miyokard iskemilerinde gözlenir. Bir ksantin oksidaz inhibitörü olan allopurinol iskemik yaralanmaları önlemek için tedavi amaçlı kullanılabilir (61).

Karaciğer dokusunda serbest radikallerin bir diğer kaynağı Şekil 10'da gösterildiği gibi nötrofillerdir. İskemi sonrası reperfüzyon esnasında salınan komplement, lökotrienler, kemotaktik proteinler gibi mediyatörler, dolaşımdaki

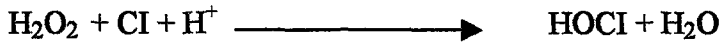
nötrofillerin adezyonuna ve aktivasyonuna neden olurlar. Nötrofillerde bulunan NADPH oksidaz ise moleküler oksijeni süperoksit radikaline redükler (9).



Şekil 10. Nötrofillerin oksijen radikalleri oluşturma mekanizmaları

Oksijen metabolizmasında demir donörü olarak önemli role sahip olan laktoferrin, nötrofillerde depo edildiği spesifik granüllerden salınır. Ayrıca aktive edilmiş nötrofiller myeloperoksidaz enzimini de sekrete ederler. Bu enzim, hidrojen peroksit ve klor iyonundan hipoklorik asit oluşumunu katalizler (44,143).

Myeloperoksidaz

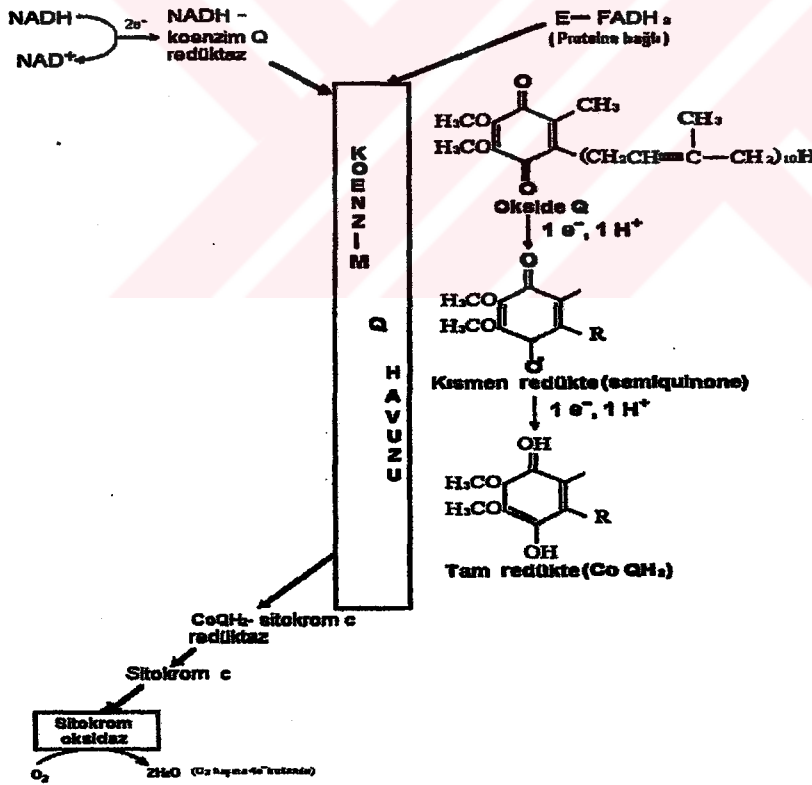


Hipoklorik asit, hidrojen peroksitten yaklaşık yüz kat daha fazla reaktif bir oksidan ve klorlayıcı ajandır. Primer aminlerle (RNH_2) hızlıca reaksiyona girerek N-kloro türevleri (RNHCl) üretirler. Bunlar hidrojen peroksit ve hipoklorik asitin oksidan ekivalantlarıdır (138,143).



Sitotoksitenin, HOCl ve N-kloraminlerle sülfidril gruplarının oksidasyonu, hem protein ve sitokromlarının aktivasyonu, aminoasit ve proteinlerin degradasyonu ile meydana geldiği düşünülmektedir. Ksantin oksidaz ile türetilen oksidan ajanlar, inflamatuvar mediyatörlerin hem üretimlerini hem de salınımını başlatırlar (138,143).

Aerobik canlılarda süperoksit radikalının üretildiği en önemli kaynakların başında mitokondri gelir. İskemi-reperfüzyon hasarına maruz kalan karaciğer hücresinde metabolik yolların işleyişi esnasında hızla radikal oluşumu gerçekleşir. Şekil 11'de gösterildiği gibi mitokondriyal oksijen sisteminde, moleküler oksijen 4 adet elektron almak suretiyle suya dönüşmekte ve bu arada ATP sentezi gerçekleşmektedir. Bu kademedeki toksik oksijen metabolitleri sentezlenmez ancak, %1-1,5 kadar oksijen kaçağı sözkonusudur. Kaçak moleküller oksijen bir elektron alarak redüksiyona uğrar ve süperoksit radikali teşekkül eder. Süperoksit radikali ise bir elektron almak suretiyle hidrojen peroksit redüklenir (44,136).



Şekil 11. Mitokondride elektron transport zinciri.

Elektron transportunun son tepkimesi olan sitokrom oksidaz tepkimesinde üretilen süperoksit radikalleri proteinlere sıkıca bağlanıp oksijenin redüksiyonunda kullanılır, ortama salınma olmaz. Elektron transport zincirinin diğer bileşenleri olan NADH- koenzim Q redüktaz kompleksi ve koenzim Q bölgelerinden sızan bazı elektronların (%1-1,5) oksijen üzerinden univalent redüksiyonu sonucu süperoksit radikali oluşumu gerçekleşmektedir. Normalde bu şekilde üretilen süperoksit radikalleri, mitokondriyal süperoksit dismutaz enzimi tarafından dismutasyona uğratarak uzaklaştırılır.

Oldukça yoğun metabolik olayların cereyan ettiği karaciğerde, iskemi sonrası reperfüzyon esnasında ani oksijen hücumu mitokondriyal respirasyonu, dolayısıyla süperoksit radikali oluşumunu artırır ve serbest radikal temizleyici sistem yetersiz kalabilir (62, 143).

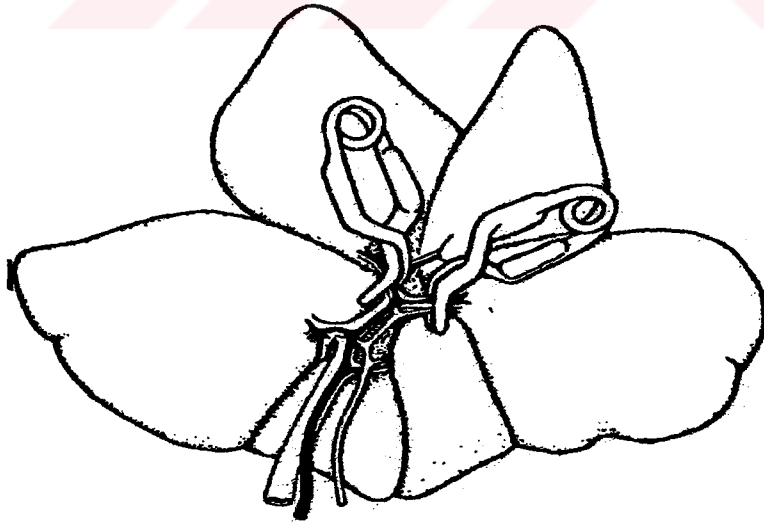


IV. MATERYAL VE METOT

IV. A. Materyal

IV.A.1.Denek Seçimi

Çalışmada ortalama $628,19 \pm 112,49$ gr. ağırlığında 31 adet dişi kobay kullanıldı. Deney hayvanları T.C. Tarım ve Köy işleri Bakanlığı Elazığ Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edildi. Bütün aşamalarda 'Experimental and surgical technique in rat' prensiplerine uyuldu. Bütün hayvanlar aynı yem içeriğiyle beslendi ve deney öncesinde herhangi ek bir uygulamaya tâbi tutulmadı. 12 saatlik açlık süresini takiben kobaylara ketamin (30 mg/kg vücut ağırlığı, IM) ve rompun (2 mg/kg vücut ağırlığı, IM) ile kg başına 250 İÜ olacak şekilde heparin enjeksiyonu yapıldı. Genel anestezi altında, karın bölgesi traş edilip Betadin ile temizlendikten sonra median laparotomi uygulandı. Denekler hepatik arter ve vena porta, hilus seviyesinde vasküler klempe (buldog) klempe edildi (Şekil 12) ve karın 3/0 atravmatik ipekle kapatıldı. Denekler 4 ana gruba ayrılarak şu işlemlere tabi tutuldu.. Grup 1(sham grubu) 8 kobaydan oluştu ve sadece midline laparotomi uygulandı, iskemi oluşturulmadı. Grup 2: Midline laparotomiyi müteakip çift buldog klemp kullanılarak karaciğerin sol lateral ve median loblarını içine alacak şekilde hepatik arter ve portal vene klemp konularak 60 dk. iskemi ve ardından 30 dk. reperfüzyon uygulandı. Grup 3: Bu grup ise aynı şekilde iskemi reperfüzyon



Şekil 12. Vasküler klemp ile karaciğer iskemisi oluşturulması

uygulaması yapıldı ama reperfüzyondan 5 dk. önce femoral arterinden 5000 Ü/kg olacak şekilde İV antioksidan olarak SOD verildi. Grup 4: Hem antioksidanların etkinliğini hem de kullanılan antioksidanlardan hangisinin daha etkili olduğunu göstermek açısından iskemiden 10 dk. sonra 200 mg/kg dozunda intra peritoneal olarak bir ksantin oksidaz inhibitörü olan allopurinol verildi (7,22,38,70,89,90,135).

IV. A. 2.Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarımızda kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Merck(Almanya) ve Sigma(A.B.D.) firmalarından temin edilmiştir.

IV. A. 3.Aletler

Homojenatların hazırlanması işleminde Potter- Elvehjem cam-cam homojenizatör, santrifüj işlemlerinde Jouan A4 santrifüjü kullanıldı. pH ölçümleri Schoot Mainz marka pH metre, spektrofotometrik ölçümler Shimadzu UV-1201 spektrofotometre, serum eser element tayini Shimadzu UV-6701 atomik absorpsiyon spektrofotometresi kullanılarak yapıldı.

IV.A. 4.Örneklerin Alınması ve Hazırlanması

Kan örnekleri reperfüzyon bittikten sonra diafragmanın üstünden orta hattı takiben göğüs boşluğu açılıp kalbe girilerek alındı. Elde edilen kanın bir kısmı plazma ve hemolizat hazırlanması için EDTA'lı tüplere, geri kalan kısmı serum eldesi için hemoliz olmadan vakumlu tüplere aktarıldı. Hemolizat hazırlanması her parametrenin çalışılmasında ayrıcalık ifade ettiğinden her parametrenin yöntem kısmında anlatılmıştır.

Karaciğer dokusu ise kan alım işlemlerinden sonra, soğuk serum fizyolojik (%0.9) ile yıkanarak kandan temizlenmesi sağlandı. $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz tayini için aktivite kaybını önlemek açısından bir kısım karaciğer dokusu hemen homojenize edilerek kullanıldı, bir kısmı formol içine alınarak histopatolojik inceleme için patoloji laboratuvarına gönderildi ve geri kalan doku parçası doku MDA tayini için çalışma yapılınca kadar -20°C 'de derin dondurucuda saklandı.

IV. B. Metodlar

IV. B. 1. Plazma Lipid Peroksit (LPO) Ölçümü

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malonildialdehid (MDA) tayini Satoh (115) ve Yagi'den (141) modifiye edilen bir yöntemle spektrofotometrik olarak Schimadzu UV-1201 spektrofotometresi kullanılarak yapıldı.

Prensip: Plazmada bulunan lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA, aerobik şartlarda, pH:3.4 olduğu bir ortamda tiyobarbutirik asit (TBA) ile 95⁰C de inkübasyonu sonucu pembe renkli kompleks oluşturur. Bu pembe rengin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü ile MDA miktarı saptanır.

Ayırıcılar:

1-N/12 sülfürik asit

2-%10 fosfotungustik asit (PTA)

3-Tiyobarbutirik asit (TBA) ayıracı: Eşit hacim %0.67 TBA ile glasiyel asetik asit karıştırılır.

4-n-Bütanol

5-Standart (1,1,3,3,tetrametoksipropan)

Standart Eğri Çizimi:

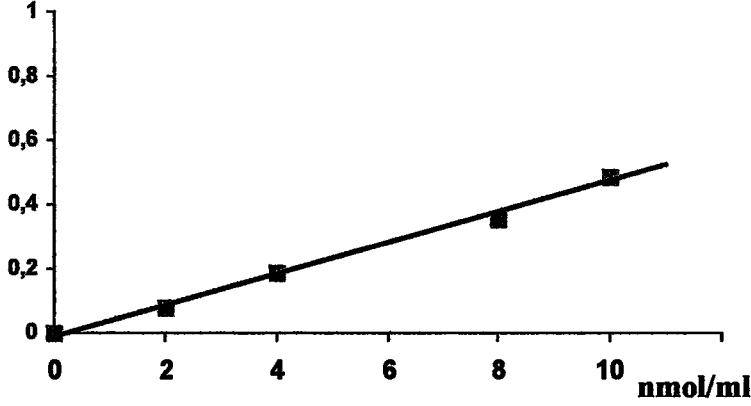
Stok standarttan 10µl alınıp 100 ml'ye tamamlanarak konsantrasyonu 40 mmol/L olan günlük stok standart hazırlandı. Bu stok standarttan belirli oranlarda sulandırılmalar yapılarak 2, 4, 8, 10, 20 nmol/ml konsantrasyonlarda çalışma standartları hazırlandı. Ayırıcılar tüplere şu şekilde ilave edildi.

	Kör	Std (1)	Std (2)	Std (3)	Std (4)	Std (5)
Distile su (ml)	4	3	3	3	3	3
TBA ayıracı(ml)	1	1	1	1	1	1
Standart (ml)	---	1	1	1	1	1
		(2nmol/ml)	(4nmol/ml)	(8nmol/ml)	(10nmol/ml)	(20nmol/ml)

Tüpler iyice karıştırıldı ve üzerine cam bilye konularak 90⁰ C de 60 dk. kaynar su banyosunda kaynatıldıktan sonra soğutuldu ve her tüpe 3 ml n-bütanol eklendi. Vorteks edilen tüpler 3000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Bütün standartların n-bütanol fazı 532 nm'de köre karşı okundu. Belirli oranlarda

hazırlanan bu standartlardan aşağıdaki eğri çizimi yapıldı ve daha sonra çalışılan tüm örnekler için bu eğri kullanılarak değerlendirmeler yapıldı.

Absorbans



Örnek çalışması için ayıraçlar aşağıda verilen tabloda belirtildiği şekilde tüplere konuldu.

	Kör	Standart	Örnek
Plazma (ml)	----	----	0.3
N/12 H ₂ SO ₄ (ml)	----	----	4
% 10 PTA(ml)	----	---	0.5

İyice karıştırıldı ve oda ısında 5 dk. bekletildikten sonra 3000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, altta kalan presipitat alındı ve üzerine 3 ml. distile su konularak vortekslendi. Tekrar 3000 rpm.'de 10 dk. santrifüj edildi ve yine presipitat alındı.

Distile su (ml)	4	3	4
TBA ayıracağı (ml)	1	1	1
Standart (ml)	----	1	----

Tüpler vortekslendi ve üzerine cam bilye konularak 90⁰C de 60 dk. kaynatıldı. soğuk su altında soğutulan tüplerin üzerine 3 ml. n-bütanol eklendi ve karıştırıldı. Tüpler 3000 rpm.'de 10 dk. santrifüj edildikten sonra üstteki organik faz alınarak 532 nm.'de köre karşı absorbansları okundu.

Hesaplama :

532 nm.'de okunan örnek absorbanları standart eğriden değerlendirildiği gibi, günlük çalışılan belirli konsantrasyondaki standartla oranlanarak aşağıdaki formül yardımıyla değerlendirildi.

$$\text{MDA(nmol/ml)} = \frac{\text{Örnek O.D}}{\text{Std. O.D}} \times \text{Std. Konsantrasyonu}$$

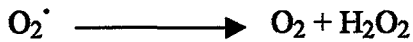
IV.B.2.Eritrosit Süperoksit Dismutaz (SOD) Tayini

Eritrosit SOD enzim aktivitesi, Randox firmasının enzimatik metoduyla çalışılan RANSOD adlı ticari kiti kullanılarak ölçüldü (111).

Prensip: SOD, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin (O_2^{\cdot}) hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Bu yöntem, ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak oluşturulan süperoksit radikallerinin, 2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenol]-5-feniltetrazolium klorid (p-iyodonitrotetrazolium viyole: INT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formazon boyasının 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin okunması esasına dayanır. Örnekte bulunan SOD, süperoksidi ortamdan uzaklaştırarak formazon reaksiyonunu inhibe eder. Sonuçta oluşan kırmızı renkteki azalmanın belirlenmesiyle SOD aktivitesi ölçülür. Kırmızı rengin şiddeti SOD aktivitesinin büyüklüğü ile ters orantılıdır.

Ksantin oksidaz

veya ,

SOD**Ayrıçlar:**

1- CAPS (3-(sikloheksilamino)-1-propan sülfonik asit) tamponu

CAPS(50 mmol/L), EDTA(0.94 mmol/L). pH, NaOH ile 10.2'ye ayarlanır ve buzdolabında saklanır.

2-Stok Standart Karışımı

Ksantin (0.05 mmol/L), INT (0.025 mmol/L) . CAPS tamponu ile hazırlanır. Bu çözelti buzdolabında saklanmalıdır.

3- Ksantin oksidaz (80 Ü/L)

4- 0.01 M Fosfat Tamponu(pH:7.0)

5- Standart (S6)

Her bir kitin içinden farklı derişimlerde hazır standart SOD (S6) çözeltisi bulunur. Bu liyofilize ayıraç 10 ml distile su ile sulandırıldı ve SOD derişimleri fosfat tamponuyla aşağıdaki tabloda verildiği şekilde hazırlanarak standart eğri çizimi için kullanıldı.

No	Kullanılacak standart	0.01 M fosfat tamponu	SOD derişimi (Ü/ml)
S5	S6 5 ml	5 ml	2.8
S4	S5 5 ml	5 ml	1.4
S3	S4 5 ml	5 ml	0.7
S2	S3 3ml	6 ml	0.23

S1 çalışma körü olup sadece fosfat tamponu konuldu.

Yöntem:

Aşağıdaki tabloda olduğu gibi deney düzeneği kuruldu ve deney yapıldı.

Çözeltiler	Kör	Standart
Standart (ml)	–	0.05
Fosfat tamponu (ml)	0.05	–
Substrat karışımı (ml)	1.7	1.7

İyice karıştırıldı ve ksantin oksidaz eklendi.

Ksantin oksidaz (ml)	0.25	0.25
----------------------	------	------

Ksantin oksidaz eklendikten sonra alt üst edildi ve 30 sn. sonra 505 nm dalga boyunda havaya karşı ilk okuma yapıldı (A1). 3 dk. sonra ikinci absorbens alındı(A2).

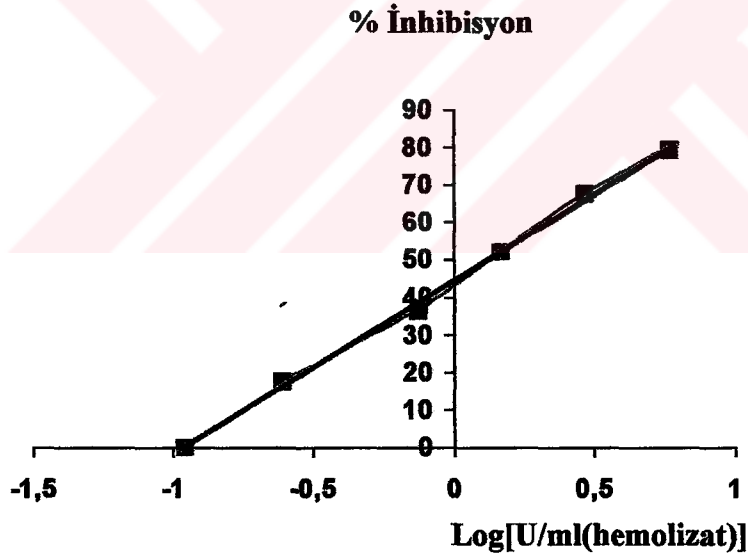
Hesaplama:

Çalışma körü SOD içermediği için inhibisyona uğramamış reaksiyon olarak kabul edildi ve değeri %100 olarak alındı. Tüm standartlar için % inhibisyon değeri, bunlara ait değerlerin çalışma körüyle oranlanarak 100'den çıkarılması sonucu hesaplandı.

$$\Delta A/dak_{standart} = \frac{A_2 - A_1}{3 \text{ dak}}$$

$$\% \text{ inhibisyon}_{standart} = 100 - \frac{\Delta A/dak_{standart} \times 100}{\Delta A/dak_{\text{çalışma körü}}}$$

Hesaplama yapıldıktan sonra X (yatay) eksenine SOD derişimlerinin (Ü/ml) logaritmik dönüşüm değerleri, Y (dikey) eksenine standartlara ait % inhibisyon değerleri yazılarak standart eğri elde edilir.

**Örnek Çalışması:**

Eritrosit hemolizat hazırlama işlemi şöyle gerçekleştirildi; 0.5 ml EDTA'lı kan 3000 rpm.'de santrifüj edilerek üstteki plazma kısmı atıldı. Kalan eritrositler 3 ml %0.9 'luk NaCl ile 4 kez yıkandı. Her yıkamadan sonra eritrosit süspansiyonu 3000 rpm.'de 10 dk. santrifüj edildi. Yıkamış eritrositler soğuk distile suyla 2 ml.ye

tamamlandıktan sonra altüst edilerek +4°C de 15 dk. bekletildi. Oluşan lizat fosfat tamponuyla yüzde inhibisyonu %30-60 arasına düşürülecek şekilde seyreltildi.

Yöntem:

Ayraçlar,tüplere aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi konuldu.

<i>Çözeltiler</i>	<i>Çalışma körü</i>	<i>Standart</i>	<i>Hemolizat</i>
Numune(ml)	-	-	0.05
Standart(ml)	-	0.05	-
Fosfat tamponu(ml)	0.05	-	-
Substrat karışımı	1.7	1.7	1.7

iyice karıştırılır.

Ksantin oksidaz (ml)	0.25	0.25	0.25
----------------------	------	------	------

Tekrar karıştırıldıktan 30 sn. sonra 505 nm dalga boyunda havaya karşı başlangıç absorbans (A₁) 0. dakikada okundu. 3 dakika sonra son absorbans (A₂) okundu.

Hesaplama:

Çalışma körü SOD içermediği için inhibisyona uğramamış reaksiyon olarak kabul edildi ve değeri %100 olarak alındı. Tüm standartlar için % inhibisyon değeri bunlara ait değerlerin çalışma körüyle oranlanarak 100'den çıkarılması sonucu hesaplandı.

$$\Delta A/\text{dak}_{\text{örnek}} = \frac{A_2 - A_1}{3 \text{ dak}}$$

$$\% \text{ inhibisyon}_{\text{örnek}} = 100 - \frac{\Delta A/\text{dak}_{\text{örnek}} \times 100}{\Delta A/\text{dak}_{\text{çalışma körü}}}$$

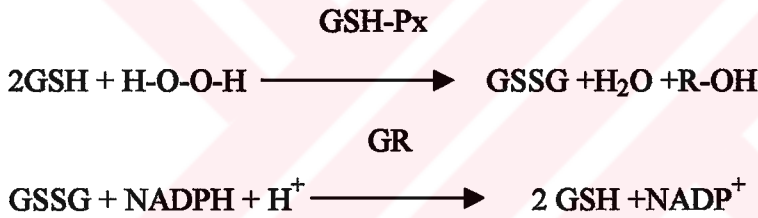
Örneğe ait hesaplanan yüzde inhibisyon değerine karşılık gelen SOD değeri standart eğri kullanılarak bulundu. Seyreltme faktörü kullanılarak aktivite bulundu.

Bulunan SOD ünitesi Drabkin yöntemiyle elde edilen Hb değerine bölünerek Ü/gr.Hb cinsinden aktivite bulundu.

$$\text{SOD aktivitesi}(\ddot{U}/\text{gHb}) = \frac{\text{SOD aktivitesi}(\ddot{U}/\text{ml})}{\text{Hemolizat Hb (g/ml)}}$$

IV.B.3.Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivitesi

Prensip: GSH-Px, hidrojen peroksit (H-O-O-H) valığında redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyonu (GSSG) yükseltgenmesini kataliz eder. Hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutatyon redüktaz (GR) ve NADPH yardımıyla GSH'ye indirgenir. GSH-Px aktivitesi,NADPH'ın NADP⁺ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans farkının 340 nm'de okunmasıyla ölçülür (104).



Hemolizat hazırlanması:

EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri 3 defa soğuk %0.9 NaCl ile yıkandı. Oluşan hücre süspansiyonundan 0.1 ml alınıp 0.4 ml soğuk distile su eklenmesiyle lizat elde edildi ve 10 dk. dondurucuda eritrositlerin tamamen parçalanması için bekletildi. Bu lizat eşit miktarda çift güçlü drabkin solusyonu ile karıştırıldı. Bu karışımın 0.1 ml'sine içerisinde 0.005 M EDTA bulunan pH:7'de 0.05 M fosfat tamponundan 2.58 ml eklendi ve böylece enzim kaynağı hazırlanmış oldu.

Kullanılan Reaktifler:

1-GSH(150 nM)

2-NaN₃ (1.25 M)

3-NADPH (0.0084 M)

4-GSH redüktaz (katı ise) 3.2 M (NH₄)₂SO₄ de çözülür.

5-GSH redüktaz (sıvı ise) direkt olarak kullanılır.

6-Hidrojen peroksit çözeltisi(0.0022 M)

7-Fosfat tamponu (pH:7.5 ,50 mM)

Deneyin Yapılışı:

Fosfat tamponu	2.650 ml
GSH	0.100ml
NADPH	0.100 ml
GSH Redüktaz	0.010 ml
NaN ₃	0.010 ml
Numune	0.020 ml

Tüpler iyice karıştırılır ve oda ısısında 30 dk inkübe edildi. Sürenin sonunda her tüpe 0.100 ml hidrojen peroksit çözeltisi ilave edilerek reaksiyon başlatıldı.

Dalga boyu 340 nm'e ayarlanmış spektrofotometrede numunelerin absorbansları 5 dk. süreyle takip edildi. İlk absorbans değerinden son absorbans değeri çıkartılarak 5 dk'lık net değişim tespit edildi, daha sonra bulunan değerler 5'e bölünerek dakikadaki absorbans değişimi bulundu.

GSH-Px Aktivitesinin Hesaplanması:

$$\dot{U}/L(\text{mikromol}/\text{min}/L)= \frac{\Delta A/t \times V_t \times 10^6}{E \times V_s \times \ell}$$

E=NADP'nin ekstinksiyon sabiti (6.22 x 10³)

V_t=Total reaksiyon volümü (ml)

V_s=Total volüm içindeki numune volümü (ml)

ℓ = Küvet çapı (1 cm)

Δ A/t =Dakikadaki absorbans değişimi.

10⁶ = Molü mikromole çevirim sabitesi.

$$U/L = \frac{\Delta A/t \times 3 \times 10^6}{6.22 \times 10^3 \times 0.02 \times 1} = \frac{\Delta A/5 \text{ dk} \times 3 \times 10^6}{124.44}$$

Elde edilen Ünite değeri hemoglobine bölünerek spesifik aktivitesi elde edildi.

$$U/gr.Hb = \frac{U/L}{Hb(gr/dl)}$$

IV.B.4.Redükte Glutasyon (GSH) Tayini

Prensip: Eritrositlerin bütün nonprotein sülfidril grupları, GSH şeklinde bulunur. 5,5'-ditiyo-bis[2-nitrobenzoik asit] (DTNB), sülfidril bileşikleri tarafından redükte edilerek bir disülfid bileşiği olan sarı renkli kompleks oluşturur. Bu sarı renkli bileşiğin optik dansitesi 412 nm'de okunarak GSH aktivitesi saptanır (12).

Ayıracılar:

1-Presipitasyon çözeltisi:

Glasiyel metafosforik asit:1.67 gr.

Disodyum EDTA:0.2 gr.

NaCl:30.0 gr.

100 ml. Distile su içerisinde çözülür.

2-0.3 M Na₂HPO₄

3-DTNB çözeltisi

DTNB:20 mg.

100 ml. % 1'lik sodyum sitrat içerisinde hazırlanır.

İşlem:

Hemolizat; iki mililitre distile suya 200 µL tam kan (EDTA'lı) eklenmesiyle elde edilir. Hemolizatın hemoglobin değerleri diğer parametrelerde de olduğu gibi Drabkin yöntemiyle belirlendi.

	Örnek(ml)	Kör(ml)
Hemolizat	2	—
Su	—	2
Çöktürücü	3	3

Örnek 5 dk.bekletildi, karışım filtre kağıdından süzüldü.

Süzüntü (filtrat)	2	2
Na ₂ HPO ₄	8	8

412 nm'de kör'e karşı okundu (OD₁).Her tüpe:

DTNB	1	1
------	---	---

konuldu ve 412 nm'de köre karşı okundu (OD₂).

30 dk'dan daha kısa bir sürede okumalar yapılmalıdır. DTNB ayıracı eklendikten 5 dk. sonra renk solmaya başlar.

Hesaplama:

GSH ile DTNB etkileşimi sırasında oluşan sarı rengin molar ekstinksiyon katsayısı 13600 dür. Ancak, 6 nm'den büyük eni olan bant kullanılırsa ,daha düşük bir ekstinksiyon katsayısı elde edilir. Hem ışık yolu, hem bant genişliği farklarını düzelten bir türev ekstinksiyon katsayısı kullanılır ve E₁ olarak ifade edilir.

$$E_1 = \frac{D_1}{D_2}$$

D₁=1 cm'lik küvette, dar bir aralığı olan spektrofotometredeki okuma değeri.

D₂=Aynı örneğin, kalibrasyonu önceden yapılmış bir sistemdeki okuma değeri.

Glutatyon derişimi ise µmol/gHb biriminden şu şekilde hesaplanır:

$$\frac{C}{1000} = \frac{(OD_2 - OD_1)}{13600} \times E_1 \times \frac{11}{2} \times \frac{5}{2} \times \frac{100}{Hb(g/dl)}$$

11/2= Filtratın sulandırma faktörü.

5/2= Hemolizatın sulandırma faktörü.

$$C(\mu\text{mol/gHb}) = \frac{(OD_2 - OD_1) \times E_1 \times 101}{Hb(g/dl)}$$

IV.B.5.Hemoglobin Tayini

Hemoglobin miktarı Drabkin yöntemiyle ölçüldü. Bu yöntemde ferrisiyanür, hemoglobindeki demiri oksitleyerek iki değerlikli demiri üç değerlikli demire çevirerek methemoglobine dönüşmesini sağlar. Bunu takiben potasyum siyanid ile kararlı bir pigment olan siyanmethemoglobin meydana gelir. Siyanmethemoglobinin absorbansı spektrofotometrik olarak 546 nm'de okunur (39).

Ayırıcılar:

1-Drabkin çözeltisi: 50 mg KCN

200 mg $K_3Fe(CN)_6$ 1 g $NaHCO_3$

distile su ile 1 litreye tamamlanan çözelti renkli şişede ve oda ısısında 1 yıl süreyle saklanabilir.

2-Hemoglobin standartı: 18 gr/dl

İşlem:

	KÖR	STANDART	ÖRNEK
Drabkin çözeltisi(ml)	5.0	5.0	5.0
Hemoglobin standartı(ml)	-----	0.02	-----
Hemolizat (ml)	-----	-----	0.02
Distile su (ml)	0.02	-----	-----

Tüpler iyice karıştırıldı ve oda ısısında 20 dk bekletildikten sonra 546 nm'de köre karşı absorbanları okundu.

Hesaplama:

$$\text{Hemoglobin(g/dl)}: \frac{\text{Örnek absorbanı}}{\text{Standart absorbanı}} \times \text{Standart konsantrasyonu}$$

IV.B.6.Biyolojik Sıvılarda Protein Tayini

Homojenatlardaki protein miktarı Lowry (78) yöntemine göre ölçüldü. Bu yöntemin ilkesi; proteinlerin alkali ortamda Folin-Fenol ayırıcı ile mavi bir renk oluşturmasıdır.

Ayırıcılar:

1-Alkali Bakır Ayırıcı: 10 g Na_2CO_3 , 0.1 g Potasyum tartarat ve 0.05 g Bakır sülfat 0.5 N NaOH içinde çözüldü ve 100 ml'ye tamamlandı. Bu çözelti oda ısısında 30 gün dayanıklıdır.

2-Fenol Ayırıcı: 3.75 ml 2.0 N Folin-Ciocaltue-Fenol ayırıcı 63.75 ml distile suya ilave edilir.

3-Protein Standartı: 150µg/ml

4-Okuma sınırlarına getirilmiş (sulandırılmış) örnek

İşlem:

	KÖR	STANDART	ÖRNEK
Alkali bakır ayırıcı(ml)	1.0	1.0	1.0
Günlük standart(ml)	-----	1.0	-----
Örnek(ml)	-----	-----	1.0
Deiyonize su(ml)	1.0	-----	-----

Tüpler iyice karıştırılır ve 10 dk. hiç oynatmadan oda ısısında bekletilir.

Fenol ayırıcı(ml)	4.0	4.0	4.0
-------------------	-----	-----	-----

Tüpler iyice karıştırılıp 55⁰C de 5 dk. bekletildi. İnkübasyon sonucu hemen soğutuldu. Daha sonra standart ve örnek tüplerin absorbansı 650 nm'de köre karşı okundu.

Hesaplama:

$$\mu\text{gr protein/ml: } \frac{\text{Örnek absorbansı}}{\text{Standart absorbansı}} \times \text{Standart konsantrasyonu}$$

IV.B.7. Na⁺-K⁺ ATPaz Aktivitesinin Ölçümü

Prensip: Na⁺-K⁺ ATP'az aktivitesi inkübasyon sırasında ortama ilave edilen 3 mM disodyum adenozin trifosfattan açığa çıkan inorganik fosfatın ölçülmesi prensibine dayanır (112).

İşlem:

İçerisinde 1 mM magnezyum bulunan 0.3 M sükröz ile % 10'luk doku homojenatı cam-cam homojenizatör kullanılarak hazırlandı. Hazırlanan homojenatlar 3000 rpm.de 5 dk. santrifüj edilerek süpernatantı ayrıldı. ATPaz aktivite tayini için kullanılacak süpernatanttan önce protein tayini yapıldı. İnkübasyon ortamını oluşturan 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 30 mM Tris HCl 5 dakika 37⁰C su banyosunda inkübe edilir.

	Na ⁺	K ⁺	Mg ⁺²	EDTA	Tris HCl (30 mM)	Tris HCl (33mM)	ATP	Örnek
Na ⁺ -K ⁺ ATPaz	0.5	0.5	0.5	0.1	0.6	----	0.1	0.2
Örnek Körü	0.5	0.5	0.5	0.1	----	0.7	----	0.2
ATP Körü	0.5	0.5	0.5	0.1	0.6	----	0.1	0.2*

* Örnek önce ısı ile denatüre edilerek üstte kalan berrak kısım kullanıldı.

Na-K ATPaz enzim tayini için kullanılan inkübasyon ortamı ve iyonların miktarı yukarıdaki tablo da gösterildiği şekildedir. Örnek ve örnek körü tüplerine ATP eklenerek 37⁰C de 30 dakika inkübe edildi. Inkübasyonun hemen sonunda tüpler buz banyosuna alınarak reaksiyon durduruldu. Daha sonra Olympus AU-560 otoanalizörüne inorganik fosfat ölçümü için yüklendi. Örnek körü ve ATP körü için ölçülen absorbans değerlerinin toplamı örnek için ölçülen absorbans değerinden çıkarılarak bu absorbans değerine karşılık gelen inorganik fosfat değeri kullanıldı. Enzimin spesifik aktivitesi nmol Pi/mg Prot/saat olarak verildi.

IV. B. 8. Doku MDA Düzeyleri

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malonildialdehid (MDA) tayini Ohkawa (95) tarafından belirlenen yöntemle spektrofotometrik olarak yapıldı.

Prensip:Doku MDA tayini; aerobik şartlar altında ve pH:3.5'te, doku homojenatının kaynar su banyosunda 1 saat inkübasyonu sonucu, lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA'nın TBA ile oluşturduğu pembe renkli kompleksin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü prensibine dayanır.

Homojenat hazırlanması: Kobaydan alınan karaciğer örneği soğuk %0.9'luk NaCl ile yıkandıktan sonra hemen ölçümü yapılmayacak ise -20 ⁰C'de derin dondurucuda saklanabilir. Serum fizyolojikle yıkama işleminden sonra ıslaklığı iyice alınan dokunun tartımı yapıldı. Her gram başına 9 ml %1.15'lik KCl olacak şekilde cam-cam homojenizatörde homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi.

Ayıracılar:

1-%8.1'lik Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)

2-%20'lik Asetik Asit

3-%0.8 Tiyobarbitürik asit (TBA)

4-n-Bütanol/ Piridin (15:1,v/v)

5-Stok standart (1,1,3,3 tetra metoksiopropan)

(Stok standarttan günlük standart dilüe edilerek hazırlanabildiği gibi,değişik derişimlerde hazırlanan standart çalışması yapılarak eğri çizilir ve sonuçlar eğriden hasaplanır.)

Yöntem:

	Kör (ml)	Std (ml)	Örnek (ml)
Standart(Kons:4.4 nmol/ml)	----	0.2	----
Homojenat	----	----	0.2
SDS	0.2	0.2	0.2
Asetik asit	1.5	1.5	1.5
TBA	1.5	1.5	1.5
Saf su	0.8	0.6	0.6

95⁰C de 1 saat inkübe edildikten sonra soğuk su altında soğutuldu. Tüplere;

Saf su	1.0	1.0	1.0
n-bütanol/piridin	5.0	5.0	5.0

eklenerek iyice karıştırıldı. Daha sonra 4000 rpm de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki organik faz alınarak 532 nm'de köre karşı standart ve örnek absorbansları ölçüldü.

Hesaplama

$$\text{MDA}(\text{nmol/gr.yaş doku}) = \frac{\text{Örnek O.D.}}{\text{Std. O.D.}} \times \text{Std. Konsantrasyonu}$$

IV.B.9.Diğer Biyokimyasal Analizler

Serum Cu ve Zn düzeylerinin ölçümünde ise Shimadzu UV-6701 marka atomik absorpsiyon spektrofotometresi kullanıldı. Bütün örnekler dilüe gliserol [Çinko için; 1/5, bakır için 1/10) ile 1:5 oranında seyreltilerek çalışıldı.

IV.B.10.Histopatolojik İnceleme

Tüm gruplardan alınan karaciğer dokuları %10'luk formol içinde tespit edilerek rutin takip işlemlerinden geçirildi. Parafin bloklara gömülen dokulardan 4µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler deparafinize edilerek Hematoksilen-Eozin (H-E) ile boyanarak ışık mikroskobunda değerlendirildi ve fotoğraflandı.

Işık mikroskop altında patoloğ tarafından hepatositlerdeki nekroz, konjesyon, vakuolizasyon ve dejenerasyon açısından (Resimler 1-4) histolojik grade skalasına (131) göre değerlendirildi (Tablo 4). Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi.

Tablo 4. Karaciğer biyopsi örneklerinin histopatolojik değerlendirilmesi

Grade	Histopatoloji
0	Hepatosit hasarı yok
1	Minimal selüler değişiklikler
2	Sadece hafif sentrolobüler hasar
3	Sadece ciddi sentrolobüler hasar
4	Hafif sentrolobüler ve midzonal hasar
5	Ciddi sentrolobüler ve midzonal hasar
6	Hepatositlerin total destrüksiyonu

IV.B.11. İstatistik Analizler

Deneysel çalışmalar sonucunda bulunan veriler ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi. Ortalamaların karşılaştırılmasında Student's t, Mann-Whitney U testi ve One Way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) testi yapıldı. $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

V.BULGULAR

V. A. Plazma MDA Düzeyleri

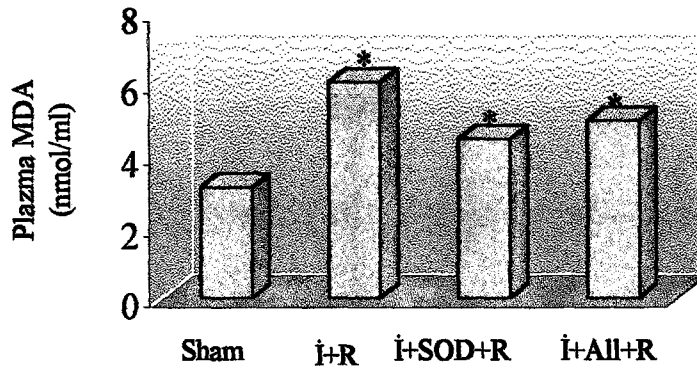
Tablo 5’de hiçbir ekstra işlem uygulanmayan **grup 1** (sham grubu), 60 dk. iskemi ve 30 dk. reperfüzyon yapılan **grup 2** (İ+R) ve yine iskemi yapılan fakat reperfüzyondan 5 dk. önce i.v. olarak SOD verilen **grup 3** (İ+SOD+R) ayrıca iskemiye müteakip 10. dk.’da intraperitoneal olarak allopurinol verilen **grup 4** (İ+AlI+R)’ün plazma MDA düzeyleri görülmektedir.

Tablo 5. Bütün Gruplardaki Plazma MDA Düzeyleri:

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Plazma MDA düzeyi (nmol/ml)	3.08 ± 0.65 (n:8)	6.05 ± 1.2* (n:8)	4.45 ± 0.76* (n:8)	4.97 ± 0.62* (n:7)

*p<0.05

Tablo 5 ve Şekil 13’te görüldüğü gibi sham grubuyla diğer gruplar karşılaştırıldığında, bütün gruplarda belirgin olarak artış vardır. Özellikle sadece iskemi ve reperfüzyon yapılan grup 2’de sham grubunun 2 katı kadar bir artış görülmesi istatistiksel olarak çok anlamlı bulundu (p<0.05). Farklı iki antioksidanı denediğimiz grup3 ve 4’de sham grubuna göre artışın devam ettiği fakat iskemi ve reperfüzyon yapılan gruba göre ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görüldü (p<0.05).



Şekil 13.Sham, İskemi ve reperfüzyon yapılan (İ+R), İskemi yapılan ve reperfüzyon öncesi antioksidan olarak SOD verilen grup (İ+SOD+R) ile iskemiden

sonra antioksidan olarak allopurinol verilip reperfüzyon yapılan gruplardaki plazma MDA düzeyleri. (Sham grubuyla diğer gruplar ile karşılaştırıldığında: * $p<0.05$, iskemi ve reperfüzyon yapılan grupla diğer gruplar karşılaştırıldığında: * $p<0.05$)

V. B. Doku MDA Düzeyleri

Tablo 6'de sham grubu (Grup 1) ile İ+R (Grup 2), İ+SOD+R (Grup 3) ve İ+All+R (Grup 4) gruplarına ait karaciğer doku MDA düzeyleri görülmektedir.

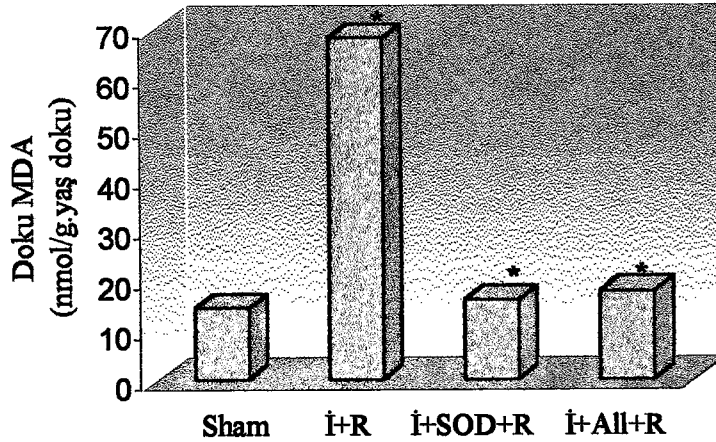
Tablo 6. Bütün Gruplardaki Ortalama Doku MDA Düzeyleri:

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Doku MDA	14.19± 1.65	67.92± 14.9*	15.82± 1.8*	17.56± 2.95*
(nmol/g.yaş doku)	(n:8)	(n:8)	(n:8)	(n:7)

* $p<0.05$

Tablo 6 ve Şekil 14 incelendiğinde görülmektedir ki; Grup 1 ile diğer gruplar tek tek karşılaştırıldığında grup 2'de yaklaşık olarak 5 katı kadar bir artış, grup 3 ve 4 de ise grup 1'e göre hafif bir artışın varlığı ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu ($p<0.05$) görülmektedir.

Grup 2 ile Grup 3 ve 4 karşılaştırıldığında anlamlı derecede bir azalmanın olduğu ve bunun da istatistiksel olarak oldukça anlamlı olduğu görülmektedir ($p<0.05$).



Şekil 14. Sham, İskemi ve reperfüzyon yapılan (İ+R), İskemi yapılan ve reperfüzyon öncesi antioksidan olarak SOD verilen grup (İ+SOD+R) ile iskemiden

sonra antioksidan olarak allopurinol verilip reperfüzyon yapılan gruplardaki plazma MDA düzeyleri. (Sham grubuyla karşılaştırılma: *p<0.05, İskemi ve reperfüzyon yapılan grupla diğer grupların karşılaştırılması: *p<0.05)

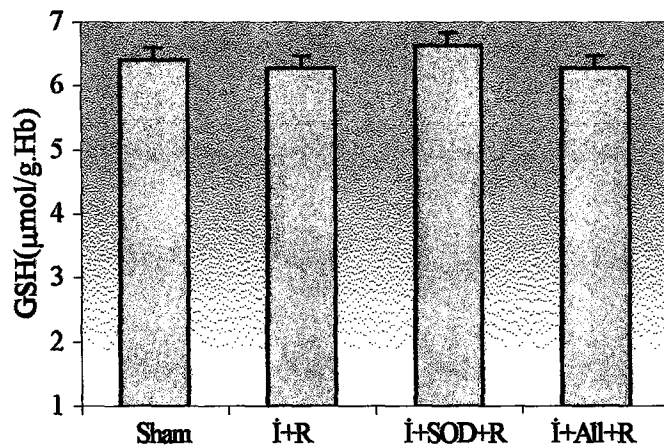
V.C. Redükte Glutasyon Düzeyleri

Tablo 7’de sham grubu (Grup 1) ile İ+R (Grup 2), İ+SOD+R (Grup 3) ve İ+All+R (Grup 4) gruplarına ait GSH düzeyleri verilmektedir.

Tablo 7. Bütün Gruplardaki Tam Kan GSH Düzeyleri:

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
GSH($\mu\text{mol/g.Hb}$)	6.41 \pm 0.45	6.27 \pm 0.28	6.63 \pm 1.29	6.28 \pm 1.29
	(n:8)	(n:8)	(n:8)	(n:7)

Hem Tablo 7 ve hem de Şekil 15’te görüldüğü gibi; sham grubuyla iskemi ve reperfüzyon yapılan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında matematiksel olarak bir azalma tespit edildi, fakat bu değer istatistiksel yönden bir anlam ifade etmemektedir. Yine sham grubuyla antioksidan verilen gruplar karşılaştırıldığında özellikle SOD verilen grup 3’de daha hafif bir artış bulunmakta ama bu artış anlamlı olmamaktadır. Antioksidan verilen gruplar, iskemi-reperfüzyon yapılan grup ile karşılaştırıldığında sayısal olarak hafif bir yükselme olmasına rağmen bu yükselmenin istatistiksel olarak bir anlam ifade etmediği görülmektedir.



Şekil 15. Sham, İskemi ve reperfüzyon yapılan (İ+R), İskemi ve reperfüzyon öncesi antioksidan olarak SOD verilen grup (İ+SOD+R) ile iskemiden

sonra antioksidan olarak allopurinol verilip reperfüzyon yapılan gruplardaki tam kan GSH düzeyleri.

V.D. Eritrosit SOD Değişimleri

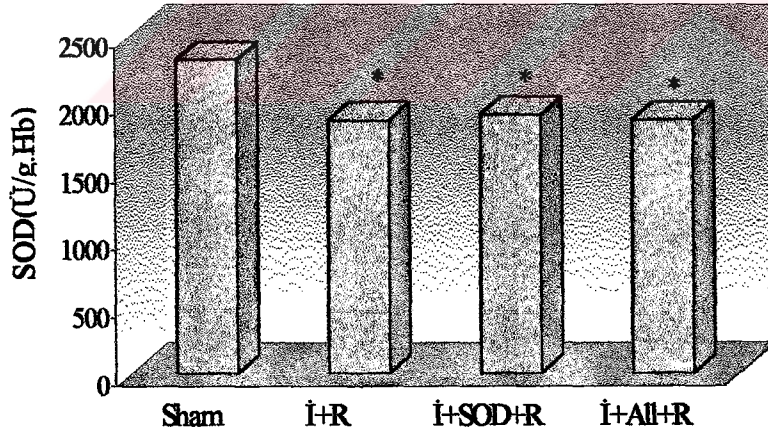
Tablo 8’de eritrosit SOD değerlerinin bütün gruplardaki değişimleri gösterildi.

Tablo 8. Bütün Gruplardaki Eritrosit SOD Düzeyleri:

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
SOD	2318.26±372.29	1866.35±453.05*	1912.09± 404.49*	1870.34± 320.99*
(U/g.Hb)	(n:8)	(n:8)	(n:8)	(n:7)

*p<0.05

Tablo 8 ve Şekil 16 incelendiğinde sham grubuna oranla, iskemi ve reperfüzyon grubunda istatistiksel olarak anlamlı miktarda azalma olduğu görüldü (p<0.05). Yine sham grubuyla antioksidan verilen gruplar karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşmenin devam ettiği görüldü (p<0.05). İskemi-reperfüzyon grubu, antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında matematiksel bir artış varlığının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir.



Şekil 16. Sham, İskemi ve reperfüzyon yapılan (İ+R), İskemi yapılan ve reperfüzyon öncesi antioksidan olarak SOD verilen grup (İ+SOD+R) ile iskemiden sonra antioksidan olarak allopurinol verilip reperfüzyon yapılan gruplardaki eritrosit SOD düzeyleri. (Sham grubuyla karşılaştırılma: p<0.05).

V.E. Eritrosit GSH-Px Düzeyleri

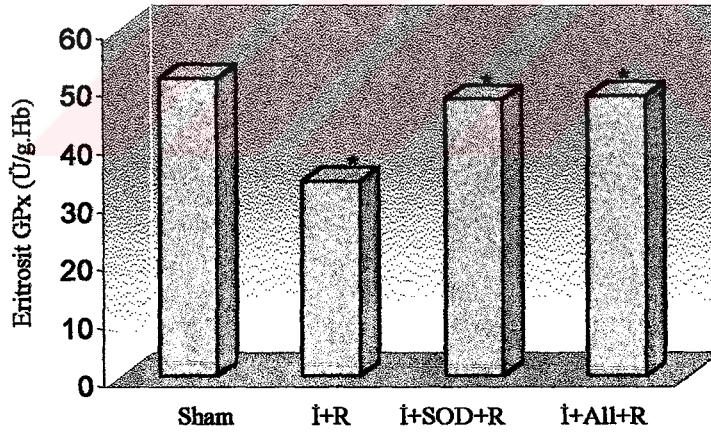
Bütün gruplara ait eritrosit GSH-Px değerleri Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. Bütün Gruplardaki Ortalama Eritrosit GSH-Px Düzeyleri:

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
GSH-Px	51.38± 5.12	33.55±8.34*	47.81± 10.84*	48.36± 11.64*
(U / g.Hb)	(n:8)	(n:8)	(n:8)	(n:7)

*p<0.05

Sham grubu ile iskemi-reperfüzyon yapılan grup karşılaştırıldığında; Grup 2'deki belirgin orandaki azalma istatistiksel olarak çok anlamlı bulundu (*p<0.05). Grup 3 ve Grup 4 olarak adlandırdığımız antioksidan içeren gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değildir. Fakat Grup 2 ile Grup 3 ve Grup 4 arasında ki karşıştırmalarda Grup 3 ve Grup 4'deki belirgin artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (*p<0.05). Elde ettiğimiz bulgular Tablo 9 ve Şekil 17 de özetlenmiştir.



Şekil 17. Sham, İskemi ve reperfüzyon yapılan (I+R), İskemi ve reperfüzyon öncesi antioksidan olarak SOD verilen grup (I+SOD+R) ile iskemiden sonra antioksidan olarak allopurinol verilip reperfüzyon yapılan gruplardaki eritrosit GSH-Px düzeyleri. (Sham grubuyla karşılaştırılma:*p<0.05, İskemi ve reperfüzyon yapılan grup ile antioksidan uygulanan gruplar karşılaştırıldığında:*p<0.05).

V.F.Doku Na⁺-K⁺ ATPaz Aktiviteleri

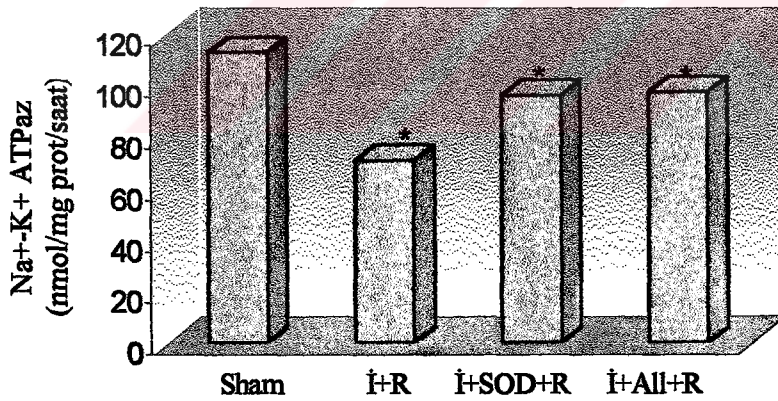
Sham grubu, iskemi-reperfüzyon grubu, antioksidan olarak SOD verilen grup ve antioksidan olarak allopurinol verilen grupların doku Na⁺-K⁺ ATPaz düzeyleri tablo 10 da verilmiştir.

Tablo 10. Bütün Gruplardaki Doku Na⁺-K⁺ ATPaz Düzeyleri:

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Doku Na⁺-K⁺ ATPaz (nmol/mg.prot/saat)	112.56±19.5 (n:8)	70.45±9.47*	96.09±20.2*	97.28±14.17*

*p<0.05

Tablo 10 ve Şekil 18 de görüldüğü gibi; Grup 1 ile Grup 2 karşılaştırıldığında Grup2'deki belirgin olan düşme istatistiksel olarak anlamlı bulundu (*p<0.05). Fakat matematiksel olarak azalmanın görüldüğü Grup 3 ve Grup 4 de ise çok anlamlı bulunamadı. Yine Grup 2 ile diğer gruplar karşılaştırıldığında belirgin bir derecedeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (*p<0.05).



Şekil 18. Sham, İskemi ve reperfüzyon yapılan (I+R), İskemi yapılan ve reperfüzyon öncesi antioksidan olarak SOD verilen grup (I+SOD+R) ile iskemiden sonra antioksidan olarak allopurinol verilip reperfüzyon yapılan gruplardaki eritrosit Na⁺-K⁺ ATPaz düzeyleri. (Sham grubuyla karşılaştırılma:*p<0.05, İskemi ve reperfüzyon yapılan grup ile diğer grupların karşılaştırılması : *p<0.05).

V.G. Serum Cu ve Zn Düzeyleri

Sham grubu ,iskemi-reperfüzyon grubu , antioksidan olarak SOD verilen grup ve antioksidan olarak allopurinol verilen grupların serum bakır (Cu) ve çinko (Zn) düzeyleri tablo 11 de verilmiştir.

Tablo 11. Bütün Grupların Bakır (Cu) ve Çinko (Zn) Düzeyleri.

	Grup 1	Grup2	Grup3	Grup4
Cu(µg/dl)	97.96±14.78	82.39±8.6*	111.26±19.7*	96.13±22.4
Zn(µg/dl)	125.09±11.38	113.36±14.44	124.04±36.24	89.83±19.64*

*p<0.05

Serum bakır düzeyleri Grup 1 ile karşılaştırıldığında Grup 2’de anlamlı bir azalma varken (*p<0.05), Grup 3 ve Grup 4 de ki değerler istatistiksel anlam taşımamaktadır. Grup 2 ile karşılaştırıldığında antioksidan olarak SOD verilen Grup 3 deki artış anlamlıdır (p<0.05). Serum çinko düzeylerinde ise sadece antioksidan olarak allopurinolun verildiği Grup 4 deki azalma diğer gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlam ifade etmektedir (*p<0.05).

V.H. Histopatolojik Değişiklikler

Tüm gruplardan hazırlanmış olan histolojik kesitlerde, gruplara göre ortalama histolojik grade değerleri ve standart sapmaları Tablo 12’de görülmektedir.

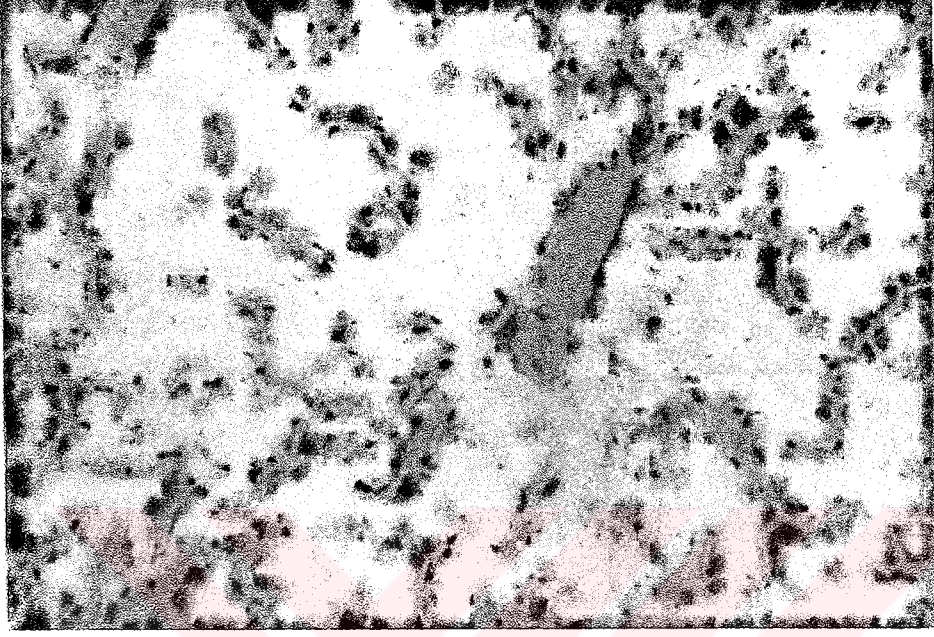
Tablo 12. Grade skalasına göre grupların histopatolojik değerlendirilmesi

Gruplar	Ort. Histolojik grade değeri
Grup 1	0.142± 0.37
Grup 2	4.625 ± 1.30*
Grup 3	2.25 ± 1.26*
Grup 4	0.333± 0.51

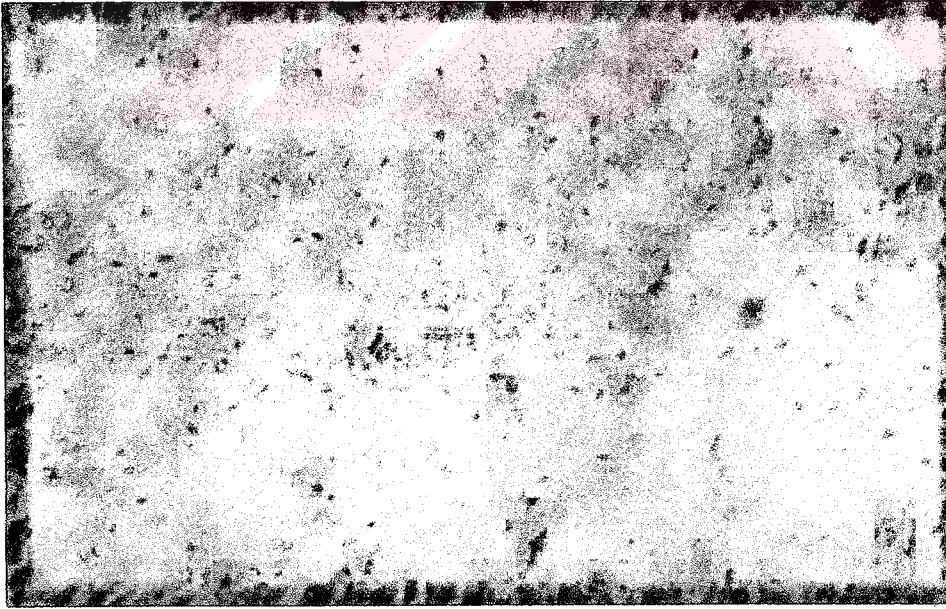
*p<0.05

Resim.1 ve Resim.2 de görüldüğü gibi sham grubu ile karşılaştırıldığında iskemik grupta vena sentraliste konjesyon ve dilatasyon, ciddi sentrilobüler ve

midzonal hasar, yaygın hidropik dejenerasyon ve çoğu doku örneklerinde hepatositlerin total destrüksiyonuna varan harabiyet saptandı. Bu karşılaştırma istatistiksel olarak da oldukça anlamlı idi (* $p < 0.05$).

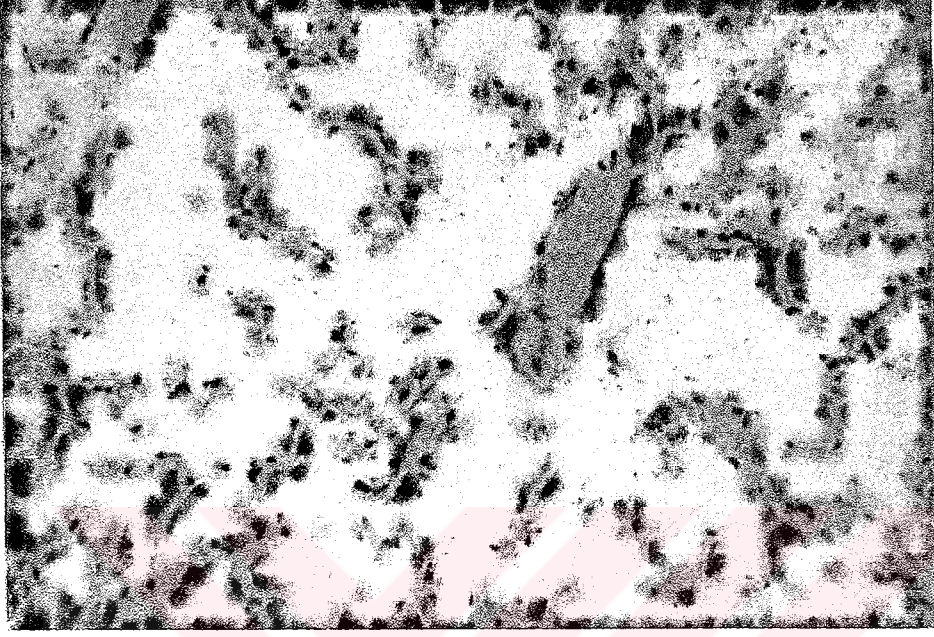


Resim.1. Normal karaciğer hücre görünümü. H-E.x 200

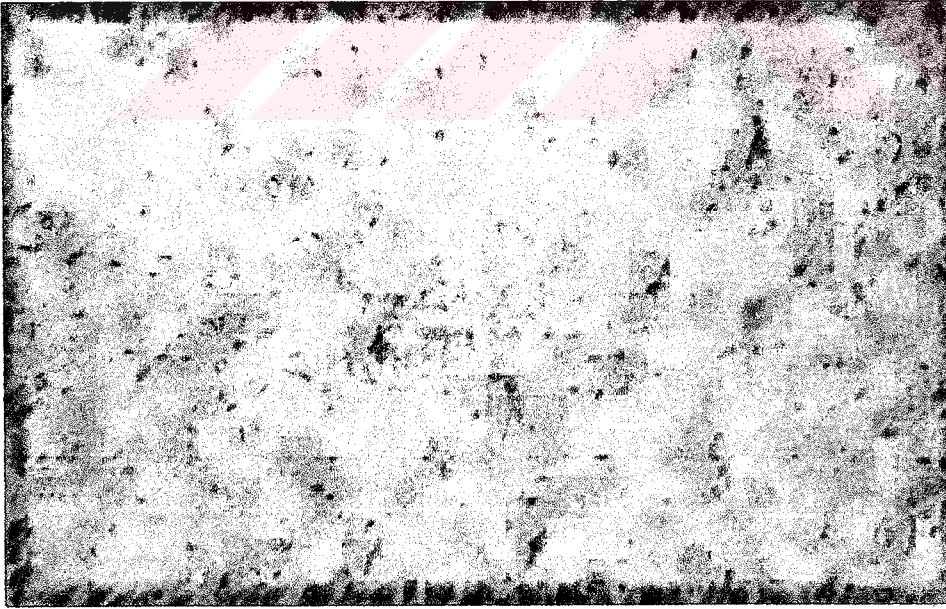


Resim.2. Karaciğere ait hücrelerde belirgin dejenerasyon. H-E.x200

midzonal hasar, yaygın hidropik dejenerasyon ve çoğu doku örneklerinde hepatositlerin total destrüksiyonuna varan harabiyet saptandı. Bu karşılaştırma istatistiksel olarak da oldukça anlamlı idi (* $p < 0.05$).

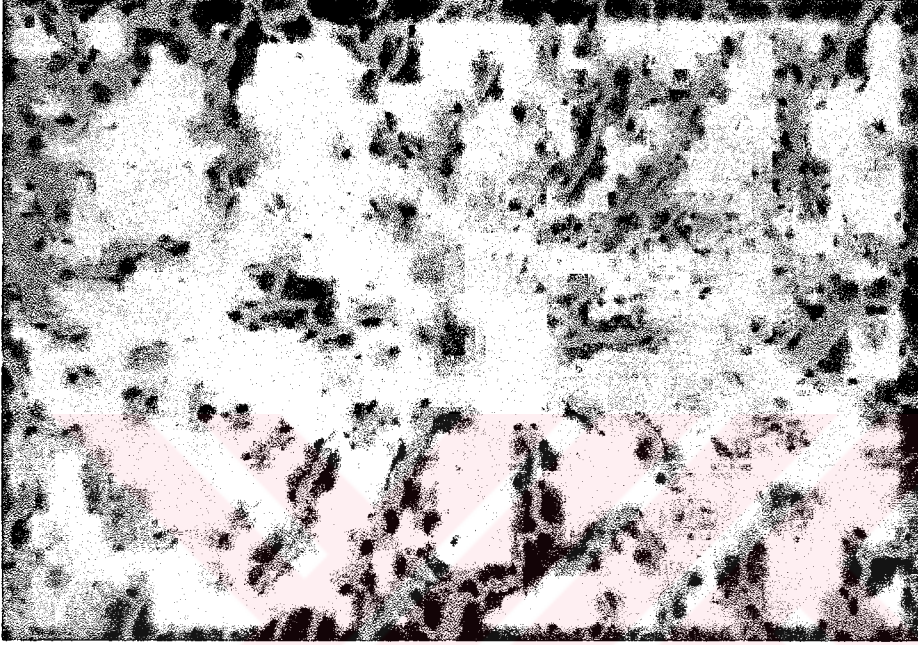


Resim.1. Normal karaciğer hücre görünümü. H-E.x 200



Resim.2. Karaciğere ait hücrelerde belirgin dejenerasyon. H-E.x200

İskemiden 5 dakika önce tedavi amacıyla i.v olarak SOD verilen grupta hidropik dejenerasyonun , iskemi-reperfüzyon grubuna göre çok daha azalmış olduğu ve çok hafif sentrilobüler hasar dışında hafif vene sentralis konjesyonu ve dilatasyonunun var olduğu görüldü. Bu durum Grup 2'e göre anlamlı bir iyileşmenin ifadesi (*p<0.05) iken Grup 1'e göre hala anlamlı olarak (*p<0.05) hasarın varlığını gösteren değişiklikler mevcuttu (Resim.3).



Resim.3. Bazı karaciğer hücrelerinde dejenerasyon. H-E.x200



Resim. 4. Normal kordonsal dizilim gösteren karaciğer hücreleri. H-E.x200.

İskemiden kısa bir süre sonra intraperitoneal olarak allopurinol verdiğimiz grupta iskemi -reperfüzyon grubuna göre minimal selüler değişiklik (birkaç örnekte) dışında tamamen sham grubuna yakın derecede düzelme gözlendi. Burada görülen değişiklikler Grup 3'e göre oldukça anlamlı bir azalma ($*p<0.05$) gösterirken, Grup 1'e göre ise belirgin bir değişiklik göstermediği saptandı. (Resim.4)



VI. TARTIŞMA VE SONUÇ

Serbest radikallerin iskemi-reperfüzyon sırasında mikrosirkulatuvar ve parankimal hücrelerde morfolojik ve fonksiyonel değişikliklere neden olduğunun belirlenmesi çalışmaların bu konuda yoğunlaşmasına neden olmuştur. Serbest radikallerin hücrel kaynakları, rol oynadıkları reaksiyonlar ve bu radikallere karşı geliştirilen defans sistemlerinin (gerek endojen gerekse eksojen) açıklığa kavuşturulması bir çok hastalığın patogenezini aydınlığa kavuşturacaktır (87).

Karaciğerin iskemiye karşı hassasiyeti transplantasyon ve kanlanmanın geçici olarak durdurulmasının gerektiği cerrahi girişimler açısından önemli bir nonimmünolojik problemdir ve iskemiye olan toleransı uzatabilmek, postiskemik karaciğer fonksiyonunu ve yaşam süresini iyileştirebilmek için birçok farmakolojik ajan denenmektedir (36,100,103,131).

Günümüzde organ transplantasyonlarında karşılaşılan sorunların en önemlisi, organların bir süre iskemide kalması ve reperfüzyonu sağlandığında ise dokularda oluşan metabolik değişikliklerdir. İskemi ile birlikte hücrelerdeki ATP sentezinin azalmakta, olduğu reoksijenasyon ile ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüştüğü ve bu enzimin oksijen varlığında hipoksantini ksantine dönüştürürken süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerini ortaya çıkardığı bilinmektedir (36,41).

Dokuların iskemi ve reperfüzyon hasarında reperfüzyona bağlı serbest oksijen radikallerinin, araşidonik asit metabolitlerinin ve nötrofil infiltrasyonunun da içinde bulunduğu değişik mekanizmalar sorumlu tutulmaktadır (89,92,137). Mitokondrial disfonksiyon ve intrasellüler kalsiyum seviyesinin artmasının da iskemi reperfüzyon hasarında etkili olduğu öne sürülmektedir (41,44,103). Çok sayıdaki oksidazlar özel koşullarda kademeli olarak ölçülü ve dengeli bir şekilde toksik oksijen metabolitleri üretirler. İskemik bölgede sempatik sinir son uçlarından salınan norepinefrin, mono amino oksidaz enzimi tarafından yıkılırken elektron akseptörü olarak oksijeni kullandığından hidrojen peroksit veya hidroksil radikali gibi toksik metabolitler yan ürün olarak oluşmaktadır. İskemi-reperfüzyon sırasında salınan ve okside olan katekolaminler SOR (çoğunlukla süperoksit radikali) üretiminde minimal bir role sahiptirler. Hücrel oksidasyon reaksiyonlarının gerçekleştiği mitokondride

moleküler oksijenin suya redüksiyonu sırasında serbest oksijen radikali oluşmaktadır. Ancak bu durum iskemi sırasında bozulan mitokondrial enzim fonksiyonları nedeni ile çok miktarda radikal oluşumuna neden olmaktadır. Yine iskemi sırasında bozulan adenosin trifosfat (ATP) bağımlı iyon pompaları nedeni ile hücre içine kalsiyum, sodyum ve klor iyonlarının girişi artarken potasyum iyonu miktarında azalma meydana gelir. Özellikle iskemi esnasında artan kalsiyum iyonu girişi fosfolipaz C aktivasyonu ile zardaki serbest yağ asitlerinin yıkılmasına neden olur. Bu yıkım sonucu artan araşidonik asit reperfüzyon sırasında lipooksijenaz ve siklooksijenaz enzimleri ile prostaglandin ve tromboksanlar oluşturularak süperoksit üretimine neden olur. Ayrıca araşidonik asit ürünleri üzerinden nötrofiller aktive edilerek oksijen radikallerini ve proteolitik enzimlerini oluşturur (41,44,143). Günümüzde yapılan bütün doku çalışmalarında karaciğerin en zengin ksantin oksidaz kaynağı olduğu belirtilmiştir. Ksantin oksidaz gerçekte invivo sistemlerde dehidrogenaz formunda bulunur. Bu formda enzim elektron akseptörü olarak NAD^{+} 'i kullanarak hipoksantin ksantine ve ksantin de ürata oksidasyonunu sağlar. Bununda ötesinde proteolizis ve anaerobiosis olaylarında (iskemi gibi) adenin nükleotid havuzları parçalanarak AMP, hipoksantine ve o da ksantine dönüşürken, süperoksit üreten ksantin oksidaz ksantin dehidrogenaza dönüşmektedir. Böylece iskemiye müteakip gelişen reperfüzyon ile moleküler oksijen, ksantin oksidaz ve hipoksantin reaksiyonları tarafından barsak, karaciğer gibi dokularda serbest oksijen radikallerine dönüşür (44,105).

Membranların iyi fonksiyon görmesi, hücresel bütünlüğün sürdürülmesinde kritik öneme sahiptir. Genel olarak iskemik atak esnasında sitoplazmik proteinlerin dışarı salınımı, hücre membranlarının tam bozunum öncesi zayıfladığını gösterir. Destabilize olan membranlar, kan akımının yeniden sağlanması ile daha da kötüleşebilir. Reperfüzyonun akut fazında meydana gelen olaylar, dramatik olarak bu bozunum sürecini hızlandırabilir. İskemik dokunun reperfüzyonu ile birlikte hiperosmotik hücrelerin suyla yıkanması, hücre içi Ca^{+2} seviyelerinin artışı, serbest oksijen radikallerinin oluşumu, kontraktil aktivitenin anormal olarak yeniden başlaması gibi hücre içi ve hücre dışı karakteristik olaylar membran hasarlarının esas sebepleridir (41,143).

Karaciğerde de iskemi-reperfüzyon sonrasında; hepatoselüler enzimlerde artma, kan akımında azalma ve nötrofil infiltrasyonu ile karakterize birçok olay meydana gelir (46,102).

İskemi reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik birçok endojen mekanizma ve koruyucu etkisi kanıtlanmış birçok ilaç bulunmaktadır. Serbest radikal temizleyiciler, reaktif oksijen parçaları ile reaksiyona girerek bunları zararsız maddeler haline dönüştüren ajanlardır. Süperoksit dismutaz, invivo olarak dokuları serbest radikallere, özellikle süperoksit karşı koruyan endojen bir enzimdir. Dimetilthioüre, dimetil sülfoksit ve merkaptopropiyonil glisin, hidroksil radikalinin tahmin edilen temizleyicileridir. Mannitol klinik olarak uzun yıllardan beri hidroksil radikal temizleyici etkisi nedeniyle kullanılmaktadır. Ayrıca N-asetil sistein ve kaptopril gibi tiol içeren bileşiklerin oksijen serbest radikalleriyle reaksiyona girdikleri ve nitrik oksit oluşumuna yol açtıkları ileri sürülmektedir (73).

Karaciğeri iskemi-reperfüzyon hasarına karşı korumak amacıyla, ksantin oksidaz inhibitörü allopurinol (70), süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz (7,52) ve glutatyon (2,125,52) gibi serbest oksijen radikali temizleyiciler, prostasiklin analogu ilioprost ve tromboksan inhibitörleri (35,103), E vitamini ve askorbik asit gibi vitaminler (105), kalsiyum kanal blokerleri (57), trimetazidin (131) gibi antianjinal ilaçlar, pentoksifilin (127), klorpromazin (41), opiat antagonistleri gibi ve daha birçok farmakolojik ajanın (43,69) kullanıldığı bilinmektedir.

Serbest oksijen radikallerinin iskemi sonrası reperfüzyonda yoğun bir şekilde üretildiklerini belirtmiştik. Serbest radikaller yüksek reaktivitelerinden dolayı membran poliansatüre yağ asitlerine saldırarak peroksidasyonu başlatmaktadır. Bu şekilde oluşan lipid peroksitleri kolaylıkla yıkılarak MDA da içinde olmak üzere farklı sekonder ürünleri meydana getirmektedir. İşte bu ürünlerin çok çabuk bir şekilde ortamda farklı ürünlere dönüşmesi ve bu nedenle saptamanın zorluğu nedeniyle, lipid peroksidasyonunun indeksi olarak TBA reaksiyonu ile MDA düzeyleri ölçülmektedir. MDA ölçümü bazı hastalıkların tanı ve takibinde kullanılabilecek basit ve güvenilir bir metod olarak önerilmektedir. TBA reaksiyonu aslında sadece MDA'ya özgü değildir. Yöntem esnasında peroksitlerden ve doymamış yağ asitlerinden oluşan aldehytlerin çoğu TBA ile reaksiyona girer ve

yöntemin spesifitesini düşürür. Fakat yöntem ucuz ve basit olduğundan tercih edilir (4,33,54,66,102,107).

Çalışmalar MDA'nın fizyolojik bir metabolit olmadığını göstermiştir. İskemi esnasında az miktarda üretilir fakat yine de ölçüm düzeylerinde değildir. Belirgin derecede MDA üretimi, ancak reperfüzyon sonrası olmaktadır. Bu yüzden uygun şekilde ölçüm yapılırsa reperfüze dokulardaki peroksidatif hasar hakkında bilgi verir (29,44).

Birçok çalışmada; gerek deneysel olarak iskemi-reperfüzyon oluşturulması sonucu, gerekse iskemik kalp hastalığı, serebral iskemi, preoperatif ve post operatif doku iskemileri, organ transplantasyonları, şok vb. gibi durumlarda plazma ve doku lipid peroksidasyon ürünleri karşılaştırılmıştır. TBA metodu kullanılarak yapılan ölçümlerde bu durumlara maruz kalanların plazmalarında, doku örneklerinde, sağlıklı bireylere ve kontrol grubuna göre MDA düzeyleri belirgin derecede yüksek bulunmuştur. MDA seviyelerinin artışı; peroksidasyona uğrayan membranların çökluğunu veya hasara uğrayan hücrelerin yaygınlığını gösterir (19,23,77,93).

Hasara bağlı olarak plazma ve doku lipid peroksit düzeylerinin artışı aynı zamanda doku ve organlar üzerine bozucu etki yaparak yeni hasarlara da yol açmakta, bir kısır döngü oluşturmaktadır. Lipid peroksitler organ veya dokularda belli bir düzeye ulaşınca kan dolaşımına geçer ve serum veya plazma lipid peroksit düzeyleri yükselir. Kan lipid peroksit düzeylerdeki yükseklik hastalığın ciddiyetini gösterir. Kanda artan bu toksik metabolitler idrarla atılmadığından antioksidan defans sistemi devreye girer. Peroksitler hücrel antioksidan defans sisteminin üzerine çıktığında veya dışarıdan temizleyici bir ajan verilmediğinde zarar iki katına çıkmaktadır. Belirli bir dokuda iskemi-reperfüzyon sonrası oluşan hasarın diğer dokulardaki yansımaları bu durumu doğrulamaktadır. Schmeling ve arkadaşları (116), Turnage ve arkadaşları'nın (132) ratlarda yaptıkları barsak iskemi-reperfüzyonu sonrası akciğer, karaciğer, böbrek'te de hasarın oluştuğunu göstermeleri, Horton ve arkadaşları'nın (67) intestinal iskemi-reperfüzyon sonrası miyokard'da fonksiyon bozukluğu olduğunu bildirmeleri bu olayı daha iyi açıklamaktadır. En azından şu söylenebilir ki; plazma ve doku lipid peroksit düzeyleri iskemi-reperfüzyon hasarının derecesini saptamada ve prognozunu değerlendirmede faydalı olabilmektedir.

Plazma MDA sonuçlarımız; sham grubunda, 3.08 ± 0.65 nmol/ml iken iskemi ve reperfüzyon yapılan grupta, 6.05 ± 1.16 nmol/ml'ye yükselmiş, antioksidan olarak SOD verilen grupta, 4.45 ± 0.76 nmol/ml, antioksidan olarak allopurinol verilen grupta, 4.97 ± 0.62 nmol/ml değerleri elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre; öncelikle MDA düzeyleri iskemi ve reperfüzyon yapılan grupta sham grubuna göre anlamlı bir şekilde yükselmiştir. Bu bulgu istatistiksel olarak çok anlamlı ($p < 0.05$) bulunmuştur. İskemi grubu ile antioksidan verilen gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında antioksidan verilen gruplarda anlamlı bir düşme ($p < 0.05$) saptandı. Bu bulgulardan da anlaşıldığı gibi sham grubuna göre anlamlı olarak yüksek ($p < 0.05$) olan antioksidan gruplarında antioksidanların iskemi-reperfüzyon hasarını düzelttikleri, fakat tamamen eski haline getiremediklerini görülmektedir. Bu ise iskemi-reperfüzyon hasarının komplike bir takım olaylara neden olduğunu ve tamamen temizlenmesi için belki daha uzun süre gerektirdiğini göstermektedir. Yine doku MDA düzeylerini tespit ettiğimizde; sham grubunda 14.19 ± 1.66 nmol/g.yaş doku, iskemi grubunda 67.92 ± 14.90 nmol/g.yaş doku, antioksidan olarak SOD verdiğimiz grupta 15.82 ± 1.80 nmol/g.yaş doku ve antioksidan olarak allopurinol verdiğimiz grupta 17.56 ± 2.96 nmol/g.yaş doku değerlerini bulduk. Burada da sham grubuyla iskemi grubu karşılaştırıldığında yaklaşık 5 katı kadar bir yükselmenin olduğu görüldü, bu da istatistiksel olarak çok anlamlı ($p < 0.05$) bulundu. Hasar alanının tedavisi amacıyla verdiğimiz her iki antioksidan grubunda antioksidanların hasarı çok anlamlı bir şekilde azalttığı bulunmuştur ($p < 0.05$). Antioksidanların bu etkilerini sham grubuyla karşılaştırdığımızda yüksek olduklarını, bunun da istatistiksel anlam ifade ettiğini ($p < 0.05$) gördük. Foschi ve arkadaşları (45), iskemi ve reperfüzyonu müteakip hepatektomi yaptıkları ratlarda antioksidan ajan olarak kullandıkları verapamil, allopurinol ve SOD'un etkinliğini araştırmışlar ve SOD ile allopurinolün etkili bir şekilde lipid peroksidasyonunu azalttıklarını görmüşlerdir. Minor ve arkadaşları (89,90), ilk çalışmalarında karaciğerde postiskemik artmış olan MDA düzeylerini, tedavi amacıyla kullandıkları SOD ve allopurinolün düşürdüğünü göstermiş ve hatta allopurinolün ATP düzeylerini iyi koruduğunu bulmuşlardır. İkinci çalışmalarında da iskemi öncesi tedavi amaçlı verdikleri SOD ve papaverinin reperfüzyon sonrası artmış MDA düzeylerini düşürdükleri ve azalmış olan ATP ve adenin nükleotid düzeylerini artırdıklarını bulmuşlardır. Stein ve arkadaşları (125)

karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturdukları ratlarda hasara bağlı MDA düzeylerinin arttığını ve dimetil sülfoksit tedavisi uyguladıkları ratlarda MDA seviyelerinin düştüğünü tesbit etmişlerdir. Bizim bulgularımız ile bu araştırmacıların yaptıkları çalışmalar birbirlerini tamamiyle desteklemektedir.

Younes ve ark. (144) barsak iskemi ve reperfüzyonunu müteakiben lipid peroksidasyonunu önlemek amacıyla kedilere uyguladıkları SOD'un lipid peroksidasyonunun sekonder ürünlerinden olan konjuge dien miktarını reperfüzyondan hemen sonra başlayıp 10. dk. da pik yapacak şekilde belirgin olarak azalttığını bulmuşlardır. Yine Otamari (97) nin yaptığı benzer bir çalışmada barsağa iskemi öncesi uygulanan SOD ve allopurinolün yalnız iskemi yapılan gruba göre MDA düzeylerini anlamlı olarak azalttığı ama kontrol grubuna göre yüksek olduğunu göstermeleri de bizim bulgularımızı destekler mahiyettedir. Sato ve ark. (114) CCl₄ ile ratlarda oluşturdukları karaciğer harabiyetini tedavi amacıyla kullandıkları bir çok ajanın birbirine üstünlüklerini görmek için yaptıkları çalışmada, CCl₄ ün arttırmış olduğu MDA va plazma AST düzeylerini tümör nekroz faktör (TNF) ve interlökin-6 (IL-6)'nın belirgin olarak azalttığını bulmuşlardır. Atramanalp ve ark. (8) domuzlarda yaptıkları gastrik iskemi-reperfüzyon modelinde antioksidan olarak verdikleri SOD ve deferoksaminin iskemi sonrası artmış olan MDA düzeylerini düşürdüklerini bulmuşlardır. Birçok organ iskemi-reperfüzyon modelinde antioksidan olarak denenen SOD ve allopurinolün tek başlarına, birlikte veya diğer ajanlarla beraber kullanılmaları MDA düzeylerine olan etkileri göz önüne alındığında hasarı önlediği yada azalttığı yönünde destekleyici bulgular elde edilmiştir.

SOD'un veya allopurinolün tek başına veya diğer bazı ajanlarla birlikte reperfüzyon öncesi verilmesi sonucu, iskemi-reperfüzyon hasarını azalttığı veya önlediğini gösteren çalışmalar olduğu gibi bunun tam aksini iddia eden çalışmalar da vardır. Cho (22) ve arkadaşları bazı antioksidanların etkinliğini araştırmak amacıyla karaciğer üzerine yaptıkları bir çalışmada iskemi öncesi, reperfüzyon öncesi, iskemi-reperfüzyon öncesi SOD, allopurinol, koenzim Q ve glutatyonun belirli dozlarını denemiş ve SGOT ve nekrotik alan taraması yaptıklarında 20 mg/kg kullandıkları SOD'un ve 100mg/kg kullandıkları allopurinolün etkili bir şekilde nekrotik alanı azalttıkları ve SGOT değerlerini düzelttiklerini görmüşlerdir (SOD'un daha başarılı

olduğunu bildirmişlerdir). Yine Ertaş ve arkadaşlarının (38) yaptıkları benzer bir çalışmada antioksidan olarak SOD verdikleri grupta doku MDA değerlerinin iskemi-reperfüzyon yapılan gruba göre belirgin bir şekilde düştüğünü göstermişlerdir. Aynı çalışmada bahsedildiği gibi Nakae ve ark. ratlarda asetaminofen ile karaciğer toksisitesi oluşturmuşlar ve serbest olarak verdikleri SOD'un MDA değerlerine olumlu hiçbir etkisi olmadığını, buna karşılık lisosome-encapsuled SOD (LSOD) verdikleri zaman etkili olduğunu göstermişlerdir. Lambotte ve ark. (76) köpek karaciğerinde yaptıkları bir çalışmada, izole köpek karaciğerinde SOD verilmesi ile membran potansiyeli, adenin nükleotidaz ve iyon konsantrasyonu gibi değerlerde hiçbir değişiklik görmezlerken, parsiyel hepatektomi yapılan ve bromobenzen ile karaciğer toksisitesi oluşturulan köpeklere SOD verilmesi ile doku MDA düzeylerinde belirgin azalma gösterebilmişlerdir.

Çalışmamızda MDA değerlerinin yüksek bulunmasının anlamı; iskemi-reperfüzyon sonrası yoğun bir şekilde üretilen serbest oksijen radikalleri ve bu radikallerin yüksek reaktiviteleri nedeniyle membran lipidlerine saldırarak lipid peroksidasyonunu başlatmalarıdır.

Lipid peroksit türevi MDA'nın deneysel olarak gerçekleştirilen karaciğer iskemi-reperfüzyon sonrası bu derece artışının kaynağı hakkında çeşitli görüşler vardır. İskemi esnasında meydana gelen hücresel hasardan kaynaklandığını savunanların olduğu gibi asıl hasarın reperfüzyon esnasında oluşumu artan serbest radikallerden kaynaklandığını savunanlarda bulunmaktadır. Ancak ikinci görüşü savunanlar daha çoğunluktadır. Bu görüşün savunuculuğunu da John Gutteridge ve Barry Halliwell yapmıştır (62,143).

MDA seviyelerinin artışı, peroksidasyona uğrayan membranların çokluğunu ve hasara uğrayan hücrelerin yaygınlığını gösterir. Yani MDA düzeyleri iskemi alanının genişliği hakkında bilgi verir. Bizim tedavi amacıyla kullandığımız iki farklı antioksidan kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunsa bile, iskemi grubuyla karşılaştırıldığında belirgin bir derece de düşmüş olması istatistiksel olarak anlam ifade etmektedir. Yani iskemi sonrası kullandığımız her iki antioksidan ajan, gerek iskemiden dolayı kaynaklanan hücresel hasarı, gerekse reperfüzyon sonrası oluşabilecek asıl hasarı önlemişlerdir.

Antioksidan defans sistemi, normal metabolizmanın işleyişi esnasında koruyucu rolünü gerçekleştirir. Bununla beraber asıl etkisini hastalık veya organizmada herhangi bir sebeple oluşan serbest radikal oluşumu durumunda artırmakta ve bu durumu etkisizleştirmeye çalışmaktadır. İşte vücutta serbest radikallerin oluşumu ve uzaklaştırılması arasındaki denge bu antioksidan defans sistemi ile sürdürülmektedir. Eğer durum radikal oluşumu tarafına bozulursa vücut birçok hastalıkla karşı karşıya kalmaktadır (143).

Etkinliğinin araştırılması ve kıyaslama yapılması bakımından bir çok çalışmaya konu olan intraselüler enzim SOD'u ve ksantin oksidaz inhibitörü allopurinolü biz bu çalışmamızda deneysel olarak oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarını düzeltmesi açısından kullandık. Reperfüzyon öncesi uygulanan SOD ve allopurinolün, karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarını önlemede diğer organlardakinin aksine farklılık teşkil ettiğini gördük. Sonuçlardaki farklılıklar karaciğer gibi metabolizmayı elinde tutan ve birçok döngüye ev sahipliği eden bir organda SOR'dan başka faktörlerinde hasarda rol aldığı veya antioksidan defans sisteminin yahut miktarının değişiklik gösterdiği düşünülmektedir.

$\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz enzimi membran bağımlı bir enzim olup membran boyunca sodyum ve potasyum iyonlarının membran gradientine karşı hareketini ATP'yi hidroliz ederek sağladığı uzun yıllardır bilinmektedir. ATP hidrolizi esnasında enzim aktivitesi için sodyum ve potasyumun yanısıra magnezyuma da gereksinme duymaktadır. Yine zara bağımlı birçok enzim gibi taşıma işleminden sorumlu bu enzimde aktivite için fosfolipitlere ihtiyaç duymaktadır (130). Fosfolipit bağımlı aynı zamanda zara bağlı olan $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{Mg}^{+2}$ ATPaz serbest radikal reaksiyonlarına ve lipid peroksidasyonuna çok hassas olup artmış olan membran potansiyelinden zarı koruma görevi üstlenmiştir (68). Özellikle iskemi ve reperfüzyon hasarı sonucu çok miktarda oluşan SOR, membranlarda lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını tetikleyerek daha fazla miktarda radikal oluşumuna neden olurken, iskemiye maruz kalan karaciğer hücrelerinde anaerobik metabolizma işlemeye başlayacaktır. ATP, ADP, GTP vb. gibi yüksek enerjili fosfatlar kısa süre içerisinde yıkılmakta ve ortamda protonlar ve inorganik fosfatlar birikmektedir. Bu durum ise $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{Mg}^{+2}$ ATPaz gibi hücre içi iyon dengesini sağlayan pompaların bozulmasına neden olmaktadır.

Karaciğer yüksek metabolik durumu nedeniyle iskemiden en fazla zarar gören bir organdır. Karaciğere yapılan cerrahi girişimler, karaciğer sirozu, karaciğer transplantasyonu gibi olaylar esnasında gelişen iskemik hasardan kendini korumaya çaba gösterir (135)

Karaciğerde oluşan iskemi ve hatta bu iskemi süresi uzatıldığında bunu müteakip reoksijenasyon sırasında bu organda metabolik yük artmakta ve karaciğer hücrelerinde fonksiyonel ve yapısal koruma amacıyla ATP artışı gelişmektedir. Bu nedenle hepatik hücrelerin yaşayabilmesi için artırılan ATP düzeyi tamamen hepatik hücrelerce restore edilmektedir. (75) Marubayashi ve ark. raporlarında ATP düzeylerinin düzeltilmesi ile iskemik süreç arasındaki ilişki gösterilmiştir (81).

Doku ATPaz sonuçlarımız; sham grubunda, 112.56 ± 19.25 nmol Pi/mg.prot/saat iken iskemi ve reperfüzyon yapılan grupta, 70.45 ± 9.47 nmol Pi/mg.prot/saat'e düşmüş, antioksidan olarak SOD verilen grupta, 96.09 ± 20.20 nmol Pi/mg.prot/saat, antioksidan olarak allopurinol verilen grupta, 97.28 ± 14.17 nmol Pi/mg.Prot/saat değerleri elde edilmiştir. Bu sonuçlar bize, öncelikle $Na^+ -K^+$ ATPaz aktivitesinin iskemi ve reperfüzyon yapılan grupta sham grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük olduğunu göstermektedir. Bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bulundu. İskemi grubu ile antioksidan verilen gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında antioksidan içeren gruplarda anlamlı bir yükselme ($p<0.05$) saptandı. Sham grubuna göre halâ sayısal olarak düşük olmalarına rağmen sham grubu ile antioksidan grupları arasında istatistiksel olarak bir farklılığın görülmemesi, antioksidanların iskemi-reperfüzyon hasarını düzelttikleri, fakat eski haline getiremediklerini açıklamaktadır.

Minor ve ark. (90) bizim deneysel modele benzer bir şekilde yapmış oldukları çalışmada 60 dk. iskemiye müteakip tedavi edilmemiş reperfüzyon grubunda ATP ve bazı adenin nükleotid (SAN) düzeylerinin sham grubuna oranla belirgin oranda azaldığını ve tedavi amaçlı olarak SOD ve papaverin verdikleri grupların yine sham grubuna göre düşük fakat yalnız iskemi-reperfüzyon grubuna göre anlamlı olarak arttığını tespit etmişlerdir. Daha sonra yine bu araştırmacı ve ark. (89) benzer bir çalışmada tedavi amacıyla SOD ve allopurinol'ü denediklerinde her iki grup ajanında iskemi-reperfüzyon hasarını düzeltici yönde ATP ve SAN

düzeylerinde yükselme gösterdiklerini fakat sham grubuna oranla hala değerlerinin düşük olduğunu görmüşlerdir. Wang ve ark (135) nın karaciğer iskemi reperfüzyon hasarından korumak amacıyla trombosit aktive edici faktör (PAF) antagonisti bir ajanın etkisini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada 60 dk. iskemiden sonra ATP düzeylerinin çok minimum seviyelere düştüğünü ve antioksidan olarak kullanılan ajanın tedaviye yakın cevaplar verdiğini ve ATP seviyelerinin bu grupta yükseldiğini görmüşlerdir. Ontell ve ark. (96) nın benzer bir deneysel modelde iskemik hasarı önlemek amacıyla PAF antagonisti ve SOD'u kullandıkları çalışmada kontrol grubuna göre iskemik grupta ATP düzeylerini belirgin olarak azalmış olduğunu, 90 dk. iskemiden sonra hem PAF antagonisti ve hem de buna ilaveten SOD verilen gruplarda ATP düzeylerinin belirgin olarak arttığını saptamışlardır. İldan ve ark. (68) nın deneysel olarak spinal kord hasarı oluşturdukları ratlarda lipid peroksidasyonu ve ATPaz aktivitesi üzerine naloksanın etkisini araştırmak için yaptıkları çalışmada, hasar oluşturulan dokunun ATPaz aktivitesinin kontrol ve sham grubuna göre belirgin olarak düştüğünü ve tedavi için naloksanın verildiği grupta ise hasar yapılan gruba göre anlamlı olarak bir yükselme kaydetmişlerdir. Bu araştırmacıların bulguları bizim bulgularımızı desteklemektedir. Lambotte ve ark. (76), SOD ve katalazın karaciğer yaşam testlerine [membran potansiyeli, ATP, total adenin nükleotid (TAN) düzeyleri] olan etkisini araştırdıkları çalışmada iskemi öncesi, sonrası, 60 dk. ve 120 dk. reperfüzyon yapılan gruplar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında bütün bu çalışılan değerlerde bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu da karaciğer iskemi reperfüzyon hasarında farklı mekanizmaların rol oynadığını, karaciğerin diğer organlardan farklı oranlarda SOD, glutatyon ve diğer temizleyiciler içerdiğini açıklamaktadır (76).

İskemi sonucu dokuda ATP'nin yıkılmasıyla başlayan mekanizma sonucunda ortamda artan pürin metabolitleri ksantin oksidaz sistemi üzerinden SOR üretimine yol açmaktadır. Böylece lipid peroksidasyonunun ortamdaki değerleri yüksek iken ATP yıkıma uğradığından MDA'nın yüksek olduğu durumlarda genellikle ATP düzeyi düşüktür (68).

İskemi reperfüzyona karşı koruma sağlayan pek çok ajanın etkisi, bunların mikrovasküler endotelyuma nötrofil yapışmasını önleyebilme yetenekleri ile ilişkilidir. Pürin metabolizmasının bir ürünü olan adenozin'in stimule olmuş insan

nötrofillerini %60 oranında inhibe edebildiği gösterilmiştir (73). Adenozin'in nötrofiller üzerindeki etkisi bileşiğin fizyolojik düzeylerde fagositik hücre fonksiyonlarını modifiye edebilmesidir. İskemi sırasında yaşayabilen hücrelerden adenozin salınımı nötrofil saldırısını önleyebilir. Bu savaşım esnasında yani iskemide ve bunu takip eden reperfüzyon sonrasında belirgin olarak ATP seviyeleri düşmektedir. Anaerobik glikolizisin küçük katkısı bir yana, mitokondride ATP çoğunlukla ve genellikle aerobik olarak üretilmektedir. İskemi ve doku ATP düzeyinin direkt olarak indirgenmesine yol açan mevcut oksijen kaçağı bütün dokuların yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü için oldukça tehlikeli durumlardır (75).

Oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde bulunan süperoksit dismutaz (SOD), ve Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleri serbest oksijen radikal toksisitesine karşı önemli defans mekanizmalarını oluştururlar . Reperfüzyon esnasında oluşumu artan serbest radikalleri ortadan kaldırmaya yönelik SOD enzimi, toksik süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır . Plazmada üretilen ve eritrosit hücre membranını geçebilen hidrojen peroksit ve süperoksit iyonları eritrositlerde toplanır. Eritrositlerde hidrojen peroksitin detoksifikasyonunu sağlayan GSH-Px doğal antioksidan savunma sistemi mevcuttur. GSH-Px, hidrojen peroksit ve diğer peroksidlerin yıkımını katalize eden önemli bir antioksidandır. Kanda ve homojenize edilmiş dokularda SOD ve GSH-Px düzeylerine bakılarak kan ve dokuların iskemi-reperfüzyon hasarından ne düzeyde etkilendiği belirlenebilir (73,77).

Plazmada üretilen ve eritrosit hücre membranını geçebilen hidrojen peroksit ve süperoksit iyonları eritrositlerde toplanır. Bu açıdan eritrositler önemli bir radikal havuzu olup, hidrojen peroksidin detoksifikasyonu için GSH-Px ve CAT, süperoksit iyon radikallerinin dismutasyonu için SOD ile vitamin A, C ve E gibi hücre içi antioksidan defans sistemleri devreye girerek daha toksik hidroksil radikallerinin oluşması engellerler (4).

Glutasyon peroksidaz, mitokondri, sitoplazma ve lizozomlarda daha çoğunlukta olmakla beraber asıl katalazın daima bulunduğu memeli peroksidomlarında tesbit edilmiş ve enzim aktivitesi ile ilgili yapılan çalışmalarda hidrojen peroksit yanısıra kümen hidroperoksit, t-bütil hidroperoksit gibi farklı

substratlar kullandığı ortaya konmuştur (118). Bu enzim invitro olarak merkaptosüksinat tarafından inhibe edilen bir matriks enzimidir. Katalazın inaktive olduğu iskemi-reperfüzyon hasarı, endotoksemi, hipolipidemik ilaç kullanımı gibi patolojik durumlarda peroksizomlarda artmış olan organik peroksitler ve hidrojen peroksidin eliminasyonu için kompensatuvar bir mekanizma bulunmaktadır. Peroksizomlarda GSH-Px'in lokalize olması hidrojen peroksit ve diğer peroksitlerin detoksifikasyonu için katalaza alternatif enzim sistemi olarak rol oynama görevi yüklemiştir (4,40,51,118).

Singh ve ark. (118) rat karaciğer peroksizomlarında GSH-Px'i tanımlamış ve karaciğer total oksijen tüketiminin %5-20 kadarının peroksizomlarda olduğu kabul edilmiştir. Bu peroksizomal metabolizma ksantin oksidaz, sitokrom P450, sitokrom P450 redüktaz, sitokrom b5 redüktaz, SOD ve diğer oksidazların enzimatik aktiviteleri sonucunda SOR un aşırı üretimi ile birleşmektedir.

McCay ve ark. (83) GSH-Px'in membranda lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini, poliansature membran lipidlerini serbest radikallerin etkisinden koruma rolü oynadığını, ve fosfolipidlerin oksidatif indirgenmesini önlediğini saptamışlardır.

Biz çalışmamızda sham grubu ,iskemi-reperfüzyon grubu , iskemi ve reperfüzyon öncesi antioksidan olarak SOD verilen grup ile antioksidan olarak allopurinol verilen grupların ortalama eritrosit GSH-Px aktivitelerini sırasıyla 51.39 ± 5.12 U/g.Hb, 33.55 ± 8.35 U/g.Hb, 47.81 ± 10.84 U/g.Hb, 48.36 ± 11.64 U/g.Hb bulduk. Yalnız karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulan Grup 2'de sham grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) bir azalma saptadık. Sham grubu ile antioksidan verilen gruplar karşılaştırıldığında Grup 2'e göre bu gruplarda sayısal bir artış bulunmasına rağmen anlamlı olarak ($p < 0.05$) azalmanın devam ettiğini saptadık. İskemi-reperfüzyon yapılan grup ile antioksidan verilen gruplar karşılaştırıldığında anlamlı ($p < 0.05$) bir artış olduğunu gördük ki, bu da bize dışardan verdiğimiz her iki grup antioksidanın da vücutta antioksidan defans sistemini destekler mahiyette bir özellik göstererek eritrosit GSH-Px aktivitelerini artırdığını göstermektedir.

Sato ve ark. (114) CCl₄ ile karaciğer hasarı oluşturdukları ratlarda TNF ile tedavi edilen grup ile kontrol grubunu karşılaştırdıklarında GSH-Px değerlerinde belirgin bir değişiklik bulmamışlardır.

Karaciğer gibi bir organda oluşan hasarların mekanizması, metabolizmanın çok farklılık göstermesi açısından tam aydınlığa kavuşturulamadığından bulunan değerlerdeki farklılıklar ve farklı sonuçlar değişik şekillerde yorumlanabilmektedir. Fakat bizim bulgularımız yapılan iskemi-reperfüzyon hasarının, intraselüler bir antioksidan olan GSH-Px düzeylerini düşürdüğü ve dışarıdan uygulanan iki farklı antioksidanın da etkili birer ajan olarak GSH-Px düzeylerini normale yaklaştırdığını göstermektedir.

SOD, süperoksit iyonlarının dismutasyonunu sağlayarak potansiyel zararlı etkilere karşı hücre savunma elemanı olarak rol oynar (4,10,86,139).

İskemi-reperfüzyon hasarı başlı başına bir oksidatif stres durumu olup, vücuttaki bütün mekanizmaları etkileyen ve şok, çeşitli klinik girişimler, kardiyak hastalıklardan organ transplantasyonuna kadar olan geniş bir hastalık grubu neticesinde hemen gelişen bir durumdur (92). Bu nedenle antioksidan defans sistemi üzerine yapılan çalışmalar son yıllarda iyice artmış olup, bir antioksidan enzim olan SOD'un aktivite çalışmalarının yanısıra deneysel olarak dışarıdan verilmesi durumunda ne denli etkili olabileceği hususu tartışılmış ve çalışılmıştır(10).

Cho ve ark. (22) SOD, allopurinol, koenzim Q10 ve glutatyonun farklı dozlarının iskemiden belirli süreler sonra intravenöz olarak juguler venden verilmesinin reperfüzyon sonrası karaciğer enzimleri ve nekroz alan üzerine etkisini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada 20 mg/kg SOD değerinin beklenenden daha da etkili bir şekilde SGOT değerlerini ve nekroz alanını düzelttiğini görmüşlerdir.

Parks ve ark. (105) mide-barsak sistemi üzerine antioksidanların etkinliğini görmek amacıyla iskemi oluşturulan ratlara SOD, allopurinol, dimetilsülfoksit (DMSO) ve tripsin inhibitörü uygulamasının iskemi sonrası artmış vasküler permeabiliteyi düzelttiklerini saptamışlardır.

Ertaş ve ark. (38) reperfüzyon öncesi portal ven içine 5000 U/kg hesabıyla uyguladıkları SOD'un etkili bir şekilde karaciğer doku MDA değerlerini düzelttiğini saptamışlardır.

Dashti ve ark. (28) CCl₄ ile oluşturdukları karaciğer sirozunu tedavi amacıyla SOD ve allopurinol verdikleri ratların doku incelemelerinde allopurinolün daha etkili olmak kaydıyla her iki ajanında dejeneratif değişiklikleri bir miktar azalttıklarını saptamışlardır.

Biz çalışmamızda ortalama SOD değerlerini, grup 1 olarak ifade ettiğimiz sham grubunda 2318.26 ± 372.29 U/g.Hb, grup 2 dediğimiz iskemi-reperfüzyon grubunda 1866.35 ± 453.05 U/g.Hb, antioksidan olarak SOD verdiğimiz grup 3 de, 1912.09 ± 404.49 U/g.Hb ve antioksidan olarak allopurinol verdiğimiz grup 4 de 1870.34 ± 320.99 U/g.Hb bulduk. Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında sham grubuna göre Grup 2, Grup 3, ve Grup 4 'de anlamlı ($p < 0.05$) olarak bir azalma tespit ettik. Grup 2'e göre bir karşılaştırma yapıldığında Grup 3 ve Grup 4'te anlamlı bir değişiklik saptamadık. Bu ise bize iskemi-reperfüzyon hasarına maruz kalan kobay eritrositlerinde antioksidan savunma amaçlı intraselüler bir enzim olan SOD'un tüketildiğini ve dışarıdan verilen her iki antioksidanın SOD değerleri üzerine çok fazla etkili olmadığını göstermektedir.

Minor ve ark. (89), Cho ve ark. (22), iskemiden 5 dk. önce verdikleri SOD'un çok etkili olduğunu fakat reperfüzyondan 5 dk. önce verdikleri SOD'un etkisinin olmadığını ancak Ertaş ve ark. (38), reperfüzyondan hemen önce verdikleri SOD'un etkili olduğunu belirtmişlerdir. Bu da gösteriyor ki; olayın içerisinde henüz açıklanamayan farklı mekanizmaların işlediğidir.

İskemik hücrelerin SOD ya da allopurinol ile ön tedavisi aktive nötrofiller tarafından oluşturulan hasarı önemli derecede azaltır. İskemi reperfüzyon protokolüne maruz bırakılan hayvanların antioksidanlarla, katalaz + SOD, DMSO, DMTU yada demir şelatörü desferrioksamin ile ön tedavisi vasküler permeabiliteyi, gastrik mukozal hasarı, iskelet kası ve akciğerde nötrofil sekestrasyonunu önemli derecede azaltır. Serbest radikal hasarını azaltmak için kullanılan diğer bir yaklaşım serbest radikal üretiminde rol oynayan enzimlerin inhibisyonudur. Ksantin oksidaz inhibitörü allopurinol hipoksantin yapısal bir analogudur. Allopurinol ksantin oksidazı kompetitif olarak inhibe ederek süperoksit anyonunun üretimini azaltır (8,73).

Antioksidanlar, peroksidasyonu önleyen ajanlardır. Bu ajanlar, peroksitlerden aşırı serbest radikal oluşumunu ve doku hasarını engellerler. Deneysel olarak değişik sitoprotektif etkileri gösterilmiş birçok antioksidan vardır. Bunlar allopurinol, dimetil sülfoksit, glukokortikoidler, sodyum salisilat, indometazin, A, E ve C vitaminleri, transferrin, seruloplazmin, metaller ve metal bağlayan proteinler, glutatyon, propranolol, kalsiyum kanal blokörleri, lipooksijenaz inhibitörleri,

trimetazidin, merkaptopropionil glisin, α -lipoik asit gösterilebilir. Günümüzde bu ajanlardan hangisinin klinikte daha yararlı olduğuna dair belirli bir bulgu yoktur (7,52,57,73,105,110).

Önemli bir endojen antioksidan olan tripeptid glutatyon (GSH) çoğunlukla karaciğerde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Miyokard, böbrek ve barsak mukozasında iskemi-reperfüzyon sonrası oluşan oksijen radikal hasarından koruyucu olarak kritik öneme sahip olan endojen GSH, redoks döngüsünde glutatyon peroksidaz enzimi tarafından katalize edilerek hidrojen peroksit zincir reaksiyonunu kırarak süperoksit ve oldukça reaktif hidroksil radikallerine dönüşmektedir. Buna ek olarak GSH, süperoksit anyon radikali için doğal temizleyici bir ajan olup, proteinin tiol gruplarını korur ve hücresel bütünlük ve yeniden oksidasyon oluşumu için gereklidir (6,34,124,125).

Stein ve ark. (125) karaciğer iskemi ve reperfüzyonu ile karaciğer hücre hasarında endojen hepatik GSH ve oksidatif hasarın rolünü incelediklerinde, 45 dk.lık karaciğer iskemisini müteakip reperfüzyon yapılan ratların karaciğer enzimlerinden SGPT nin yükseldiğini ve GSH düzeylerinin düştüğünü tesbit etmişlerdir. Sonuçta iskemi-reperfüzyon esnasında endojen antioksidan GSH'ın tüketildiğini ve oksijen radikal oluşumunun gerçekleştiğini göstermişlerdir. İskemi-reperfüzyon esnasındaki GSH'ın düşük düzeyleri böbrek, kalp ve barsak mukozası gibi diğer organlarda da tanımlanmış ve oksijen radikali salınımı nedeniyle anti-oksidatif defans sisteminin tüketildiğine inanılmıştır.

Boudjema ve ark. (16) köpek karaciğerlerinde reperfüzyon hasarından korunmada GSH'ın etkisini göstermek amacıyla yaptıkları çalışmada, GSH'ın diğer organların hücre hasarında olduğu kadar bu sistemde de oksidatif stresi bastırıcı ve önleyici etkisi olduğunu görmüşlerdir. Hızla ve spontan olarak okside hale dönüşen GSH'ın okside glutatyondan (GSSG) daha etkili bir bir antioksidan ajan olduğu da açıklamıştır.

Reperfüzyon esnasında GSSG'e dönüşen GSH iskemik olay neticesinde indirgenerek hücre hasarının intraselüler göstergesi gibi kullanılır ve bu nedenle GSSG'nin intraselüler konsantrasyonu değişmez. GSSG'nin konsantrasyonundaki artış oksidatif stresin ekstraselüler göstergesi olarak kullanılır (70)

Karwinski ve ark. (70) karaciğer iskemi-reperfüzyonu oluşturdukları ratlarda allopurinol ile yaptıkları ön tedavide ksantin oksidaz enzim sisteminin bloke edilmesi ile oksijen serbest radikal üretiminin düştüğünü, iskemik hasar sonrası reperfüzyon esnasında ATP'nin tekrar sentez edilerek arttırıldığını tesbit etmişlerdir. Yapmış oldukları çalışmada reperfüzyon öncesi allopurinol verdikleri grup ile kontrol grubu arasında GSSG değerlerinde değişiklik olmadığı, iskemik periyotta GSH değerlerinin değişmediği fakat 60 dk.lık reperfüzyon sonrasında GSH'ın düştüğünü bulmuşlardır. Allopurinol ile tedavi edilen gruplarda reperfüzyon esnasında total glutasyon düzeylerinde yükselme oluştuğunu, plazma glutasyon değerlerinin karaciğer doku değerlerinden 100 kat daha düşük olduğunu göstermişlerdir. Yine safrada total glutasyon konsantrasyonunun 60 dk'lık reperfüzyondan sonra oldukça düştüğünü fakat bunun istatistiksel anlam ifade etmediğini bulmuşlardır.

GSH karaciğer hücresinde sürekli olarak üretilip dolaşıma salınır ve daha sonra diğer organlara taşınır. İskemik periyot esnasında glutasyonun sentezinin düşmesi reperfüzyon esnasında glutasyonun konsantrasyonunu etkilemektedir. Karwinski ve ark. (70) yapmış oldukları bu çalışmada çok farklı sonuçlarla karşılaşmalarını şu şekilde açıklamaktadırlar: Allopurinol intraselüler glutasyon konsantrasyonuna etkili değildir. Çünkü ksantin oksidaz enzim sistemi sadece oksijen serbest radikalleri üretmez. Mitokondri, peroksizomlar ve endoplazmik retikulum gibi farklı intraselüler sistemler reperfüzyon esnasında daima işlemektedirler. Sonuçta izole hepetositlerde indirgenmiş oksijen salınır ki bu ksantin oksidaz sisteminden değil mitokondrial solunum zincirinden gerçekleşir. Karaciğer hücrelerinde SOD, CAT, NADH ve koenzim Q10 gibi serbest radikalleri inhibe eden farklı antioksidan sistemler bulunur ve GSH bunların yanında çok etkili intraselüler bir antioksidan olmayabilir.

Hepatik GSH ve GSSG nin intraselüler durumu plazma konsantrasyonunu yansıtabilir, çünkü karaciğer GSH ve GSSG'yi yüksek miktarlarda salınımını gerçekleştirir. Adams ve ark. (2) asetaminofen vererek karaciğer hasarı oluşturdukları ratlarda GSH ve GSSG'nin plazma ve karaciğer doku düzeylerini karşılaştırmışlar. GSH'ın hepatic konsantrasyonunun plazmaya yansması hipotezini test ettikleri bu çalışmada doku ve plazma GSH düzeylerinin ilaç verilmesinden

sonraki zaman aralıklarında birbirlerine paralel bir şekilde anlamlı olarak düştüğünü fakat GSSG deki doku-plazma düşüşünün anlam ifade etmediğini görmüşlerdir.

Biz çalışmamızda; GSH değerlerini sham grubunda $6.41 \pm 0.45 \mu\text{mol/gHb}$, iskemi-reperfüzyon yaptığımız Grup 2'de $6.27 \pm 0.28 \mu\text{mol/gHb}$, antioksidan olarak SOD verdiğimiz Grup 3'de $6.63 \pm 1.29 \mu\text{mol/gHb}$ ve antioksidan olarak allopurinol verdiğimiz Grup 4'de ise $6.28 \pm 1.29 \mu\text{mol/gHb}$ olarak bulduk. Grup 2'de sham grubuna göre azalmış olan GSH değerleri oksidatif stresten etkilendiğini göstermekle beraber bu değer istatistiksel anlam ifade etmemektedir. Antioksidan verilen gruplarda da iskemi-reperfüzyon grubuna göre bulunan yüksek değerler hasarı düzeltmek anlamına gelse de bu değerlerde anlamlı değildir.

GSH'nın metabolizmasındaki farklılıklar, hızla ve kendiliğinden oksidasyona uğraması aynı konularda ve aynı şekilde yapılan çalışmalarda bile farklı sonuçlar doğurmaktadır. Burada aynı zamanda şu sorulara yanıt bulmak gerekiyor. Acaba doğru bir şekilde iskemi oluşturulabilirdi mi? GSH karaciğer hasarını düzeltmek için çok önemli bir antioksidan ajan mı? Tek başına GSH ölçümü mü yoksa GSH/GSSG oranı mı bize daha doğru bilgi verir? Uygulanan deneysel model (gerek iskeminin süresi gerekse reperfüzyon süresi ve verilen antioksidan ajanların uygulanma biçimi ve zamanı) yeterli mi? Bu sonuçları bulmamıza neden olabilecek farklı mekanizmalar (deney hayvanındaki başka hastalıklar vb. gibi) var mı? İşte bütün bu faktörler her sonucu etkileyebildiği gibi hızla metabolize olan GSH değerlerinde farklı sonuçlar almamıza da neden olabilir.

Antioksidan metabolizmada rol alan değişik metaloenzimler için esansiyel ko-faktör olarak tanımlanan Bakır (Cu) ve Çinko (Zn)'nin kronik hastalıklarda serum ve doku düzeyleri değişmektedir. Ancak biyomembranların çeşitli etkenlere karşı yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünün korunmasında önemli rolleri olduğu bilinen bu eser elementlerin, iskemi-reperfüzyon gibi akut olaylarda nasıl değiştiği konusundaki bilgiler sınırlıdır (25).

Biz çalışmamızda serum Cu düzeylerini sırasıyla sham grubunda $97.96 \pm 14.78 \mu\text{g/dl}$, İ+R yapılan grup'da $82.39 \pm 8.6 \mu\text{g/dl}$, İ+SOD+R yapılan Grup'da $111.26 \pm 19.7 \mu\text{g/dl}$, İ+all+R yaptığımız Grup'da ise $96.13 \pm 22.4 \mu\text{g/dl}$ değerlerini, Zn düzeylerini sham grubunda $125.09 \pm 11.38 \mu\text{g/dl}$, Grup 2'de 113.36 ± 14.44

$\mu\text{g/dl}$, Grup 3'de $124.04 \pm 36.24 \mu\text{g/dl}$, Grup 4'de ise $89.83 \pm 19.64 \mu\text{g/dl}$ olarak bulduk.

Serum bakır düzeyleri 1. Grup ile karşılaştırıldığında Grup 2'de anlamlı bir azalma gösterirken ($*p<0.05$), 3. ve 4. Gruplarda anlamlı bir değişiklik izlenmedi. Yalnızca antioksidan olarak SOD verdiğimiz Grup 3'deki artmış değerler Grup 2 ile karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik gösterdi ($p<0.05$). Serum çinko düzeylerinde ise sadece antioksidan olarak allopurinolun verildiği Grup 4 deki düşüş diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel bir anlam ifade etmektedir ($*p<0.05$). Grup 1 ile Grup 3 ve Grup 4 karşılaştırıldığında benzer şekilde Grup 2 ve Grup 3 karşılaştırıldığında anlamlı bir değişim görülmektedir. Çekirdekçi ve ark. (25) ratlarda gövde alt yarısında oluşturdukları iskemi-reperfüzyon sonrasında bakır düzeylerinde artış, çinko düzeylerinde ise bir değişiklik gözlememiştir. Bu bulgu bizim çalışmamızla bir paralellik göstermektedir.

Nagasue ve ark. (91) hepatoselüler karsinomlu ve sirotik karaciğerli hastaları kontrol grubu ile karşılaştırmaları sonucunda serum bakır düzeylerinde anlamlı bir artış tesbit ederken, çinko düzeylerinde var olan düşük değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulmamışlardır.

Sullivan ve ark. (125) çeşitli hastalıklarda serum eser element düzeylerini saptamışlar ve karaciğeri direkt (siroz) ve indirekt (alkol, diabet, enfeksiyon, hipertansiyon, kalp hastalıkları, vb.) olarak ilgilendiren bir çok hastalıkta çinko düzeylerinde anlamlı bir azalma bulmuşlardır. Aynı grupta bakır düzeyleri kontrol grubuna göre bütün hastalıklarda yüksek olmasına rağmen siroz gibi karaciğeri direkt olarak ilgilendiren bir hastalık durumunda bu yükselme istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Serum bakır ve çinko düzeylerinde ki değişik değerler muhtemelen farklı modellerde bu elementlerin metabolizmasının değişiklik gösterdiğine işaret etmektedir.

Cu ve Zn içeren metaloenzimler peroksidasyon ile yakından ilişkili olup, karaciğer doku hasarlarının tesbit edilmesinde önemli bir gösterge olarak kabul edilmektedir. Özellikle SOD'un yapısında yer almaları, Haber-weiss ve Fenton reaksiyonlarının kimyasında bulunmaları dolayısıyla antioksidan sistem içerisinde önemli bir yere sahiptirler. İskemi-reperfüzyon ile birlikte hasarı düzeltmek için

atağa geçen bütün intraselüler enzimler ve özellikle SOD aktivitesiyle bakır da tüketilmekte ve bakırın büyük kısmı da membran geçirgenliğinin artması nedeniyle seruma sızmaktadır. Çinko düzeyleri ise doku membran proteinlerinin ve lipoproteinlerin, Zn iyonu ile olan kombinasyonunun iskemi-reperfüzyon sırasında bozulmasına bağlıdır (25).

Tek başına kan veya doku ölçüm değerleri bize patolojinin kaynağı yada oranı hakkında yeterli bilgi vermez. Bu nedenle hasar oluşturulan dokunun histopatolojik incelenmesi bulgularımızı teyit etmemize yardımcı olacaktır.

Dashti ve ark. (28) CCl₄ ile ratlarda oluşturdukları karaciğer sirozunu tedavi amacıyla allopurinol verdiklerinde SOD'a göre oldukça önemli bir şekilde histopatolojik düzelmelerin olduğunu tesbit etmişlerdir. Yine Ontell ve ark. (96) ancak reperfüzyondan uygun süre önce verildiği takdirde SOD'un postiskemik karaciğer fonksiyonlarında etkili olabildiğini bildirmişlerdir. Boros ve ark. (14) köpeklerde barsak iskemisi uygulamasından sonra hem oral hem de intravenöz uyguladıkları allopurinolün barsak mukozasındaki postokluziv hasarı azalttığını bulmuşlardır. Atalla ve ark. (7) köpeklerde yaptıkları karaciğer iskemi çalışmasında klempleme işleminden 5 dk. önce i.v. olarak 5000 U/kg hesabıyla verdikleri SOD'un iskemi-reperfüzyon sonrası karaciğer dokusunda oluşan ödem, nekroz, konjesyon ve dejenerasyonu etkili bir şekilde düzelttiğini ortaya koymuşlardır.

Histopatolojik inceleme sonrası biz gruplarımızda gradeleme sistemine göre şu değerleri bulduk. Grup 1; 0.142 ± 0.37 , Grup 2; 4.625 ± 1.30 , Grup 3; 2.25 ± 1.26 , ve Grup 4'de; 0.333 ± 0.51 .

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında iskemik grubda ve antioksidan olarak SOD verilen grubda belirgin ve istatistiksel olarak da oldukça anlamlı bir artış tesbit edilirken ($p < 0.05$) (Resim.2-3), antioksidan olarak allopurinol verilen Grup 4'de ise çok aşikar bir düşme ve düzelmeye bulunmuştur.

Reperfüzyondan 5 dakika önce tedavi amacıyla i.v olarak SOD verilen grupta hidropik dejenerasyon, iskemi-reperfüzyon grubuna göre daha azalmış ve çok hafif vena sentralis konjesyonu ve dilatasyonunun var olduğu görülmüştür. Bu durum Grup 2'e göre anlamlı bir düzelmelerin ifadesi ($p < 0.05$) iken Grup 1'e göre ise anlamlı olarak ($p < 0.05$) yüksekti. İskemiden kısa bir süre sonra intraperitoneal olarak

allopurinol verdiğimiz grupta iskemi -reperfüzyon grubuna göre minimal selüler değişiklik (bir-iki örnekte) dışında tamamen sham grubuna yakın derecede düzelme gözlemlendi. Bu ise Grup 2 ile mukayese edildiğinde anlamlı olarak hasarın ortadan kaldırıldığını göstermektedir ($p<0.05$).

İskemi-reperfüzyon hasarı ve bu hasarı tedavi amacıyla kullanılan antioksidan ajanların etkinliği hususunda yapılan çalışmaların yanısıra allopurinolün daha da etkin bir şekilde oluşan hasarı düzelttiğini histopatolojik bulgularımız ile teyit ettik.

Vasküler endotelyal kılıf, vasküler düz kas tonusunu modüle eden çeşitli lokal hormonlar veya otokoidler salgılamaktadır. Bunlar prostasiklin (PGI_2), tromboksan A_2 ve LTB_4 gibi araşidonik asit metabolitleri, EDRF (endotelium derieved releasing faktör) ve endotelin'dir. İskemi reperfüzyon injürisinde rol oynayan diğer mediatörler: PAF, kompleman ve sitokinlerdir. Serbest oksijen radikallerinin endotel hücrelerini PAF üretimi yapmak üzere stimule ettiği de gösterilmiştir. PAF potent bir nötrofil agonisti olduğundan iskemi reperfüzyon hasarında PAF nötrofil adezyonunu artırır ve lökositlerin ekstravazasyonuna katkıda bulunur (73,96,101,131).

Normal metabolik işlemler esnasında oluşan reaktif oksijen metabolitlerini detoksifiye edip dokuyu oksidantlara bağlı hasardan koruyan intrasellüler savunma mekanizmaları arasında antioksidan enzimler ve radikal temizleyiciler bulunur. Bununla birlikte eğer serbest oksijen radikallerinin oluşum hızı endojen antioksidan mekanizmaların kapasitesini aşarsa ciddi hücrel hasar meydana gelebilir (73,143).

Buraya kadar yapılan çalışmalarda literatürlerle bizim bulgularımız arasında çoğu değerlerde bir bütünlük olsa da değişik bazı değerlerin bulunması ya farklı ölçüm metodlarının uygulanması ve yahut laboratuvar şartlarındaki farklılıktan kaynaklanabilir görüşüdeyiz.

Yapılan bu çalışmalar sonucunda görülmektedir ki; deneysel olarak kobaylarda oluşturulan karaciğer iskemi-reperfüzyon modeli karaciğer hasarına yol açmakta ve membran lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını başlatarak toksik serbest radikaller oluşturmaktadır. Bu toksik radikallere karşı vücut intrasellüler antioksidan defans mekanizmalarını işletmeye başlar, fakat hasar eğer defans

sisteminin üzerine çıkarsa daha farklı hastalık durumu ve diğer organları da içine alan komplikasyonlara, hastalık durumlarına neden olmaktadır. Dışarıdan verilen antioksidanlar hasarı önlemek ve düzeltmek açısından önemli olsa da uygun ve yeterli oranda antioksidan seçimi şarttır. Karaciğer kan akımının belirli sürelerle de olsa kesilmesi ciddi doku hasarına neden olmakta ve bu hasarın düzeltilmesi açısından dışarıdan uyguladığımız allopurinol ve SOD'un etkili birer antioksidan olarak görev yaptıkları çalışmamızla da bir kez daha kesinlik kazanmıştır.



VII. ÖZET

İskemi-reperfüzyon sonrası meydana gelen doku hasarı ve bunun kan parametrelerine yansması özellikle son yıllarda tıbbın en çok üzerinde durduğu transplantasyon işlemlerinin geleceği açısından çok önemlidir. Hasar sonrası oluşan reaktif oksijen bileşikleri ve bunların atılması arasındaki denge antioksidan defans sistemi tarafından gerçekleştirilir. İskemi-reperfüzyon gibi patolojik koşullarda oluşan reaktif oksijen bileşikleri antioksidan sistem tarafından karşılanamayınca durum oksidatif stresle sonuçlanır.

31 adet dişi kobayda deneysel olarak karaciğere giren ve çıkan tüm damarlar 60 dk. süresince klemplendi ve bunu müteakip 30 dk. boyunca reoksijenasyonu sağlandı. İki ayrı gruba da iskeminin belirli döneminde antioksidan olarak SOD ve allopurinol verildi. Bu işlemler sonucunda eser element düzeyleri, antioksidan sistem ve histopatolojik durum değerlendirilmesi yapılarak oluşan hasarın derecesi ve antioksidan ajanların etkinliği saptandı. Antioksidan sistemin anahtar enzimleri (SOD, GSH-Px), GSH, doku hasarının göstergesi olarak da Na⁺-K⁺ ATPaz enzim sistemi, doku ve plazma MDA düzeyleri, serum Zn ve Cu düzeyleri ölçüldü.

Doku ve plazma MDA düzeyleri iskemi-reperfüzyon yapılan grupta sham grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Aynı zamanda tedavi amacıyla verilen her iki grup antioksidanın (SOD, allopurinol) verildiği gruplarla İskemi-reperfüzyon grubu karşılaştırıldığında SOD ve allopurinol verilen grupta ischemi-reperfüzyon yapılan gruba göre hasarın belirgin olarak düzeldiği görüldü. Buna paralel olarak ATPaz aktiviteleri iskemi-reperfüzyon grubunda sham grubuna oranla anlamlı düşük, diğer iki grupta ise yüksek bulundu. İntraselüler antioksidanlar ise farklı gidişat göstermekle beraber şu sonuçlar elde edildi. GSH-Px aktivitesi; iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulan grupta sham grubuna göre anlamlı (p<0.05) bir düşüş gösterirken, iskemi-reperfüzyon yapılan grup ile antioksidan verilen gruplar karşılaştırıldığında anlamlı (p<0.05) bir artış olduğunu gördük ki, bu da bize dışardan verdiğimiz her iki grup antioksidanında vücutta antioksidan defans sistemini desteklediğini gösterdi. SOD aktivitesi ise; sham grubuna göre diğer üç grupta da anlamlı (p<0.05) olarak bir azalma gösterirken, iskemi-reperfüzyon grubu ile antioksidan verilen her iki grup

karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik saptanamadı. Bu da bize iskemi-reperfüzyon hasarına maruz kalan kobay eritrositlerinde dışarıdan verilen her iki antioksidanın SOD değerleri üzerine fazla etkisi olmadığını gösterdi. GSH değerlerinde sham grubuna göre diğer bütün gruplarda önemli bir değişiklik gözlenemezken, histopatolojik değerlendirmede, iskemi-reperfüzyon grubunda çok belirgin dejenerasyonlar ve hücre ölümüne yaklaşan bir görüntü elde edilirken, özellikle allopurinolun verildiği grupta normale yakın, tamamen düzelmiş hücre görüntüsü saptandı. SOD verilen grupta ise hala çok azda olsa vena sentralisde konjesyon ve dilatasyon vardı. Serum bakır düzeyleri iskemi-reperfüzyon grubunda anlamlı olarak düşük bulunurken ($p<0.05$), diğer gruplarda bir değişiklik izlenmedi. Yalnızca antioksidan olarak SOD verilen grupta artmış değerler iskemi-reperfüzyon grubuna göre anlamlı idi ($p<0.05$). Serum çinko düzeylerinde ise sadece antioksidan olarak allopurinolun verildiği gruptaki düşük değerler sham ve iskemi-reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan bir anlam ifade ediyordu ($p<0.05$). Diğer gruplarda ise anlamlı bir değişme saptanmadı.

Bu sonuçlar bize oksidatif hasarın artması ile antioksidan kapasitenin azaldığını, dışarıdan verilen antioksidanların da etkili olarak tedavi amaçlı kullanılabileceğini göstermiştir. İskemi-reperfüzyon hasarı ile artan oksidatif aktivite bir çok organ ile beraber özellikle metabolizmanın kapısı rolündeki karaciğerde belirgin olarak değişikliklerin görülmesine neden olurken, çeşitli komplikasyonlara da yol açmaktadır.

VIII. SUMMARY

The tissue damage after ischemia-reperfusion and the effect of this to blood parameters have significant importance on transplantatin issue of which medicine contemporarily deals with . The equilibrium between the formation and excretion of reactive oxygen molecules formed after injury was kept constant by autioxidative defence system. When reactive oxygen molecules can not be met by antioxidant system in pathological states such as ischemia-reperfusion, oxidative stress ensues.

All blood vessels entering or leaving the liver were clamped experimentally for 60 minutes in thirty-one female guina-pigs and then reoxigenized in the following 30 minutes. The two seperate groups received SOD and allopurinol in various times of ischemia. At the end of the procedure, the degree of ischemic injury and the efficacy of antioxidant agents were evaluated by using antioxidant system and by histopathologic examination. SOD,GSH-Px were determined as the key enzymes of antioxidant system, GSH, whereas Na^+ - K^+ ATPase, MDA levels in tissues and plasma, and serum Zn, Cu were assessed as an indicator of tissue damage.

Tissue and plasma MDA levels were significantly higher in ischemia-reperfusion group when compared to sham group. It was found that ischemic injury markedly improved in the SOD and allopurinol receiving groups when these two groups were compared to ischemia-reperfusion group. It was also determined that ATPase activity was significantly lower in ischemia-reperfusion group in respect to sham group, whereas it was higher in the other groups. The results for intracellular antioxidants were somewhat different and were as follows. GSH-Px activity was significantly low in ischemia-reperfusion induced injury group compared to sham group ($p < 0.05$), whereas there was a marked increase in parameters when ischemia-reperfusion and antioxidant groups were compared. This showed that exogenous antioxidant application to both groups supported the antioxidant defense system of the body. On the other hand, it was determined that SOD activity showed significant difference in all 3 groups when compared to sham group, whereas there was no significant difference between ischemia-reperfusion group and the other two groups that received antioxidants.

These results revealed that exogenous antioxidants did not have a meaningful effect on the values of SOD in guinea pig erythrocytes that underwent ischemia-reperfusion injury. GSH levels of all groups were not different from sham group and major degenerations with changes similar to cellular death were observed in the group that received. Ischemia-reperfusion whereas, a nearly normal or absolutely improved cell structure was observed in allopurinol group. Although minimal there was still congestion and dilatation of central veins in SOD receiving group. Serum Cu levels were significantly low in ischemia-reperfusion group whereas there was no difference among other groups ($p < 0.05$). The increased levels of the group that receiving only SOD as an antioxidant were statistically significant compared to ischemia-reperfusion group. Serum Zn levels showed significant difference in allopurinol receiving group ($p < 0.05$). The other groups did not have any significant difference.

In conclusion, these results showed that antioxidant capacity decreases as a result of increase in oxidative injury, consecutively exogenous antioxidants can be effectively used in the treatment of ischemia-reperfusion injury causes major changes and several complications in many organs and liver, which is the key point of the metabolism.

IX. KISALTMALAR

- ADP: Adenozin difosfat
 ATP: Adenozin trifosfat
 ATPaz: Adenozin- 5'- Trifosfataz
 CAPS: 3-(sikloheksilamino)-1-propan sülfonik asit
 CAT: Katalaz CCL₄: Karbon tetra klorür
 DHA: Dihidro askorbik asit
 DMSO: Dimetil sülfoksit
 EC-SOD: Ekstraselüler süper oksit dismutaz
 ETZ: Elektron transfer zinciri
 FAD: Flavin amid adenin dinükleotid
 G6PD: Glikoz-6- fosfat dehidrogenaz
 GSH: Redükte glutatyon
 GSH-Px: Glutatyon peroksidaz
 GSSG: Okside glutatyon
 GSSGR: Glutatyon redüktaz
 HOCl: Hipoklorik asit
 INT: 2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenol]-5 fenil tetrazoliyum klorid (p- iyodo nitro tetrazoliyum viyolet
 LPO: Lipid peroksidasyon
 MDA: Malonil dialdehit
 NAD: Nikotin amid adenin dinükleotid (Okside formu)
 NADH: Nikotin amid adenin dinükleotid (Redükte formu)
 NADP: Nikotin amid adenin dinükleotid fosfat (Okside formu)
 NADPH: Nikotin amid adenin dinükleotid fosfat (Redükte formu)
 NO[•]: Nitrik oksit
 O₂⁻: Süper oksit anyon radikali
¹O₂: Singlet oksijen

OH[•] : Hidroksil radikali

PAF (Platelet activating factor): Trombosit aktive edici faktör

PTA: Fosfo tungustik asit

PUFA (Poly Unsaturated Fatty Acid): Poliansatüre yağ asidi

R[•]: Allil radikali

ROO[•]: Peroksi radikali

SAN (some adenine nucleotide): Bazı adenin nükleotidler

SOD: Süper oksit dismutaz

SOR: Serbest oksijen radikalleri

TBA: Tiobarbiturik asit

TNF: Tümör nekroze edici faktör



X. KAYNAKLAR

- 1- Aan, N.L. ve Tezcan, E.F.(1992). Glutasyon Redüktaz. Biyokimya Dergisi. 17,(2),67-83.
- 2- Adams, J.D. Lauterburg, B.H. and Mitchell, J.R.(1983). Plasma Glutathione and Glutathione Disulfide in the Rat:Regulation and Response to Oxidative Stress.The J. Pharmacol. Exp.Ther. 227,(3),749-754.
- 3- Agar, N.S. Sadrzadeh, S.M.H. and Eaton, J.W.(1986). Erythrocyte Catalase: A somatic Oxidant Defence ? J. Clin Invest. 77, 319-321.
- 4- Akgül E.(1996). Tip II Diabetes Mellituslu Hastalarda Oksidan ve Antioksidan Mekanizmaların İncelenmesi (Uzmanlık tezi). Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ.
- 5- Anal, Ö. Güner, G. Gezer, S.Ulman, C. Taneli, N.N. (1995). Blood Selenium Level in Healthy Children:Correlation with Glutathione Peroxidase and Interrelation with vitamin E.Tr.J. Med. Sci.24, 201-203.
- 6- Anderson, M.E.(1985). Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide in Biological Samples. Meth.Enzimol.113,(70), 548-553.
- 7- Atalla, S.L. Toledo-pereyra, L.H. MacKenzie, G.H. and Cederne, J.P.(1985). Influence of Oxygen Free Radical Scavengers on Ischemic Livers.Transplantation. 40,(6), 584-590.
- 8- Atanalp, S.S. Polat, M. Yıldırğan, M.İ. Ertaş, E. Bakan, N. and Akçay, F.(1993). The Effects of Superoxide Dismutase, Deferoxamine and Their Combination on Gastric Mucozal Damage Due to Ischemia-Reperfusion. Doğa-Tr.J. Med.Sci.17, 201-205.
- 9- Badwey, J.A. and Karnowsky, M.L.(1980). Active Oxygen Species and the Function of Phagocytic Leucocytes. Annu. Rev Biochem. 49, 695-726.
- 10- Bannister, J.V. Bannister, W.H.(1984). Isolation and Characterization of Superoxide Dismutase.Meth.Enzymol.105,(9), 88-93.
- 11- Bannister, J.V. and Hill, O.H.A.(1982). Chemical Reactivity of Oxygen-Derived Radicals with Reference to Biological Systems. Biochem.Soc. Trans. 597 th Meeting. 10, 68-69.

12- Beutler, E. Duron, O. Kelly, B.M.(1963). Improved Method for the Determination of Blood Glutathione. *J. Lab. Clin. Med.* 61,(5), 882-888.

13- Borg, D.C.(1993). Oxygen Free Radicals and Tissue Injury. P. 13-51. Ed. T. Merrill and S. Fred. In: *Free Radicals in Tissue Damage*. Birkhuser :Boston.

14- Boros, M. Karacsony, G. Kazsaki, J. and Nagy, S.(1993). Reperfusion Mucosal Damage After Complete Intestinal Ischemia in the Dog: The Effect of Antioxidant and Phospholipase A₂ Inhibitor Therapy. *Surgery*. 113,(2), 184-191.

15- Brawn, K. and Fridovich, I.(1980). Superoxide Radical and Superoxide Dismutases: Threat and Defense. *Acta Physiol Scand.* 492, 9-18.

16- Boudjema, K. Van Gulik, T.M. Lindell, S.L. Vreugdenhil, P.S. Southard, J.H. and Belzer, F.O. (1990). Effect of Oxidized and Reduced Glutathione in Liver Preservation. *Transplantation*. 50, 948-951.

17- Buage, J.A. and Aust, S.D.(1990). Microsomal Lipid Peroxidation. *Meth. Enzymol.* 186, 302-310.

18- Bulkley, G.B. (1983). The Role of Oxygen Free Radicals in Human Disease Process. *Surgery*. 94,(3), 407-411.

19- Bulkley, G.B.(1993). Free Radicals and Other Reactive Oxygen Metabolites: Clinical Relevance and the Therapeutic Efficacy of Antioxidant Therapy. *Surgery*. 113, 479-483.

20- Burton, G.W. and Inguld, K.U.(1984). Beta-karotene: An Unusual Type of Antioxidant. *Science*. 224, 569-573.

21- Cheeseman, K.H. (1993). An Introduction to Free Radical Biochemistry. P.481-493. Ed. K.H. Cheeseman and T.F. Slater. In: 'Free radicals in Medicine'. *British Medical Bulletin*. London.

22- Cho, W.H. Kim, D.G. Murase, N. Mischinger, H.J. Todo, S. Starlz, T.E. (1990). Comparison of Superoxide Dismutase, Allopurinol, Coenzyme Q10, and Glutathione for the Prevention of Warm Ischemic Injury. *Transplantation*. 50,(2), 353-355.

23- Chwiecko, M. Holownia, A. Bielawska, A. and Farbiszewski, R.(1993). Inhibition of Non-enzymatic Lipid Peroxidation by 'Essentiale' a Drug Enriched in Phosphatidylcholine in Ethanol-Induced Liver Injury. *Drug and Alcohol Dependence*. 33, 87-93.

24- Costagliola, C.(1990). Oxidative State of Glutathione in Red Blood Cells and Plasma of Diabetic Patients:In vivo and in vitro Study:Clin. Physiol. Biochem. 8,204-210.

25- Çekirdekçi, A. İlhan, N. Akkuş, M.A. Köksel, O. Tetik, Ö. Tamer, L. Muz, M.H. İspir, T. (1995). İskemi ve Reperfüzyon Sonrası Akciğerde Bakır (Cu) ve Çinko (Zn) Düzeylerindeki Değişiklikler (Deneysel çalışma). Karadeniz Tıp Dergisi. 8,(3),117-120.

26- Çelik, S. Yılmaz, Ö. Nazıroğlu, M. Çay, M. ve Aksakal M.(1996). Kuzularda Eritrosit ve Serum Yağ Asitleri Bileşimine Diyetik E Vitamini ve Selenyumun Etkisinin Araştırılması. Biyokimya Dergisi. 21,(1),69-79.

27- Çiçek, E.(1984). E Vitamininin Tıbbi Değeri. D.Ü.T.F.Dergisi.11 (3-4)347-354.

28- Dashti, H.M. Al-Sayer, H. Behbehani, A. Madda, J. and Christenson, J.T.(1992). Liver Cirrhosis Induced by Carbon Tetrachloride and the Effect of Superoxide Dismutase and Xanthine Oxidase Inhibitor Treatment.J.R.Coll.Surg.(Edinburg). 37,23-28.

29- Di Pierro, D. Tavazzi, B. and Giardina, B.(1992). Malondialdehyde is a Biochemical Marker of Peroxidative Damage in the Isolated Postischemic Rat Heart.Mol. Cell Biochem.116,193-196.

30- Dormandy, T.L.(1978). Free-Radical Oxidation and Antioxidants. Lancet. 25,647-650.

31- Dormandy ,TL. (1983). An Approach to Free Radicals. Lancet.29,1010-1014.

32- Dormandy, T.L.(1988). In Praise of Peroxidation.Lancet. 12,1126-1128.

33- Draper, H.H. Hadley, M.(1990). Malondialdehyde Determination as Index of Lipid Peroxidation. Meth.Enzymol.186,(43),421-427.

34- Enkvetchakul, B. Anthony, N.B. and Bottje, W.G.(1994). Liver and Blood Glutathione in Male Broiler Chickens, Turkeys, and Quail. Poultry Science.74,885-889.

35- Ercan, Z.S. and Türker, R.K. (1990). General Review for Tissue Preservation by Iloprost and Tromboxane A₂ Inhibitörs. Gazi Med.J. 4,229-236.

36- Erden, M. Yüce, K. Kiper, H. Çolak, Ö. ve Alataş, Ö.(1991).Böbrek Transplantasyonunda Lipid Peroksid,Redükte Glutatyon ve Glutatyon Redüktaz Enzim Aktivitelerinin Araştırılması.Doğa-Tr.J. Med. Sci.15,145-151.

37- Erenel, G. Erbaş, D. ve Akıncıoğlu,A.(1992). Serbest Radikaller ve Antioksidan Sistemler. Gazi Tıp Dergisi. 3,243-250.

38- Ertaş, E. Atamanalp, S. Bulut, T. ve Polat, Y.(1991). İskemi ve Reperfüzyon Sonrası Karaciğer Dokusunda Malondialdehid Değeri ve Süperoksid Dismutazın Etkisi.Turk J Gastroenterohepatol. 2,139-142.

39- Fairbank, V.F. and Farias,R.N.1986. Biochemical Aspects of Hematology. P.1506-1507. Ed. N.W.Tietz In: 'Textbook of Clinical Chemistry'. 2nd ed, W.B. Saunders Company.

40- Faraji, B. Kang, H.K. and Valentine, J.L.(1987). Methods Compared for Determining Glutathione Peroxidase Activity in Blood.Clin.Chem. 33,(4),539-543.

41- Farber, J.L. Chien, K.R. and Mittnacht, S.(1981). The Pathogenesis of Irreversibl Cell Injury in Ischemia. Am J. Pathol.102,271-281.

42- Frei, B. Stocker, R. and Ames, B.N.(1988). .Antioxidant Defence and Lipid Peroxidation in Human Blood Plasma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85,9748-9752.

43- Feher, J. Lang, I. Deak, G. Cornides, A. Nekam, K. and Gergely, P. (1986). Free Radicals in Tissue Damage in Liver Diseases and Therapeutic Approach. Tokai J.Exp. Clin. Med.11,121-134.

44- Flitter,W.D. (1993). Free Radicals and Myocardial Reperfusion Injury. P.545-555. Ed.K.H. Cheeseman and T.F.Slater. In:' Free Radical in Medicine'. British Medical Bulletin. London.

45- Foschi, D. Castoldi, L. Lesma, A. Musazzi, M. Benevento, A. and Trabucchi, E. (1993). Effect of Ischemia and Reperfusion on Liver Regeneration in Rats.Eur. J. Surg. 159,393-398.

46- Frederiks,W.M. and Marx, F.(1987). Changes in Cytoplasmic and Mitochondrial Enzymes in Rat Liver after Ischemia Followed by Reperfusion. Exp.Mol.Pathol. 47, 291-299.

47- Freeman, B.A. and Crapo, J.D.(1982). Biology of Disease:Free Radical and Tissue Injury. Lab Invest. 47,412-426.

- 48- Fridovich, I.(1978).The Biology of Oxygen Radicals. Science. 201,875-880.
- 49- Fridovich, I.(1981). Oxygen Toxicity. Biochem. Soc. Trans.597th Meeting. 10, 67-68.
- 50- Fridovich, I.(1984). Overview:Biological Sources of O₂⁻. Meth. Enzymol. 105,(5), 59-61.
- 51- Fujii, S.(1988). The Role of Glutathione Peroxidase in the Antioxidant System of Erythrocytes.Br. J. Heamatol. 68,263-271.
- 52- Gerli, G. Locatelli, G.F. Mongiat, R. Zenoni, L. Agostoni, A. Moschini, G. Zafiroopoulos, D. Bruno, S. Rossi, S. Vignati, A. Tarolo, G. and Podda, M.(1992). Erythrocyte Antioxidant Activity, Serum Ceruloplasmin, and Trace Element Levels in Subject with Alcoholic Liver Disease. Am J. Clin. Pathol. 97,614-618.
- 53- Gutteridge,J.M.C.(1982)Fate of Oxygen Free Radicals in Extracellular Fluids. Biochem. Soc. Trans. 10,72-73.
- 54- Gutteridge, J.M.C.(1988). Free Radicals and Metal Ions in Human Disease. Overview. Meth. Enzymol.1,66-85.
- 55- Gutteridge, J.M.C. and Halliwell, B. (1988). The Deoksiriboz Assay:An Assay both for 'Free' Radical and for Site-Specific Hydroxyl Radical Production.Biochem. 253,932)
- 56- Gutteridge, J.M.C.(1995). Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. Clin Chem.41,(12),1819-1828.
- 57- Habif, S. Özmen, D. Mutaf, I. Güner, İ. Bayındır, O. Önder, R. ve Erlaçın, S.(1993). Kalsiyum Kanal Blokerlerinin Oksidan ve Antioksidan Savunma Sistemlerine Etkisi. Biyokimya Dergisi. 18,(3),19-26.
- 58- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.(1984). Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metals and Disease.Biochem J. 219,1-14.
- 59- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.(1984). Lipid Peroxidation, Oxygen Radicals, Cell Damage and Antioxidant Therapy. Lancet. 23, 1396-1397.
- 60- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.(1986) .Iron and Free Radical Reactions:Two Aspects of Antioxidant Protection.Elsevier Science Publishers.TIBS 11,372-375.

61- Halliwell, B.(1989). Superoxide , iron, vascular endothelium and reperfusion injury. *Free Radic. Res. Commun.* 5, 315-18.

62- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.(1989).*Free Radicals in Biology and Medicine*, 2nd ed,Oxford:Oxford University Press.

63- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.(1990).Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease:An Overview. *Meth. Enzymol.*186,1-35.

64- Hasanoğlu, A.(1993). E Vitamini. *Yeni Tıp Dergisi.* 10,(5), 33-37.

65- Hinder, R.A. and Stein, H.J.(1991).Oxygen-derived Free Radicals.*Arch Surg.* 126,104-105.

66- Holley, A.E. and Cheeseman, K.H. (1993). Measuring Free Radical Reactions In Vivo.P.494-505. Ed.K.H. Cheeseman and T.F.Slater. In: ' Free Radical in Medicine'. British Medical Bulletin. London.

67- Horton, J.W. and White,D.J.(1993). Free Radical Scavengers Prevent Intestinal Ischemia-Reperfusion-Mediated Cardiac Dysfunction. *J.Surg. Res.* 55,282-289.

68- İldan, F. Polat, S. Öner, A. İsbir, T. Göçer, İ. and Tan, Ö.(1995). Effect of Naloxone on Sodium- and Potassium-activated and Magnesium-dependent adenosine-5'-Triphosphatase Activity and Lipid Peroxidation and Early Ultrastructural Findings after Experimental Spinal Cord Injury. *Neurosurgery.* 36, (4), 797-805.

69- Jacson, R.L.(1993).Antioxidants for The Treatment and The Prevention of Atherosclerosis. *Biochem. Soc. Trans.* 21,650-651.

70- Karwinski,W. Ulvik, R. Farstad, M. Svardal, A. Berge, R. and Soreide, O. (1993). Effect of Allopurinol on the Concentration of Endogenous Glutathione in Hepatocytes After an Hour of Normothermic Liver Ischemia. *Eur. J. Surg.* 159,355-359.

71- Kılınç, K.(1985). Oksijen Radikalleri:Üretilmeleri, Fonksiyonları ve Toksik Etkileri. *Biyokimya Dergisi.* 10,(2),59-89.

72- Kılınç, K.(1986). Kanserde Oksijen Radikalleri ve Süperoksit dismutaz. *Biyokimya Dergisi.* 9,(3),59-76.

73- Köksel, O.(1998). İskemi – Reperfüzyona Bağlı Akciğer Hasarı Üzerine α -lipoik Asidin etkisi (Uzmanlık Tezi). Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı. Elazığ.

74- Köse K.,Doğan,P.(1992)Lipid Peroksidasyonu.Erciyes Tıp Dergisi.ek-1:340-350.

75- Kuroe, K. Kurokawa, T. Nishikimi, M. Nonami, T. Harada, A. Nakoa, A. and Takagi, H. (1991). Effects of Tromboxane A₂ Synthetase Inhibitor on Postischemic Liver Injury in Rats. Eur. Surg. Res.23,20-26.

76- Lambotte, L. d'Udekem, Y. Amrani, M. and Taper, H.(1988). Free Radicals and Liver Ischemia-Reperfusion Injury. Transplant. Proc. 20,977.

77- Loeper, J. Goy, J. Rozensztajn, L. Bedu, O. and Moisson, P.(1991). Lipid Peroxidation and Protective Enzymes During Myocardial Infarction. Clin. Chim. Acta.196, 119-126.

78- Lowry, O.H. Rosenbrough, N.J. Farr, A.L. and Randall, R.J.(1951)Protein Measurements with the Folin Fenol Reagent. J. Biol. Chem. 193-265.

79- Marklund, S.L.(1984).Extracellular Superoxide Dismutase in Human Tissues and Human Cell Lines. J.Clin.Invest. 74,1398-1403.

80- Marklund, S.L.(1985). Product of Extracellular-Superoxide Dismutase Catalysis.FEBS Letter. 184,(2),237-239.

81- Marubayashi, S. Dohi, K. and Ezaki, H.(1982). Preservation of İschemic Rat Liver Mitochondrial Functions and Liver Viability with CoQ₁₀ . Surgery. 92,631-637.

82- Matsubara, L.S. Ferreira, A.L.A. Tornero, M.T.T. and Machado, P.E.A.(1992). Influence of Diabetes Mellitus on the Glutathione Redox System of Human Red Blood Cells.Brazilian J. Med. Biol. Res.25,331-335.

83- McCay, P.B. Gibson, D.D. Fong, K.L. and Hornbrook, K.R.(1976). Effect of Glutathione Peroxidase Activity on Lipid Peroxidation in Biological Membranes.Biochim. Biophy. Acta. 431,459-468.

84- McCay,P.B.(1981). Physiological Significance of Lipid Peroxidation. Federation Proceedings.Symposium. 40,(2),173.

85- McCord, J.M.(1983). The Biochemistry and Pathophysiology of Superoxide. *The Physiologist*. 26,(3),156-158.

86- McCord, J.M.(1983). The Superoxide Free Radical:Its Biochemistry and Pathophysiology. *Surgery*. 94,(3),412-414.

87- McCord, J.M.(1985).Oxygen- derived Free Radicals in Postischemic Tissue Injury.P.159-163.Ed.F.H. Epstein. In: 'Mechanisms of disease'. The N. England J. Med.

88- Meister, A.(1983). Selective Modification of Glutathione Metabolism.*Science*. 220, 472 -477.

89- Minor, Th. Isselhard, W. Yamamoto, Y. Obara, M. and Saad, S.(1993). The Effects of Allopurinol and Lipid Peroxidation and Energy Metabolism in the Liver Ischemia in an Aerobic/Anaerobic.*Jpn. J. Surg*. 23, 728-732

90- Minor, Th. and Isselhard,W.(1993).Role of the Hepatovasculature in Free Radical Mediated Reperfusion Damage of the Liver.*Eur. Surg. Res*. 25,287-293.

91- Nagasue, N. Kohno, H. Chang, Y. and Nakamura,T.(1989). Iron, Copper and Zinc Levels in Serum and Cirrhotic Liver of Patients with and Hepatocellular Carcinoma. *Oncology*. 46,293-296.

92- Nauta, R.J. Walsh, D.B. and Butterfield, A.(1990).Oxygen-derived Free Radicals in Hepatic Ischemia and Reperfusion Injury in the Rat. *Surgery, Gynecol. Obstet*. 171, 120-125.

93- Nilsson, U.A. Aberg, J. Aneman, A. and Lundgren, O.(1993). Feline Intestinal Ischemia and Reperfusion:Relation Between Radical Formation and Tissue Damage. *Eur. Surg. Res*. 25,20-29.

94- Nohl, H.(1993). Involvement of Free Radicals in Ageing: A Consequence or Cause of Senescence. P.653-667. Ed. K.H. Cheeseman and T.F.Slater. In: 'Free Radical in Medicine'. British Medical Bulletin. London.

95- Ohkawa, H. Ohishi, N. and Yagi, K.(1979). Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction.*Anal. Biochem*. 95,351-358.

96- Ontell, S. J. Makowka, L. Trager, J. Mazzaferro, V. Ove, P. and Starzl, T.E.(1989). Pharmacologic Modulation of Experimental Postischemic Hepatic Function. *Ann.Surg*. 209,(2), 200-210.

97- Otamiri, T.(1989).Oxygen Radicals,Lipid Peroxidation,and Neutrophil Infiltration after Small-Intestinal Ischemia and Reperfusion. *Surgery*.105,(5),593-597.

98- Oyanagui,Y.(1984). Reevaluation of Assay Methods and Establishment of Kit for Superoxide Dismutase Activity.*Anal. Biochem*.142,290-296.

99- Öner, G. Şentürk, Ü.K. and İzgüt, N.(1993). The Effect of Manganese on Erythrocyte Superoxide Dismutase. *Doğa-Tr.J. Med. Sci.* 19,283-286.

100- Özden, A. İlhan, N. Yumbul, Z. and Aksulu, H.(1994). L-Arginine Attenuates Normothermic Ischemia and Reperfusion Injury of Liver in Rats. *Acta Chirurgica Mediterranea*. 10,227-231.

101- Özden, A. Kasarcı, E. Özercan, R. İlhan, N. Bilgihan, A., Türközkan, N. ve Kargıcı, H. (1994). Effects of Ginkgo Biloba Extract on Intestinal Ischemia and Reperfusion Injury in Rats. *Acta Medica Mediterranea*.10,1-5.

102- Özden, A. Kargıcı, H. Bilgihan, A. Özercan, R. İlhan, N. ve Türközkan, N.(1994). Ratlarda İntestinal İskemi ve Reperfüzyon Hasarında L-Carnitine'in Etkisi. *Çağdaş Cerrahi Dergisi*.8,209-213.

103- Özden, A. İlhan, N. Yumbul Z. Çifter, Ç. Aksulu, H. ve Kargıcı, H.(1995). Nalorfinin, Kobaylarda Karaciğer İskemi-Reperfüzyon Hasarına Etkisi. *Klin. Deney Cerrah Derg.* 3,73-76.

104- Paglia, D.E. and Valentine, W.N.(1967). Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte Glutathione Peroxidase. *J.Lab. Clin. Med.* 70, (1), 158 -168.

105- Parks, D.A. Bulkey, G.B. and Granger, D.N.(1983). Role of Oxygen-derived Free Radicals in Digestive Tract Diseases. *Surgery*. 94,(3),415-422.

106- Pekcan, M. Aydın, R. ve Alpaslan, F.(1987). Oksijen Serbest Radikalleri Hastalıklarda Yeni Bir Dönüm Noktası mı ?*GATA Bülteni*. 29, 869-880.

107- Placer, Z.A. Cushman, L.L. and Johnson, B.C.(1966). Estimation of Product of Lipid Peroxidation (malonyl Dialdehyde) in Biochemical Systems. *Anal. Biochem*. 16, 359 - 364.

108- Pompella, A. Maellaro, E. Casini, A.F. Ferrali, M. Ciccoli, L. and Comporti, M. (1987). Measurment of Lipid Peroxidation In Vivo: A Comparison of Different Procuders. *Lipids*.22, (3), 206-211.

109- Porter, N.A.(1984). Chemistry of Lipid Peroxidation. Meth. Enzymol. 105,(32), 273-282.

110- Rangan, U. and Bulkley, G.B. (1993). Prospects for treatment of free radical mediated tissue injury. P. 700-717. Ed. KH Cheeseman and T.F. Slater. Free radicals in Medicine. British Medical Bulletin. London.

111- RANSOD. SOD Tayin Kiti.(1997). Randox Laboratories Ltd.,Diamond Road, Crumlin, Co. Antrim, United Kingdom, BT29 + QY.

112- Reading, H.W. and Isbir, T.(1980).The Role of Cation Activated ATPase in Transmitter Release from the Art Iris. Q.J. Exp. Physiol. 65,105

113- Riley, P.(1993). Dedication: Professor T F Slater. P.479-480.Ed. KH Cheeseman and TF Slater. Free Radical in Medicine. British Medical Bulletin. London.

114- Sato, M. Sasaki, M. and Hojo, H.(1995). Antioxidative Roles of Metallothionein and Manganese Superoxide Dismutase Induced by Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-6. Arch. Biochem. Biophys. 316, 738-744.

115- Satoh, K.(1978). Serum Lipid Peroxide in Cerebrovascular Disorders Determined by a New Colorimetric Method. Clin. Chim Acta. 90, 37-43.

116- Schemling ,D.J. Caty, M.G. Oldham, K.S. Guice, K.S. and Hinshaw, D.B.(1989). Evidence for Neutrophil-Related Acute Lung Injury After Intestinal Ischemia-Reperfusion. Surgery. 106, 195.

117- Sevanian, A. and Hochstein, P.(1985). Mechanisms and Consequences Lipid Peroxidation in Biological Systems. Ann. Rev. Nutr. 5, 365-390.

118- Singh, A.K. Dhaunsi, G.S. Gupta, M.P. Orak, J.K. Asayama, K. and Singh, I.(1994). Demonstration of Glutathione Peroxidase in Rat Liver Peroxisomes and Its Intraorganellar Distribution. Arch. Biochem. Biophys. 315,(2), 331-338.

119- Slater, T.F.(1984). Overview of Methods Used for Detecting Lipid Peroxidation. Meth. Enzymol. 105,(33), 283-293.

120- Slater, T.F. (1984). Free-Radical Mechanisms in Tissue Injury. Biochem. J. 222 ,1-15.

121- Slater, T.F.(1982). Lipid Peroxidation. Biochem. Soc. Trans. 10, 70-71.

122- Southard, J.H. Marsh, D.C. McAnulty, J.F. Belzer, F.O.(1987). Oxygen-derived Free Radical Damage in Organ Preservation: Activity of Superoxide Dismutase and Xanthine Oxidase. *Surgery*. 101,(5),566-570.

123- Srivasta, S.K.(1971). Metabolism of Red Cell Glutathione. *Exp. Eye Res.* 11,294-305.

124- Stein, H.J. Hinder, R.A. and Oosthuizen, M.M.(1990). Gastric Mucosal Injury Caused by Hemorrhagic Shock and Reperfusion: Protective Role of the Antioxidant Glutathione. *Surgery*. 108, 467-474.

125- Stein, H.J. Oosthuizen, M.M.J. Hinder, R.A. and Lamprechts, H. (1991). Oxygen Free Radicals and Glutathione in Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury. *J.Surg.Res.* 50, 398-402.

126- Sullivan, J.F. Blotcky, A.J. Jetton, M.M. Hahn, H.K.J. and Burch, R.E.(1979). Serum Levels of Selenium, Calcium, Copper, Magnesium, Manganese and Zinc in Various Human Diseases. *J.Nutr.* 109, 1432-1437.

127- Şahin, A. Alataş, Ö. Çolak, Ö. Bayçu, C. Yaşar, B. Karahüseyinoğlu, E. Kiper, H. and İnal, M.(1994). Effects of Pentoxifylline in Ischemia-Reperfusion of Rat Liver. *Tr. J. Med. Res.* 12,(4),143-146.

128- Tappel, A.L. and Dillard, C.J.(1981). In Vivo Lipid Peroxidation: Measurement Via Exhaled Pentane and Protection by Vitamin E. *Federation Proceedings*. 40,(2),174-178.

129- Tien, M. Svingen, B.A. and Aust, S.D.(1981). Superoxide Dependent Lipid Peroxidation. *Federation Proceedings*. 40,(2),179-182.

130- Topçu, Z.(1985). Bakla Ekstrelerinin Eritrosit Glutasyon Düzeyleri ve ATPaz Enzim Sistemlerine Etkisi (Master tezi). Çukurova Üniv. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı. Adana.

131-Tsimoyiannis, E.C. Moutesidou, K.J. Moschos, C.M. Karayianni, M. Karkabounas, S. and Kotoulas, O.B.(1993). Trimetazidine for Prevention of Hepatic Injury Induced by Ischemia and Reperfusion in Rats. *Eur.J.Surg.* 159, 89-93.

132- Turnage, R.H. Bagnascu, J. Berger, J. Guice, K.S. Oldham, K.T. and Hinshaw, D.B. (1991). Hepatocellular Oxidant Stress Following Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury. *J. Surg Res.* 51, 467.

133- Vladimirov, Y.A. Olenev, V.I. Suslova, T.B. and Cheremisina, Z.P.(1980). Lipid Peroxidation in Mitokondrial Membrane. *Adv. Lipid Res.*17, 173-249.

134- Vural, H. Akkuş, İ. Ve Bor, M.A.(1995).Serbest Radikallerin Yaşlanmadaki Rolü. *S. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi.*11,(1),101-103.

135- Wang, K. Monden, M. Toshio, K. Gotoh, M. Umeshita, K. Ukei,T. and Mori,T.(1993). Protective Effect of Platalet activiting Factor Antagonist on Ischemia İnduced Liver Injury in Rats.Surgery. 113,(1),76-83.

136- Weisiger, R.A. (1986). Oxygen Radicals and Ischemic Tissue Injury. *Gastroenterology.* 90,(2),494-496.

137- Welbourn, C. R. B. Goldman, G. Paterson, I.S. and Valeri, C.R. (1991). Pathophysiology of Ischemia reperfusion Injury: Central Role of the Neutrophil. *Br.J.Surg.*78,(6),651-655.

138- Winrow,V.R. Winyard, P.G. Morris, C.J and Blake, D.R. (1993). Free Radical in Inflammation: Second Messengers and Mediators of Tissue Destruction. P.506-522. Ed.K.H. Cheeseman and T.F.Slater. In: ' Free Radical in Medicine'. British Medical Bulletin. London.

139- Winterbourn, C.C. Hawkins, R.E. Brian, M. and Carrel, R.W.(1975).The Estimation of Red Cell Superoxide Dismutase Activity.*J.Lab.Clin.Med.*85,(2),337-341.

140- Wolff, S.P. Garner, A. and Dean, R.T.(1986). Free Radicals, Lipids and Protein Degredasyon. Elsevier Science Publishers. 11,27-31.

141- Yagi, K. (1984). Assay of Blood Plasma or Serum. *Meth. Enzymol.* 105, 328-331.

142- Yagi, K.(1987). Lipid Peroxidan and Human Diseases. *Chem. Phys. Lipids.* 45, 337-351.

143- Yaprak, M. (1998).Akut Miyokart Enfarktüsünde Biyokimyasal Parametreler ve Antioksidan Sistemle İlişkisi (Doktora Tezi). Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Adana.

144- Younes, M. Mohr, A. Schoenberg, M.H. and Schildberg, F.W.(1987). Inhibition of Lipid Peroxidation by Superoxide Dismutase Following Regional Intestinal Ischemia and Reperfusion. Res. Exp. Med.187, 9-17.

145- Yöntem, M. Akkuş, İ. Şekeroğlu, M.R. Vural,H. Öztok, İ. Kalak, S. ve Koçyiğit , A. (1993). Erkeklerde Orta Derecede Alkol Alımının Eritrosit Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi Üzerine Olan Etkisi. S.Ü.Tıp Fak. Dergisi.3, 339-344.

146- Zingzen, H.(1978). A Summary of the Vitamin E / Selenium Problem in Ruminants. News and Reviews. Roche.1-18.



XI. ÖZGEÇMİŞ

1969 Çemişgezek doğumluyum. İlk, orta ve lise tahsilimi Elazığ'da tamamladım. 1986 yılında Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yüksek öğrenimime başladım ve 1992 yılında bu fakülteden mezun oldum. Aynı yıl mecburi hizmet kur'asında Kırıkkale-Keskin Merkez Sağlık Ocağına tayin edildim. Bir yıllık mecburi hizmetimi bitirdikten sonra Elazığ Abdullah Paşa Sağlık Ocağına tayin yaptırıldığım sırada Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin açmış olduğu 1993- Güz dönemi doktora sınavını kazandım ve bir yıl süre ile Biyokimya Anabilim Dalında dışarıdan devam etmek suretiyle daha sonra araştırma görevlisi olarak atanarak çalışmaya başladım. Evli ve 1 çocuk annesiyim.



XII. TEŞEKKÜR

Tez konumun seçiminde, değerlendirilmesinde ve tez çalışmalarım esnasında destek ve yardımlarından dolayı değerli hocam Prof. Dr. Turgay İsbir ve Y. Doç. Dr. İhsan Halifeoğlu'na teşekkürü bir borç bilirim

Çalışmalarım esnasında desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı başkanımız Doç. Dr. Necip İlhan'a ve Biyokimya Anabilim dalının tüm Öğretim üyelerine , Araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve Biyokimya laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarım da bana yardımcı olan Genel Cerrahi Anabilim dalı Araştırma görevlilerine ve özellikle uzman Dr. Nurullah Bülbüller, patoloji ABD öğretim üyesi Y.Doç.Dr. İ.Hanefi Özercan'a ve Göğüs Kalp ve Damar Cerrahisinde uzman olan Dr. Oğuz Köksel'e teşekkürlerimi sunarım.