

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**GİNKGO GLİKOZİDLERİN ERİTROSİTLERDE LİPİD
PEROKSİDASYONU, SÜPEROKSİD DİSMUTAZ
VE KATALAZ AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Tezi Hazırlayan
Ayhan YILMAZ

Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Yöneticisi
Prof.Dr.Pakize DOĞAN

KAYSERİ-Mart-1997

Erciyes Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma, jürimiz tarafından Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

17.1.3. / 1997

Başkan : Prof. Dr. Pakize Doğan *Pakize*
Üye : Prof. Dr. K. Muzaffer USTİDAL *muzaffer*
Üye : Doc. Dr. Hatice PAŞAOĞLU *han*

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Pakize
Prof. Dr. Pakize DOĞAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

KISALTMALAR

O_2^-	: Süperoksit anyonu
1O_2	: Singlet oksijen
$OH\cdot$: Hidroksil radikali
LP	: Lipid Peroksidasyonu
SOD	: Süperoksit dismutaz
GSH-P _x	: Glutasyon Peroksidaz
Cp	: Seruloplazmin
BSA	: Bovine serum albumin
EGb-761	: Ginkgo biloba ekstresi
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
MDA	: Malondialdehid
TBA	: Tiyobarbitürik asit
PBS	: Fosfat tamponlu salin

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Oksijen Radikalleri	3
2.2. Lipid Peroksidasyonu ve Mekanizması	11
2.3. Süperoksit Dismutaz	14
2.4. Katalaz	17
2.5. Ginkgo Biloba Ekstresi	18
3. MATERYAL VE METOD	21
3.1. Materyal	21
3.2. Metod	22
3.2.1. Lipid Peroksidasyonu Tayini	23
3.2.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Tayini	26
3.2.3. Katalaz Aktivitesi Tayini	31
3.2.4. Hemoglobin Tayini	33
4. BULGULAR	36
5. TARTIŞMA	41
6. SONUÇLAR	47
7. ÖZET	48
8. SUMMARY	49
9. KAYNAKLAR	50
10. EK TABLOLAR	57

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo I : Sağlıklı Kişilerin Yaş ve Cinsiyet Durumu	37
Tablo II : EGb-761 Kontrol Grubunun LP Değerleri	38
Tablo III : EGb-761 ve Kontrol Grubuna Ait SOD Aktivitesine Ait % İnhibisyonu Değerleri.....	39
Tablo IV : EGb-761 ve Kontrol Grubuna Ait SOD Değerleri	40
Tablo V : EGb-761 ve Kontrol Grubuna Ait Katalaz Değerleri	41
Şekil 1 : Moleküler Oksijenin Redüksiyon Basamakları ve Bu Basa - maklarda Oluşan Serbest Radikaller	4
Şekil 2 : LP Zincir Reaksiyonu ve Koruyucu Metotları	13
Şekil 3 : Katalaz ve GSHPx İnaktivasyon Mekanizması	18
Şekil 4 : EGb-761'in Elde Ediliş Şeması	20
Şekil 5 : TBA ile MDA'in Oluşturduğu Kompleks	23
Şekil 6 : LP Ölçümünde Kullanılan MDA Standart Eğrisi	25
Şekil 7 : Ksantin-ksantin Oksidaz Sisteminde SOD ile NBT Redüksi- yonunun Standart İnhibisyon Grafiği	30
Şekil 8 : Yüzde İnhibisyona Karşı Log Cu-Zn SOD Aktivitesi Grafiği.....	30
Şekil 9 : Katalaz Ölçümüne Ait Standart Eğri	33
Şekil 10 : Katalaz Aktivitesinin Zaman Bağlı Olarak Değişmesi	33
Şekil 11 : Hemogloblin Ölçümüne Ait Standart Eğri	35
Şekil 12 : EGb-761 ve Kontrol Grubunda Belirli Zaman Aralıklarıyla Yapılan İnkübasyon Sonucu MDA Oluşumunu Gösteren Eğri.....	37
Şekil 13 : EGb-761 ve Kontrol Grubunda Belirli Zaman Aralıklarıyla Yapılan İnkübasyon Sonucu SOD'ın % İnhibisyon Grafiği ...	38
Şekil 14 : EGb-761 ve Kontrol Grubunda Belirli Zaman Aralıklarıyla Yapılan İnkübasyon Sonucu SOD Aktivitesine Ait Grafik ...	39
Şekil 15 : EGb-761 ve Kontrol Grubunda Belirli Zaman Aralıklarıyla Yapılan İnkübasyon Sonucu Katalaz Aktivitesine Ait Grafik.	40

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Oksijen, canlılar için bir yüzü "iyi" , diğer yüzü "kötü" diye nitelendirilebilen bir bileşiktir. Moleküler oksijen bütün canlılar için toksik etkili olup, atmosferde değerinin % 20 artması ile toksisite kendini gösterir. Oksijenin tam olmayan indirgenmesiyle oluşan toksik ürünlerine karşı canlılar korunma mekanizmasına sahip olmakla birlikte, bu korunma pek çok koşulda aşılabilmekte ve yetersiz kalabilmektedir (1).

Çevreden kaynaklanan kimyasal ve özellikle de fiziksel etkenlerle; ayrıca oksijeni kullanan canlılardan oksijenin yer aldığı pek çok biyokimyasal tepkimelerde oksijenin bazı toksik ürünleri meydana gelir. Anaerobik canlılar da dahil olmak üzere, canlılarda toksik etkili olan moleküler oksijen değil, ancak oksijenin tam olmayan indirgenmesiyle veya elektromanyetik dalgaların etkisiyle meydana gelen oksijen radikalleridir. Bu radikaller biyolojik sistemlerin tanıdıkları en reaktif ve toksik maddeler olup oksijenin toksik etkisinin gerçek nedenidir (1).

Oksijenin kısmi redüksiyonu ya da eksitasyonu neticesinde süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen (1O_2) ve hidroksil

radikali (OH^\bullet) gibi toksik oksijen radikalleri açığa çıkmaktadır (2,3). Bu radikaller hücrel komponentler üzerinde çeşitli hasarlara yol açmaktadır. Lipid peroksidasyonu oksijen radikallerinin neden olduğu en önemli hasarlardan biridir (3).

Eritrosit membranlarında lipid peroksidasyonu, serbest oksijen radikalleri tarafından meydana getirilen membran harabiyetinin temel sebebidir (4). Eritrositler oksidatif strese karşı bazı savunma sistemleri geliştirmişlerdir. Anti-oksidan sistem denen bu savunma mekanizması eritrositleri peroksidasyona karşı korumaktadır (4,5). Eritrositlerde bulunan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz (GSH-P_x) anti-oksidan enzimler olarak belirlenmiştir (6).

Biyolojik membranlardaki fosfolipidlerin serbest oksijen radikalleri ile peroksidasyonu, hücre membranlarının dejenerasyonu veya hücrelerin yaşlanması, kanser, diyabet ve diğer hastalıklarda patojenik bir mekanizma olarak düşünülmektedir. Böylece serbest radikal tutucu aktiviteye sahip maddelerin geliştirilmesi tedaviye yönelik araştırmanın önemini ortaya koymuştur (7).

Ginkgo biloba ekstraktının (EGb 761), serbest radikal üretimi olan hastaların tedavisinde etkili olduğu bilinmektedir. EGb 761'de SOD aktivitesi ve süperoksit anyonunu yakalama özelliği vardır (7,8).

EGb 761'in antioksidan etkilerini araştırmak amacıyla yapılan bu çalışmada lipid peroksidasyonu indükleyicisi olan t-Butil hidroperoksit ile indüklenen eritrositlerde EGb 761'in lipid peroksidasyonuna etkisi incelenmiştir. Ayrıca indüksiyon olmaksızın EGb 761'in eritrositlerde SOD ve katalaz aktivitelerine olan etkisi araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. OKSİJEN RADİKALLERİ

Moleküler oksijen, spinleri aynı yönde olan paylaşılmamış iki elektron ihtiva etmektedir. Bundan dolayı kararsız bir yapıda olan moleküler oksijenin % 98'i oksidatif ara yolla suya, kalan kısmı ise kısmi redüksiyon sonucu aktif oksijen radikallerine dönüşmektedir (2,3).

Moleküler oksijenin canlılardaki toksik etkisinin gerçek nedeni oksijenin aktif türleri olan oksijen radikalleridir (1).

Dört tip oksijen radikali vardır (2,3,9):

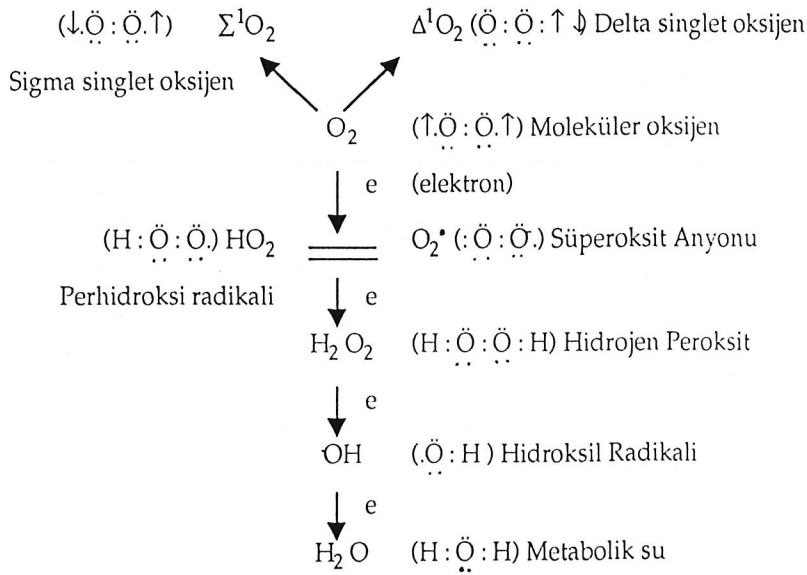
- 1- Süperoksit radikali (O_2^\bullet)
- 2- Singlet oksijen (1O_2)
- 3- Hidroksil radikali (OH^\bullet)
- 4- Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Bunlardan süperoksit radikali hem çevresel etkenler, hem de organizmadaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle en çok ve en kolay oluşan oksijen radikalidir. Canlılarda diğer radikallerin oluşumu çoğunlukla süperoksit radikallerinin birikmesine bağlıdır ve bir kere bu radikaller biriktikten sonra bir seri zincirleme radikalik tepkimeler sonucu diğer radikaller oluşur. Bu nedenle öncelikle süperoksit radikalinin incelenmesi yararlı olacaktır (1).

1- Süperoksit Radikali (O_2^{\bullet})

Moleküler oksijen dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron içerir. Bu orbitallerin tek elektron alması ile süperoksit radikali (O_2^{\bullet}), iki elektron alması ile de peroksi anyonu (O_2^{2-}) oluşur (1).

Süperoksit radikali, bir oksidan gibi davranarak bir elektron daha alabilir; böylece oluşan peroksi anyonunun, ortamdan iki proton almasıyla, hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşabilir (1) (Şekil 1).



Şekil 1. Moleküler oksijenden, oksijen radikallerinin oluşumu (2,10).

İki süperoksit radikali birbiri ile etkileşerek biri oksitlenirken diğeri ise indirgenir, böylece H_2O_2 ve O_2 meydana gelir (11).

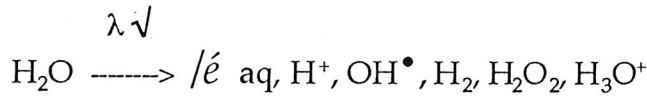


Süperoksit radikallerinin temizlendiği bu tepkimeye dismutasyon tepkimesi denir (1,11).

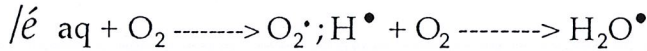
Canlılarla süperoksit radikallerinin oluşumuna neden olan olay ve etkileri iki grupta toplamak mümkündür:

1- Çevresel etkiler; Yüksek enerjili ışıklardan özellikle beta, gama ve X ışınları, biyolojik sistemlerde O_2^{\bullet} oluşumuna neden olan dış etkenlerdir (1, 12).

Bu ışınlar sulu ortamdan geçtikleri zaman suyu iyonlara ve çeşitli ürünlere parçalamaktadır (1,12).



Oksijenli ortamda;



2- Moleküler oksijeni metabolize eden organizmalarda, pek çok tepkimelerle O_2^- üretilir.

a) Hidrokinonlar, lökoflavinler, katekolaminler, tioller, indirgenmiş boyalar, tetrahidropteridin, ferrodoksin ve hemoproteinlerin otooksidasyonu ile süperoksit açığa çıkmaktadır (1,13).

b) Ksantin oksidaz; dihidrooratat dehidrojenaz, flavoprotein dehidrojenaz gibi enzimatik tepkimelerde, O_2^{\bullet} oluşur (1).

c) Mitokondrilerde gerçekleşen biyolojik oksidasyon sırasında, bol mik-

tarda O_2^\bullet açığa çıkmaktadır.

Mitokondri solunum zincirinin;

1) Flavoprotein-NADH dehidrojenaz bölgesi

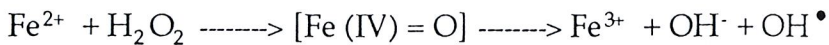
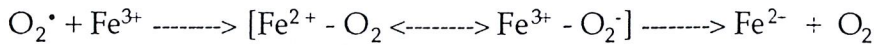
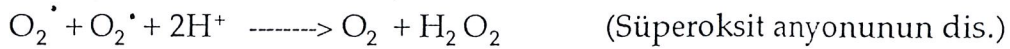
2) Ubikinon-sit-b bölgesi (Muhtemelen ubikinonun otooksidasyonu ile) olmak üzere iki bölgesinde O_2^\bullet üretilir (1).

d) Önemli ölçüde süperoksit radikalleri de fagositik hücrelerin, yabancı bir madde veya immun kompleks ile karşılaşması neticesinde gösterdikleri respiratuvar patlama ile üretilir. Nötrofiller, monositler ve eozinofiller O_2^- üreten fagositik hücrelerdir (1,9,14).

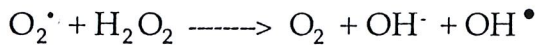
O_2^\bullet hem redüktan hem de oksidan olarak faaliyet gösterebilmektedir (1). Redüktan olarak rol oynadığında (Örneğin; ferristokrom C veya "nitro blue tetrazolium" un redüksiyonu) bir elektron kaybederek oksijene okside olmaktadır. Oksidan olarak rol oynadığında (Örneğin; epinefrin'in oksidasyonu) bir elektron ve proton kazanarak H_2O_2 'e redüklenmektedir (15).

Süperoksit anyonun kendisi, nisbeten inert bir ajan olmakla beraber, geçiş metallere katalitik etkisiyle son derece aktif hidroksil radikallerine çevrilebilmektedir (Haber-Weiss Reak.) Süperoksit radikallerinden, süperoksit dismutaz (SOD) ya da spontan dismutasyon ile oluşturulan hidrojen peroksit de, hidroksil radikallerinin üretilmesine olanak sağlamaktadır (Fenton Reak.) (2, 16,17). Bu reaksiyon aşağıda gösterildiği gibi formüle edilebilir:

SOD



Fenton Reaksiyonu



Haber Weiss Reaksiyonu

O_2^\bullet , alkoksi radikalleri, tiyol radikalleri ve singlet oksijen gibi diğer organik radikallerin oluşumuna neden olmaktadır. O_2^\bullet , tek başına veya oluşturduğu radikaller aracılığıyla hasar yapabilmektedir (3,16).

O_2^\bullet , spesifik bir kanal bulunduğu hücre membranından geçebilme özelliğine sahiptir (9).

2- Singlet Oksijen (1O_2)

Moleküler oksijen spinleri aynı yönde olan paylaşılmamış iki elektron ihtiva eder. Bu elektronlardan birini daha yüksek enerjili bir orbitale kaydıran enerji absorpsiyonu söz konusu olduğunda, singlet oksijen oluşmaktadır (1, 9).

Moleküler oksijenden iki farklı singlet oksijen oluşur (1,10).

1) Delta singlet oksijen (Δ^1O_2)

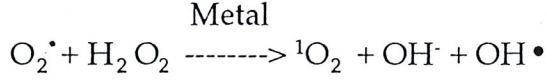
2) Sigma singlet oksijen (Σ^1O_2)

Delta singlet oksijende (Δ^1O_2), ortaklanmış elektronlar aynı orbitalde iken, sigma singlet oksijende (Σ^1O_2) spinleri zıt yönde olan elektronlar farklı orbitallerdedir (1). Δ^1O_2 biyolojik sistemlerde Σ^1O_2 den daha önemlidir. Paylaşılmamış elektronlara sahip olmadığı için bir radikal değildir. Σ^1O_2 herhangi bir molekülle reaksiyona girecek zamanı bulamadığından genellikle Δ^1O_2 formuna dönüşmektedir (9).

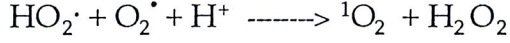
Singlet oksijen doymamış C-C bağlarıyla reaksiyona giren güçlü bir elektrofildir (1). Fazla enerjisini termal parçalanma, ışık emisyonu (eksite olmuş elektronların daha düşük enerji seviyesine düşmesiyle oluşur) veya kimyasal reaksiyon yoluyla dağıtmaktadır (10).

İn vivo şartlarda da singlet oksijen üretilebilir; bunları şöyle sıralayabiliriz (1,2,16,17):

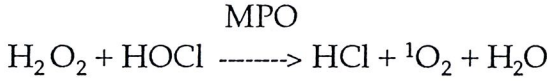
1) Haber-Weiss Reaksiyonu ile



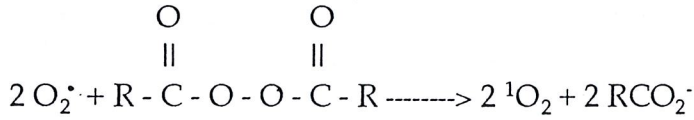
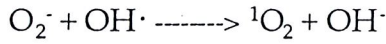
2) O_2^{\bullet} 'nun spontan dismutasyonu ile



3) Hipokloröz asit, H_2O_2 ile reaksiyona girerek ${}^1\text{O}_2$ oluşturur.



4) O_2^{\bullet} 'nin hidroksil radikali veya diaçil peroksitlerle reaksiyonundan açığa çıkar (1).

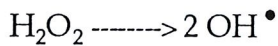


Retinal, klorofil flavinler veya porfirinler gibi çeşitli biyolojik pigmentlerin varlığında O_2 'nin $\Delta^1\text{O}_2$ durumuna eksitasyonu, memelilerin gözlerinde hem retina hem de lenste meydana gelmektedir (9).

Bir kısım ajanlar oksijeni zararsız hale getirmektedir. Bunlara örnek olarak β -karoten 1,4 diazobisiklo-(2,2,2)-oktan (DABCO), azid, bilirubin, histidin ve α - tokoferol sayılabilmektedir (10).

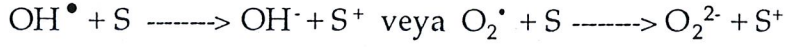
3- Hidroksil Radikali (OH^{\bullet})

Isı veya ionize radyasyon etkisiyle; H_2O_2 deki O-O bağının parçalanması iki hidroksil radikalinin oluşumuna neden olmaktadır (1).



H_2O_2 ile Fe (II) tuzu karışımı, OH^{\bullet} oluşumu ile sonuçlanır (1,9, 17).

3) Organik ve inorganik bileşiklerde elektron transfer tepkimelerine neden olur. Aynı etkiyi O_2^- de gösterir (1).

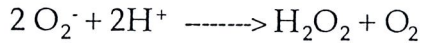


Canlı sistemlerde OH^\bullet oldukça reaktiftir. OH^\bullet 'nin membrandan geçişi söz konusu olmadığından, karşılaştığı anda ilk membran komponentiyle reaksiyona girmektedir. Çevresindeki herhangi bir biyolojik molekül ile reaksiyona girerek farklı reaktivitelerde sekonder radikallerin oluşumuna neden olmaktadır. Örneğin karbonat iyonu (CO_3^{2-}) ile reaksiyona girerek çok güçlü indirgeyici ajan olan karbonat ($CO_3^{\cdot-}$) radikallerinin oluşumuna neden olabilmektedir (9).

Etilendiamin tetraasetik asid (EDTA), gibi bazı şelatlayıcı ajanlar bu reaksiyonu stimüle etmektedir. Bu reaksiyon mannitol ve etanol gibi OH^\bullet koruyucuları tarafından inhibe edilirken, H_2O_2 tarafından stimule edilmektedir. Eğer reaksiyon O_2^- ve H_2O_2 üreten bir sistem tarafından indükleniyorsa (1) katalaz ve SOD tarafından inhibe edilir (10).

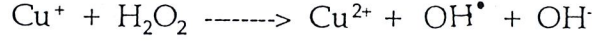
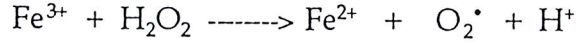
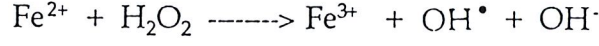
4- Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Oksijen iki elektron ve iki proton aldığı anda H_2O_2 oluşmaktadır.



H_2O_2 , ya O_2^- 'nin dismutasyonu ya da O_2^- 'nin aracılığı olmadan, oksijenin redüksiyonu ile meydana gelmektedir. Glukoz oksidaz oksijenden direkt olarak, ksantin oksidaz O_2^- 'nin dismutasyonu ile dolaylı olarak H_2O_2 oluşturmaktadır (3,10).

H_2O_2 , ileri reaksiyonlarda son derece reaktif olan OH^\bullet , O_2^\bullet ve OH^- oluşumuna yol açar (2,9,17).



H_2O_2 , katalaz ve glutatyon peroksidaz (GSH-P_x) tarafından katabolize edilerek H_2O ve O_2 'e kadar yıkılmaktadır (18).

H_2O_2 bütün hücre membranlarından geçebilmektedir (9).

2.2. LİPİD PEROKSİDASYONU VE MEKANİZMASI

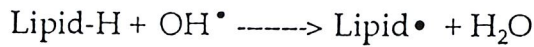
Lipid peroksidasyonu (LP), membranda bulunan poliansatüre yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri gibi çeşitli ürünlere yıkılma reaksiyonudur (2,9,19).

Ekzojen faktörlerden; ısı, ağır eksersiz, enflamasyon, radyasyon, hava kirliliği, sigara, pestisitler, çeşitli karsinojenler, asbest, fenobarbital, bazı kanser ilaçları, hücre hasarını başlatmaktadır (20).

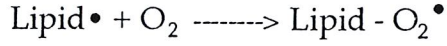
Süperoksit radikalleri, başta sistein, triptofan ve tirozin olmak üzere bütün amino asitlerle; perhidroksi radikali ise, O_2^\bullet 'den daha etkili olarak sistein başta olmak üzere bütün amino asitlerle tepkimeye girerler. Buna rağmen bu iki radikalın amino asitlerle tepkimesi, hidroksil radikalinden 10^6 - 10^9 kez daha yavaştır (1).

O_2^\bullet , HO_2^\bullet radikalleri ile H_2O_2 'in biyolojik moleküllerle tepkimelerinin yavaş olması nedeniyle, radikallerin gözlenen toksik etkisinin $^1\text{O}_2$ ve OH^\bullet den kaynaklandığı kabul edilmektedir (1).

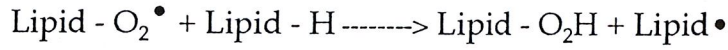
Radikal olmayan bir molekülle, bir radikal reaksiyona girdiğinde, başka bir serbest radikal üretilmekte ve bu olay LP zincir reaksiyonunu başlatmaktadır (9,15):



Hidrojen atomunun zincirden çıkarılması, karbon atomu üzerinde eşleşmemiş bir elektron bıraktığından, karbon merkezli radikal oluşumuna yol açar. Aerobik hücrelerde en sık görülen olay, bu radikalın moleküler düzenleme ile konjuge dien şekline çevrildikten sonra, moleküler oksijenle reaksiyona girerek peroksi radikalini üretmesidir (2,9).

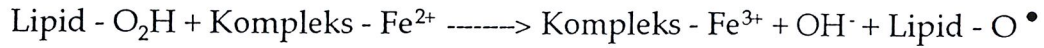


Peroksi radikali diğer bir peroksi radikaliyle birleşebilir veya peroksi radikali membrandaki komşu yan zincirlerden hidrojen atomlarını çıkararak peroksidatif zincir reaksiyonunu yayabilir ve yeni bir peroksi radikali oluşturulabilir (9,16,17).

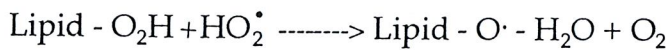
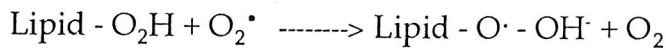
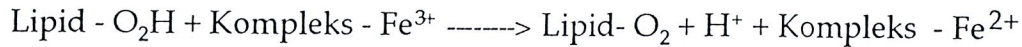


Lipid hidroperoksitleri, alkoksi ve peroksi radikalleri membrandaki lipid peroksidasyonunun artmasına katkıda bulunmaktadır (9) (Şekil 2).

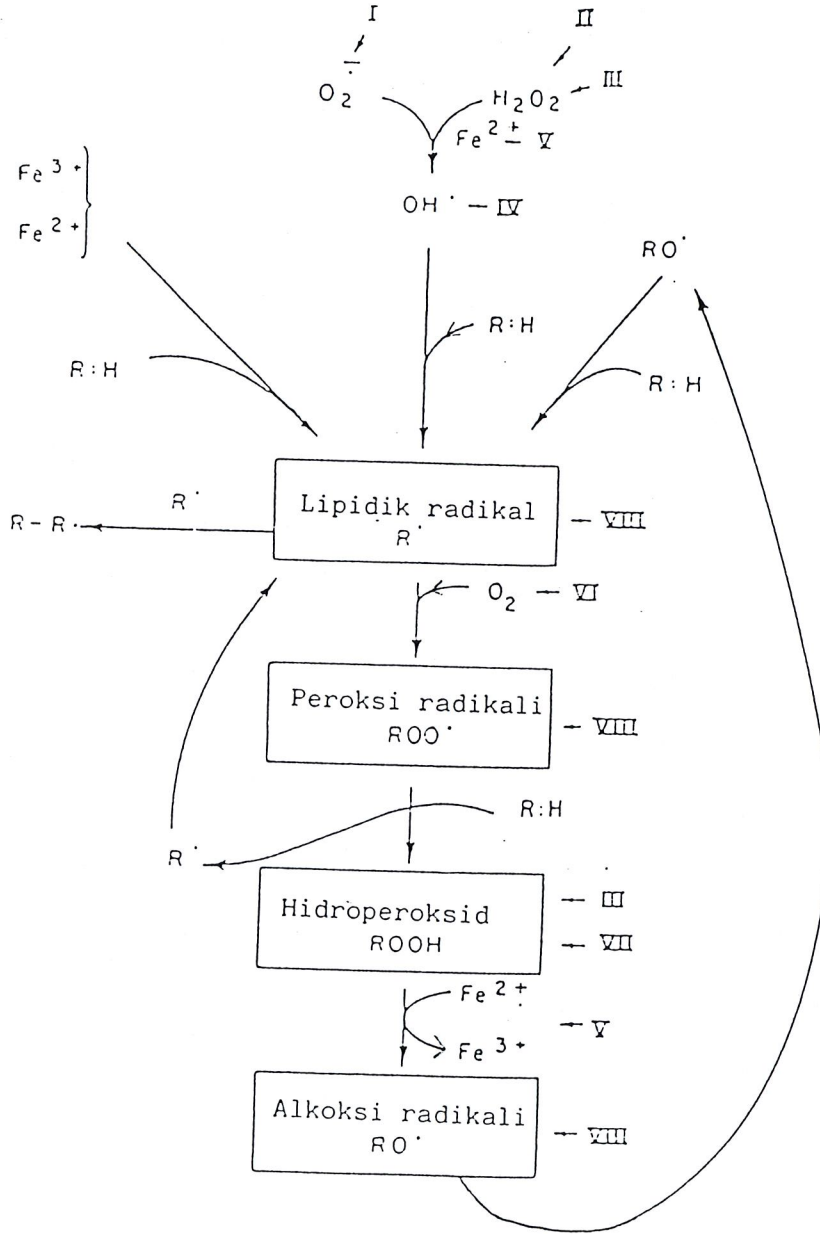
Demir ve bakır iyonları ya da bu iyonların fosfat esterleriyle oluşturduğu basit kelatları (Fe^{2+} - ADP), hem, hemoglobin ve miyoglobini de içeren demir proteinleri, lipid hidro peroksitlerini bozarak, reaksiyonu sonlandırmaktadır (2,9).



Demir III ile peroksit radikalinin oluşturduğu reaksiyon;



Bu kompleks bozunma reaksiyonlarının ürünleri etan, pentan gibi hidrokarbon gazları ROOH, RCOOH, ROH ve RCHO gruplarını içeren kısa zincirli yağ asitleridir (17).



Şekil 2. Poliansatüre yağ asitlerinin otooksidasyon döngüsü ve koruyucu bileşikler. (17).

- I. Süperoksit dismutaz (SOD)
- II. Katalaz
- III. Glutatyon Peroksidaz (GSH-P_x)
- IV. Ürik asit, ginkgo biloba ekstraktı, vitamin E ve P
- V. Ginkgo biloba ekstraktı, vitamin P, serüloplazmin
- VI, VII ve VIII: Vitamin E

Serbest radikallerin indüklediği LP sonucu hücre organelleri ve zarlarında, bu zarlarda bulunan enzimlerde önemli zararlar meydana gelir (1,21).

Membrandaki yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan kısa zincirli yağ asitleri ve triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin ve sistein gibi amino asitleri içeren yapısal proteinlerin oksidasyonu, membran permeabilitesinin artmasına ve membrandaki akışkanlığın azalmasına neden olmaktadır (2).

Eritrosit membranında fosfolipidlerin yapısında bulunan poliansatüre yağ asitlerinin allilik hidrojenleri, azalmış bağ dissosiyasyon enerjisinden dolayı, oksidatif hasara karşı özellikle duyarlıdır (1,16). Serbest radikaller peroksidasyonun yanı sıra, membran bütünlüğünün bozulmasına, eritrosit enzimlerinin inaktivasyonuna ve hemoglobin molekülünün denatürasyonuna neden olmaktadır (2,17,22). Böylece oksidatif hasar, eritrositlerde defekti indüklemekte, hemolitik hastalıklara ve yaşlanmaya iştirak etmektedir (2,16,23).

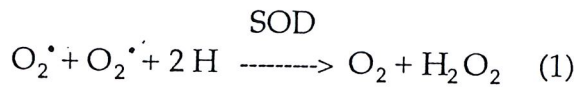
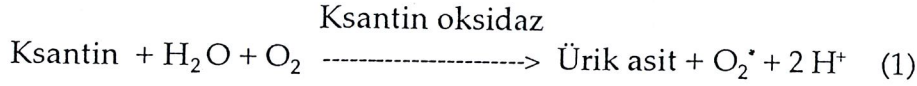
Yapılan çalışmalarda serbest oksijen radikallerinin kalp hastalıkları, kanser, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, serebrovasküler hastalıklar, nörosensoryel bozukluklar, katarakt ve romatoid artrit gibi sayısız hastalıkta rol oynadığı gösterilmiştir (7,24).

2.3. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD)

Solunum yapan bütün hücrelerde bulunan ve oksijen radikallerinin (O₂) dismutasyonunu katalizleyerek onların zararlı etkilerine karşı hücreyi koru-

yan bir enzimdir (EC: 1.15.1.1) (1,7,13,25).

O_2^- anyonu tüm aerobik hücrelerde oluşmaktadır (9). Biyolojik sistemlerde ksantin oksidaz enzimi tarafından ksantin'in aerobik oksidasyonu sonucu süperoksit radikalleri (O_2^{\bullet}) açığa çıkmaktadır bu radikaller ferri-sitokrom-c ve nitroblue tetrazolium gibi bileşikler redüklemektedir (1,13).



SOD enziminin katalizlediği bu reaksiyon enzimin olmaması halinde bile hızla ilerler. Genelde enzim aerobik hücrelerin yaşayabilmesi için gereklidir. Enzim oksijen toksisitesinin önemli bir ajanı olarak görülen süperoksit radikallerini yakalar, böylece oksijen toksisitesinin bu özelliğine karşı savunucu bir rol oynar (13,26).

SÜPEROKSİT DİSMUTAZ TİPLERİ

Canlılardaki süperoksit dismutaz tipleri, kofaktör olarak taşıdıkları metal iyonlarına göre üç sınıfa ayrılır (1);

a) Cu ve Zn İçeren SOD

Ökaryotik hücrelerin sitoplazmalarında bulunur (27). Molekül ağırlığı 32.000 dalton civarındadır. Disülfid bağı ile bağlanmış ve birbirinin aynı olan iki alt üniteden oluşan enzim, her bir alt ünitesinde birer atom (Cu^{2+}) ve (Zn^{2+}) içermektedir (1,13,28).

Mantarlar, bitkiler, kuşlar ve memelilerden elde edilen enzimler, amino asit bileşimlerindeki ve elektron spin rezonans spektralarının ayrıntılarındaki önemsiz farklar haricinde, birbirinden pek farklı değildir (13).

Enzim aktivitesi için Cu^{2+} mutlaka gereklidir, fakat Zn^{2+} yerine Cu^{2+} , Hg^{2+} veya Cd^{2+} geçebilir ve herhangi bir aktivite kaybı olmaz (1,13).

Eritrositlerde Cu, Zn SOD'nin aktivitesi spesifik olarak Down sendromu ve üremi de artmaktadır. Serum Cu, Zn SOD'nin ise böbrek yetmezliği ve karaciğer hastalıklarında arttığı bildirilmiştir. Bununla birlikte Fankoni anemisi, orak hücreli anemi, Duchene tipi kas antrofisi ve idyopatik pulmoner hemosideroziste eritrositlerde Cu, Zn SOD aktivitesi düşük bulunmuştur (27).

b) Mn İçeren Süperoksit Dismutaz

Mn içeren süperoksit dismutaz öncelikle mitokondride bulunur (27).

E.Coli ve Streptococcus Mutans'dan elde edilen SOD, katalitik aktivitesi dışında, ökaryotik hücrelerin sitozollerinde bulunan Cu-Zn SOD'dan tamamen farklıdır. Bu bakteriyel enzim eşit büyüklükte iki alt üniteden oluşur ve her alt ünite başına bir atom Mn ihtiva eden bir dimerdir. Molekül ağırlığı 40.000 civarındadır (1,27). Mitokondrial ve bakterial enzim birbirine çok benzerken, mitokondrial ve sitoplazmik enzim arasında hiçbir benzerlik yoktur. Bu durum mitokondrilerin bakterial kökenli olduğunu açıklayan teorileri desteklemektedir (1,29,30).

Alkolik karaciğer hastalığında plazmada Mn SOD yüksek, Cu, Zn SOD aktivitesi düşük bulunmuştur (27).

Ankilozan spondilitte Cu, Zn SOD önemli ölçüde artmakla birlikte, polimorf nüveli lokositlerde Mn SOD aktivitesi düşmektedir. Romatoid artritte de Mn SOD ve total SOD aktivitesi düşük bulunmuştur (27).

c) Fe İçeren Süperoksit Dismutaz

Bazı bakteriler birden fazla SOD içerirler. Bunlardan biri, bütün prokaryotlarda bulunan Mn SOD olup, sitoplazmada bulunur. Bazı bakteriler örneğin, E.Coli B demir içeren bir SOD bulundurlar (1).

Her molekül başına bir atom demir ihtiva eden Fe-SOD'ın molekül ağırlığı 38.700'dür ve eşit ağırlıkta iki alt üiteden oluşmuştur (31).

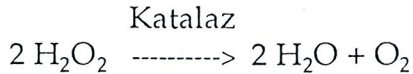
Demir eksikliği bulunan bir ortamda büyüyen E.Colinin Fe-SOD aktivitesi düşüktür. Mn-SOD aktivitesi ise yüksektir ve fotokimyasal veya enzimatik olarak üretilen O_2^\bullet 'nin ekzojen hasarları ile hücreler ölürler. Demirce zengin ortamda büyüyen E.coli ise yüksek oranda demir enzimi ve düşük düzeyde mangano enzim içerir, mangano enzimin ekzojen radikallere karşı etkisi sınırlıdır (1,32).

Sonuç olarak periplazmik aralıkta bulunan Fe-SOD, ekzojen kaynaklı oksijen radikallere karşı koruyucu olarak rol alırken, hücrelerin matriksinde bulunan Mn-SOD endojen kaynaklı oksijen radikallerinin toksisitesine karşı etkilidir ve Mn-SOD düzeyi yüksek olan E.coli, fagositoza karşı dirençlidir (1,32).

2.4. KATALAZ

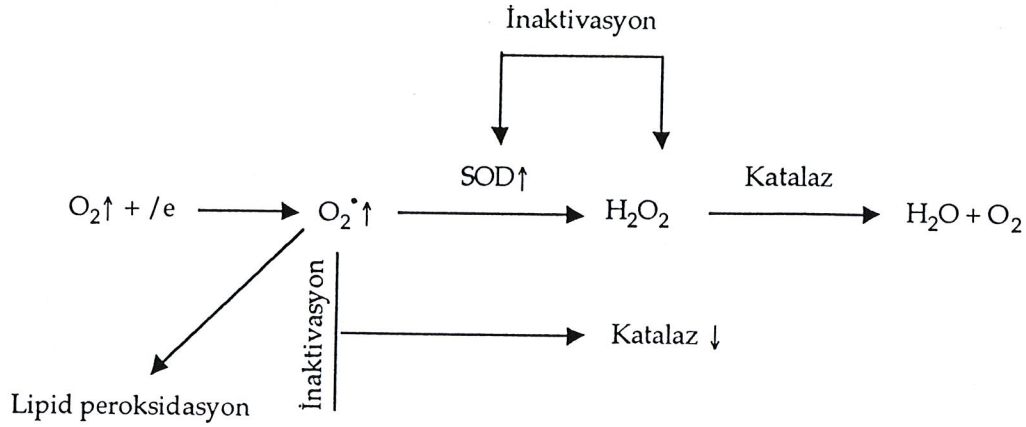
Aerobik canlıların bütün doku, hücre ve hücre organelleri, katalaz içerir. Katalaz, canlılarda bulunan en aktif enzimlerden biri olup canlılarda koruyucu fonksiyon görür (1).

Katalaz, "hem" ihtiva eden bir enzimdir. Mol başına 4 atom gram demir içeren enzim, H_2O_2 'in su ve oksijene dönüşümünü katalizleyerek oksidatif hasara karşı hücreyi korur (11,33,34).



Katalazın, karbonhidrat içeriğini belirlemek amacıyla yapılan analizlerde, % 8.3 nötr şeker ve % 1.9 oranında glukozamin içeren bir glikoprotein olduğu ve molekül ağırlığının 385.000 dalton olduğu gösterilmiştir (35).

O_2^{\bullet} tarafından, $GSH-P_x$ ve katalaz inaktive edilmektedir. SOD, O_2^{\bullet} 'nu ortadan kaldırarak, bu enzimleri korumaktadır. Katalaz ve $GSH-P_x$ da H_2O_2 'i detoksifiye ederek, SOD'i, H_2O_2 'in inaktive edici etkisinden kurtarmaktadır (36).



Şekil 3. Katalazın inaktivasyon mekanizması (3,36)

Fagositlerin oksijene bağımlı antimikrobiyal aktivitelerinde; katalaz, SOD ve $GSH-P_x$ rol almaktadırlar. Fagositoz esnasında fazla miktarda üretilen serbest radikaller mikro organizmaları ve diğer yabancı hücreleri yıkmak için harekete geçerler. Serbest radikaller nadiren vücudun kendi hücrelerini de yıkarak hastalıkların patogenezinde rol oynarlar (1,10)

2.5. GİNKGO BİLOBA EKSTRESİ

Ginkgo biloba yaprakları "*fosil ağaçlar*" olarak isimlendirilen Ginkgoaceae ailesinin tek temsilcisidir ve 1710 yılında Çin'den Avrupa'ya E. Kaemper tarafından getirilmiştir (37).

Günümüzde, serbest radikal toplayıcı olarak önerilen farmakolojik ajanlardan biri de Ginkgo biloba ekstresidir (7,22)

Yaklaşık 5000 yıl önce Çin eczacılığında yer alan Ginkgo bilobanın yapraklarından elde edilen ekstreler (38), yüzyıllardır terapatik amaçla kullanılmakta ve 1965'den bu yana da standardize edilmiş ticari preparatlar hazırlanmaktadır (22,38).

Standardize Ginkgo biloba ekstresi, EGb 761, % 24 oranında ginkgo-flavoglikozidleri (kaemferol, quercetin, izorhamnetin) ve % 6 oranında terpenoidleri (ginkgolid A,B,C ve bilobalid) içeren kompleks bir üründür (7,8). Ginkgo biloba ekstresindeki aktif bileşeklerin hepsi, çeşitli derecelerde EGb 761'in farmakolojik etkilerine katılmaktadır. İn vivo ve in vitro çalışmalar, EGb 761'in antioksidan etkiye sahip olduğunu ve serbest radikal tutucu aktivitesinin bulunduğunu göstermektedir (22,38,39).

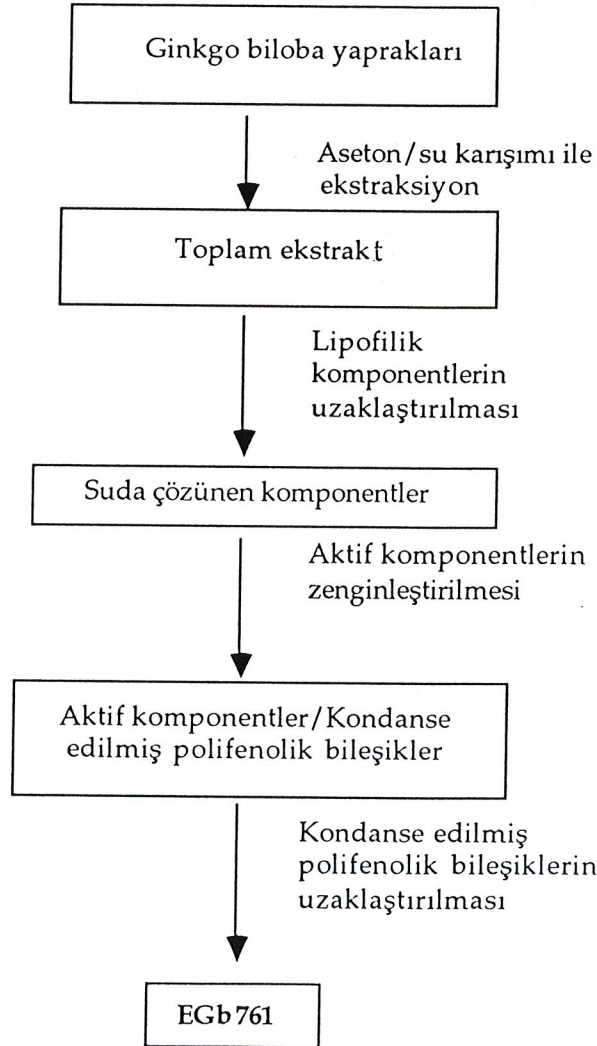
EGb 761'in ratların beyninde ve karaciğer mikrozoamlarında lipid peroksid oluşumunu inhide ettiği, gene ratlarda retinayı lipid peroksidasyonuna karşı koruduğu, reperfüzyon hasarını önlediği bildirilmiştir. İnsanlarda karaciğer mikrozoamlarında siklosporin A ile in vitro olarak indüklenen lipid peroksidasyonunun ve solubl bir agonistle uyarılan nötrofillerden serbest oksijen radikal salınımının, Ginkgo biloba ekstresi tarafından konsantrasyona bağlı olarak önlendiği gösterilmiştir (22).

EGb 761'in suda eriyen antioksidanların (askorbik asit, ürik asit ve redukte glutatyon) ve yağda eriyebilen antioksidanların (α -tokoferol, retinol asetat) eritrosit membranlarında hidrojen peroksitle indüklenen lipid peroksidasyonu üzerindeki etkileri karşılaştırıldığında EGb 761'in suda eriyen antioksidanlardan daha etkili ve yağda eriyen antioksidanların gücü ile eşdeğer olduğu gösterilmiştir (5).

Bruel ve arkadaşları; Domuz aortasından elde edilen kültürü yapılmış düz kas hücrelerinde, EGb 761'in glukoz kullanımı ve glikojen sentezine etkilerini şu şekilde açıklamaktadırlar; Ginkgo biloba ekstresi, glukoz transportunu doza bağlı olarak uyardır. EGb 761'in konsantrasyonu 0.25 $\mu\text{g/ml}$ olduğunda maksimum etkiye ulaşmaktadır, bu da bazal aktivitede % 35 \pm 4

üzerinde bir artışa yol açmaktadır. Bunun yanında EGb 761'in glikojen sentezine etkisi ise; hücre içine alınan karbon 14'lü glukozun, glikojen haline geçmesiyle gösterilmiştir ve bu durum EGb 761 tarafından artırılmıştır. EGb 761'in 0,25 µg/ml konsantrasyonunda bazal aktivite % 41±4 üzerinde bir artış gösterir (40).

EGb 761'in elde edilişi aşağıdaki şemada gösterilmiştir.



Şekil 4. Ginkgo biloba yapraklarından EGb 761'in hazırlanma şeması (40,41)

3. MATERYAL VE METOD

3.1. MATERYAL

Biyokimyasal ölçümlerde Merck ve Sigma marka analitik saflıkta kimyasal maddeler kullanıldı.

Deneylerde spektrofometre (Spektronik 21 ve Bauschlomb Spektronik 21) santrifüj (Nüve), soğutmalı santrifüj (Sigma), hassas terazi (Sartorius), magnetik ve mekanik karıştırıcılar (Elektromag), pH metre (Backman 3500), Vorteks cihazı (Nüve mix-Nüve), su banyosu (Kotterman), otomatik pipetler (Biohit), cam pipetler, polipropilen tüpler ve cam malzemeler (Tüp, beher ve balon jöjeler) kullanıldı.

Kullanılan cam malzemelerin hepsi (tüp, pipet, balon jöje, beher) de iyonize su ile yıkandıktan sonra 1 gün % 20'lik HNO₃ içinde bekletildi. Daha sonra 3 defa de iyonize su ile yıkanarak demineralize edildi.

Çözeltiler deiyonize su ile hazırlandı, dayanıklılık süresi sınırlı olan çözeltiler, belli aralıklarla yenilendi.

Çalışmada kullanılmak üzere, serbest piyasadan (Abdi İlâç Sanayi ve Ticaret AŞ) 100 ml'sinde 4.0 g Ginkgo biloba yaprakları kuru ekstresini içeren ve 9.6 mg Ginkgo flavoglikozid/ml olacak şekilde standardize edilmiş bir preparat (EGb 761, Teboka fort) seçildi.

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Kan Bankasına ve Kızılay Dispanserine müracaat eden hiçbir rahatsızlığı bulunmayan 44 kişiden alınan heparinli (5 Ü Lityum-heparin/ml) kan örnekleri çalışmamızın materyalini oluşturdu.

3.2. METOD

Sağlıklı kişilerden alınan heparinize kan örnekleri 4 °C'de 15 dakika 1500 rpm'de santrifüj edildi.

Plazmanın ayrılmasıyla elde edilen eritrosit süspansiyonları eşit hacimde soğuk 154 mM NaCl ile yıkanarak 4 °C'de santrifüj edildi. Yıkama işlemi 3-4 kez tekrarlandı.

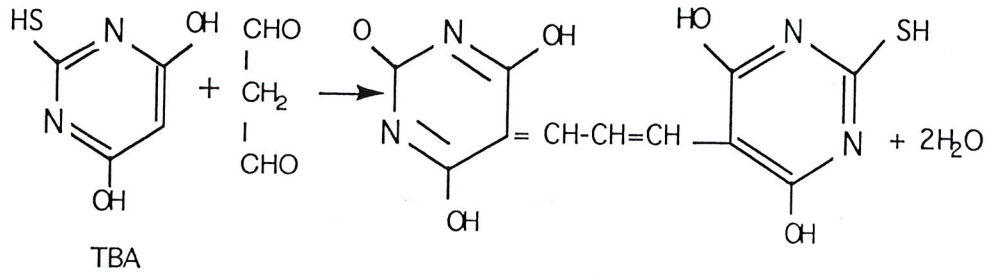
Yıkanmış eritrosit süspansiyonları; lipid peroksidasyonu deneylerinde fosfat tamponlu salin (PBS-azid, 0.015 M PH:7.4) ile, SOD aktivitesi tayininde, 154 mM NaCl ile katalaz aktivitesi tayininde PBS (0.05 M pH: 7.0) ile eski hacmine tamamlanarak siyanomethemoglobin metodu ile hemoglobin (Hb) (26) ölçümü yapıldı. Daha sonra eritrosit süspansiyonları ilgili tayin yöntemlerinde belirtildiği şekilde aynı çözeltilerle dilüe edildi.

30 sağlıklı kişiden elde edilen dilue eritrosit süspansiyonları 3 gruba ayrıldı. I.grupta (n = 10) EGb 761 varlığında ve yokluğunda, eritrositlerde t-butil hidroperoksit ile indüklenen lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak MDA ölçümü yapıldı. II. (n = 10) ve III. (n = 10) gruplarda, indüksiyon yapılmaksızın EGb 761 varlığında ve yokluğunda, sırasıyla SOD ve katalaz aktivitesi tayin edildi.

3.2.1. LİPİD PEROKSİDASYONU TAYİNİ

Bu çalışma STOCKS ve DORMANDY (4) tarafından geliştirilen, JAİN (23) tarafından modifiye edilen, lipid peroksidasyonu tayin metodu kullanıldı.

Metodun temel prensibi, lipid peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehitin (MDA), tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek, 532 nm'de maksimum absorpsiyon veren bir kompleks oluşturması esasına dayanır (23).



Şekil 5. TBA ile Malondialdehit birleşmesi sonucu açığa çıkan renkli kompleks (27)

ÇÖZELTİLER

1) Fosfat tamponlu salin (PBS): 15 mM, 4.02 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ve 2.34 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ tartılıp 1000 ml 154 mM NaCl ihtiva eden distile suda çözülür. pH: 7.4'e ayarlanır. Ayrıca bu tamponun bir kısmına 10^{-3} M konsantrasyonda olacak şekilde sodyum-azid eklenir (PBS-azid).

2) % 30 (TCA) Trikloroasetik asit

3) 0.1 M (EDTA) Etilen diamin tetra asetik asit

4) % 1 (TBA) Tiyobarbitürik asit 0.05 N NaOH içinde hazırlanır.

5) 5.848 M Malondialdehid bis (dimetil asetal) standart solüsyonu.

ÇALIŞMA

Yıkanmış Eritrosit Süspansiyonlarının Çalışmaya Hazırlanması

Lipid peroksidasyonu tayininde kullanılan eritrosit süspansiyonları 8.25 mg/ml Hb olacak şekilde PBS-azid ile dilüe edilerek iki deney tüpü hazırlandı.

Hazırlanan eritrosit süspansiyonu içeren deney tüpüne deney ortamında ml'sinde 250 µg/ml konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanan Ginkgo biloba ekstresinden 1.0 ml ilave edildi. Kontrol olarak 5.0 ml eritrosit süspansiyonu ve 1.0 ml PBS-azid karışımı kullanıldı. Kör olarak 5.0 ml PBS-azid ve ml'sinde 250 µg/ml konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanan EGb 761'den 1.0 ml ilave edildi.

Hazırlanan karışımlar 1 saat 37 °C'de inkübe edildi. Sonra, lipid peroksidasyonunu indüklemek amacıyla her bir tüpe 5.0 ml 20 mM t. Butilhidroperoksit ilave edilerek zamana karşı oluşan lipid peroksidasyonunun miktarını incelemek amacıyla karışımlar 37 °C'de 15, 30, 45, 60 ve 90 dakika süreyle bekletildi. Bu sürelerin sonunda her bir tüpten alınan örneklerde MDA ölçümü yapıldı.

Hazırlanan Örneklerde MDA Tayini

<u>İnkübasyon Karışımları</u>	<u>Numune</u>	<u>Kontrol</u>	Numune Kontrol	
			<u>Kör</u>	<u>Kör</u>
PBS-azid	-	-	-	0.6 ml
250 µg/ml EGb 761 içeren Eritrosit Süspansiyonu	0.6 ml	-	-	-
Eritrosit Süspansiyonu + PBS-azid	-	0.6 ml	-	-
250 µg/ml EGb 761 içeren PBS-azid	-	-	0.6 ml	-
Fosfat tamponlu Salin	2.4 ml	2.4 ml	2.4 ml	2.4 ml
% 30 T.C.A.	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml

Tüpler karıştırıldı ve 2 saat buz banyosunda inkübe edildi. 2000 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatantların 3 ml'si ağzı kapaklı tüplere aktarıldı.

dı. Üzerlerine sırasıyla 0.225 ml EDTA ve 0.75 ml TBA pipetlenerek 15 dakika su banyosunda kaynatıldı. Tüpler soğuduktan sonra 532 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu. MDA değerleri standart eğriden faydalanılarak hesaplandı ve nmol MDA/g Hb şeklinde verildi.

Standart Serinin Hazırlanması

Sırasıyla 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 1.0 n mol/ml MDA konsantrasyonlarında standart seri hazırlandı. Her bir standart çözeltiden 0.6 ml alınarak numune gibi çalışıldı, standart eğri çizildi (Şekil 6).

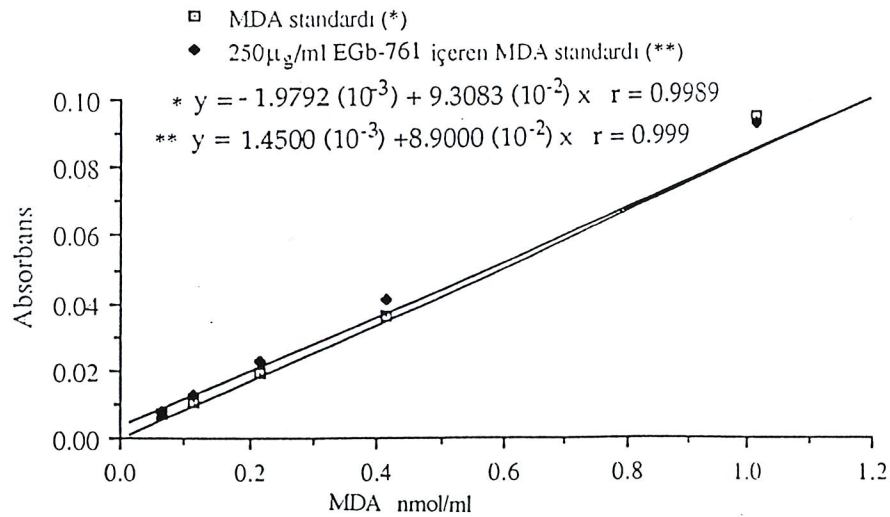
0.05, 0.1 0.2, 0.4, 1.0 nmol/ml MDA bulunan ortamda 250 µg/ml EGb761 eklenerek standart eğri çizildi (Şekil 6).

Bu yöntemin C.V. değeri % 4.3 olarak bulundu.

Lipid Peroksidasyonu (nmol MDA/g Hb)

n	$\bar{X} \pm SX$	SD	C.V. (%)
10	118,3 ± 1.6	5.1	4.3

$n = \text{Deney sayısı}$

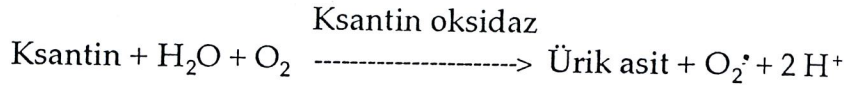


Şekil 6. Lipid peroksidasyonunda kullanılan MDA standart eğrisi

3.2.2. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ (27)

Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivitesi ölçümünde Lİ, OBERLEY ve SUN tarafından geliştirilen metot kullanıldı.

Süperoksit üreticisi olarak ksantin-ksantin oksidaz sisteminin kullanılması ve nitroblue tetrazolium (NBT) redüksiyonunun SOD tarafından inhibe edilmesi esasına dayanır.



Burada NBT redüksiyonuyla oluşan ürün, süperoksit anyonunu bir göstergesi olarak, 560 nm dalga boyunda maksimum absorbans veren bir renk ortaya çıkarmaktadır (7,27). NBT'nin redüksiyonuyla oluşan renk şiddetindeki azalma spektrofotometrik olarak ölçülerek, ksantin oksidaz reaksiyonunun inhibisyonunun derecesine bağlı olarak, SOD aktivitesi tayin edilmiştir.

ÇÖZELTİLER

1. 0.3 mmol/L Ksantin
2. 150 μ mol/L Nitro Blue Tetrazolium (NBT)
3. 1 g/L Bovin Serum Albümin (BSA)
4. 0.6 mmol/L EDTA
5. 400 mmol/L Na_2CO_3
6. 2 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
7. 0.8 mmol/L CuCl_2
8. Ksantin oksidaz: 2 mol/L + 4 °C soğutulmuş Amonyum sülfat çözeltisi içinde kullanmadan hemen önce hazırlandı. Ksantin oksidaz çözeltisinin son konsantrasyonu 167 Ü/L'dir.
9. Kloroform
10. Etanol.

CuCl_2 , NH_4SO_4 ve ksantin oksidaz çözeltileri hariç diğer çözeltilerden bir karışım hazırlandı. 40 numunelik bir çalışma için karışımın içeriği aşağıda gösterilmiştir:

40 ml	0.3 m mol/L	Ksantin
20 ml	0.6 m mol/L	EDTA
20 ml	150 μ mol/L	NBT
12 ml	400 m mol/L	Na_2CO_3
6 ml	1.0 g/L	BSA

ÇALIŞMA

Eritrosit Süspansiyonlarının Çalışmaya Hazırlanması

SOD tayininde, kullanılan eritrosit süspansiyonları 4.5 mg/ml Hb. olacak şekilde 154 mM NaCl ile dilüe edilerek hazırlandı.

Hazırlanan eritrosit süspansiyonu, eşit hacimde ikiye bölünerek ayrı tüplere pipetlendi.

5.0 ml eritrosit süspansiyonu içeren deney tüpüne deney ortamında ml'sinde 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanan Ginkgo biloba ekstresinden 1.0 ml ilave edildi. Kontrol olarak; 5.0 ml eritrosit süspansiyonuna (4.5 mg/ml), 1.0 ml 154 mM NaCl ilave edilen karışım kullanıldı.

Standart Serinin Hazırlanması

Domuz eritrositlerinden elde edilmiş Cu-Zn SOD'den 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonda stok çözelti hazırlandı. Daha sonra ana stoktan hazırlanan 500 ng/ml ara stok çözeltilerden sırasıyla 15, 30, 60, 90, 150, 270 ng/ml, Cu-Zn SOD içeren standart seri hazırlandı. Bütün dilüsyonlarda tridistile deiyonize su kullanıldı.

Hazırlanan Numunelerin Çalışılması

Belirli zaman aralıklarıyla yapılan inkübasyon süresinde oluşan SOD aktivitesinin değişimini incelemek amacıyla; karışımlar 37 °C'de 0, 30, 60, 90 ve 120 dakika inkübe edilerek, her inkübasyon zaman aralığının bitiminde, 0.1 ml eritrosit süspansiyonu üzerine 0.9 ml + 4 °C buzlu distile su eklendi. Daha sonra bu 1 ml diluent üzerine sırasıyla 0.3 ml kloroform ve 0.5 ml etanol eklenerek yaklaşık 1 dakika vorteksle karıştırıldı. Elde edilen Lizat 18.000 Xg'de 1 saat santrifüj edildikten sonra 0.1 ml süpernatant bir başka tüpe aktarıldı ve 10 ml'ye distile su ile tamamlanarak kullanıldı.

Deney tüpüne 2.45 ml karışım pipetlendi. Daha sonra üzerine 0.5 ml dilüe edilmiş süpernatant eklenerek su banyosunda 25 °C'ye ısıtıldı. Kör tüpüne süpernatant yerine 0.5 ml distile su, ve diğer çözeltiler pipetlendi. 25 °C ısıtılan her bir tüpe eşit zaman aralıklarıyla 50 µl taze hazırlanmış ksantin oksidaz çözeltisi eklendi ve tüpler 20 dakika inkübe edildi. Inkübasyon sonunda yine aynı zaman aralıklarında tüplere 1 ml 0.8 mmol/L CuCl₂ eklenerek reaksiyon durduruldu. Oluşan renk şiddeti, 560 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okundu.

Standart seri de numuneler gibi çalışıldı ve aşağıdaki formülü kullanarak standart ve numunelerin yüzde inhibisyon değerleri hesaplandı.

Hesaplama:

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(A \text{ kör} - A \text{ numune})}{A \text{ kör}} \times 100$$

Buradan hesaplanan % inhibisyon değerine karşılık gelen enzim konsantrasyonları kullanarak ksantin-ksantin oksidaz sisteminde Cu-Zn SOD etkisiyle NBT redüksiyonunun inhibisyon grafiği çizildi (Şekil 7). Daha sonra doğrusal grafik elde edebilmek için yüzde inhibisyon değerine karşı log Cu-Zn SOD grafiği çizildi (Şekil 8).

Numuneler için de aynı formülle yüzde inhibisyon değeri hesaplanarak Cu-Zn SOD miktarları standart eğriye göre değerlendirildi ve zamana karşı oluşan Cu-Zn SOD % inhibisyon grafiği çizildi.

NBT redüksiyon hızını % 50 inhibe eden 90 ng/ml SOD 1 ünite olarak tanımlandı ve her bir numune için ünite cinsinden Cu-Zn SOD miktarı hesaplandı.

1 Ünite Cu-Zn SOD % 50 inhibisyon

X Ünite Cu-Zn SOD % A inhibisyon

$$X = \frac{A}{0.50} \times \text{Dilüsyon faktörü}$$

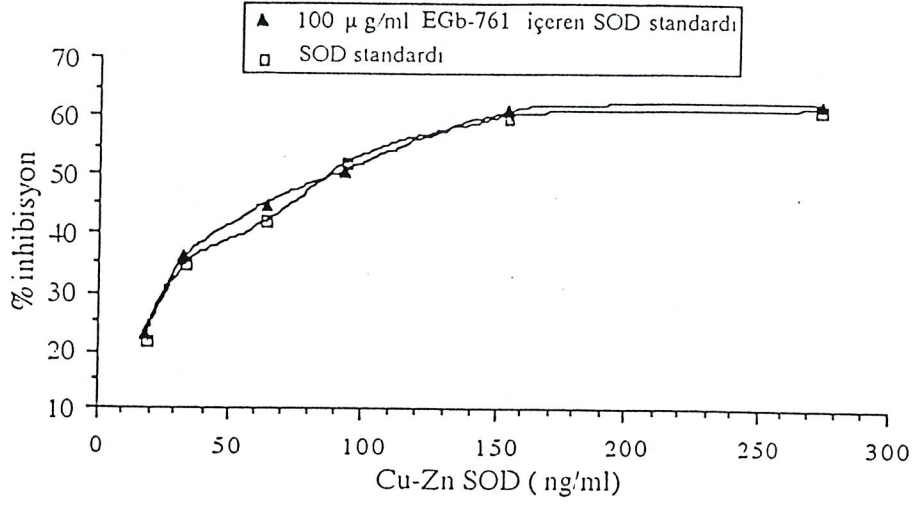
100 µg/ml EGb 761'in 15, 30, 60, 90, 150, 270 ng/ml, Cu-Zn SOD içeren ortamda standart eğri üzerindeki etkisi incelendi (Şekil 7).

Sonuçlar spesifik aktivite olarak eritrositlerde Ü/g Hb cinsinden verildi. SOD tayininde kullandığımız bu yöntemin C.V. değeri % 3.2 olarak bulundu.

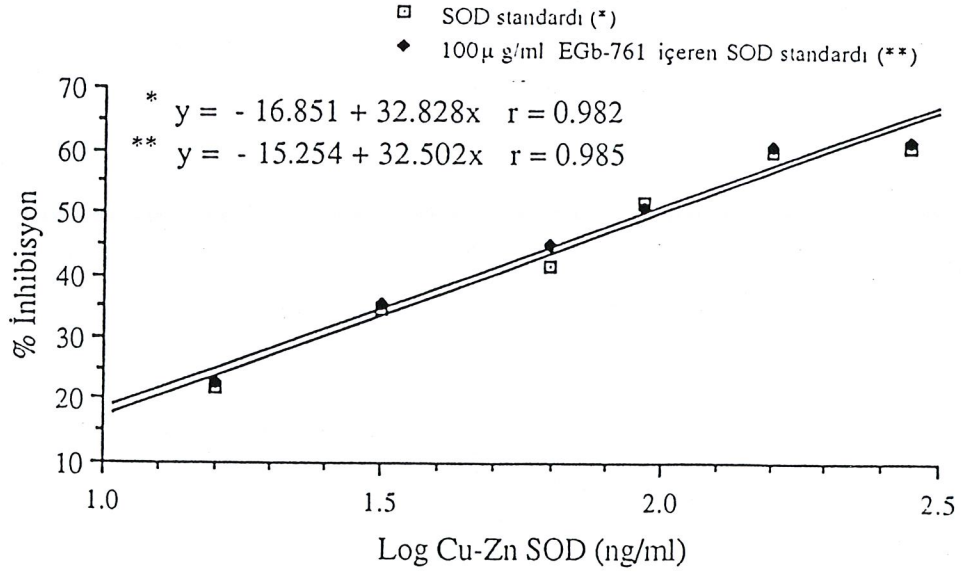
Süperoksit Dismutaz (Ü/g Hb)

n	X ± SX	SD	C.V. (%)
10	194.61 ± 1.98	6.25	3.2

n= Deney sayısı



Şekil 7. Ksantin-ksantin oksidaz sisteminde Cu-Zn SOD ile NBT redüksiyonunun standard inhibisyon grafiği



Şekil 8. Yüzde inhibisyona karşı Log Cu-Zn SOD konsantrasyonu grafiği

3.2.3. KATALAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ (35)

Yöntem, H_2O_2 'in katalaz tarafından O_2 ve H_2O 'ya parçalanması esnasında reaksiyon karışımında absorbanans değişiminin ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

ÇÖZELTİLER

- 1) % 0.18 H_2O_2 (0.05 M pH: 7.0 fosfat tamponu içinde hazırlandı.)
- 2) 0.05 M Fosfat tamponu (pH: 7.0)

ÇALIŞMA

Eritrosit Süspansiyonlarının Çalışmaya Hazırlanması

Katalaz aktivitesi tayininde kullanılan yıkanmış eritrosit süspansiyonları 4.5 mg/ml Hb olacak şekilde, 10 ml'ye 0.05 M fosfat tamponu (pH: 7.0) ile dilüe edilerek hazırlandı. 10 ml eritrosit süspansiyonu eşit hacimde ikiye bölündü.

5.0 ml eritrosit süspansiyonu içeren deney tüpüne deney ortamında ml'sinde 100 μ g/ml konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanan Ginkgo biloba ekstresinden 1.0 ml ilave edildi. Kontrol olarak; 5.0 ml eritrosit süspansiyonuna (4.5 mg/ml), 1.0 ml 0.05 M fosfat tamponu (pH: 7.0) ilave edildi. Kör olarak; 5.0 ml 0.05 M fosfat tamponu (pH: 7.0) içeren deney ortamına, ml'sinde 100 μ g/ml konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanan EGB 761 ekstresinden 1.0 ml ilave edildi.

Karışımlar 37 °C'de 30, 45, 60, 90 ve 120 dakika süreyle bekletildi. Belirtilen inkübasyon sürelerinde oluşan katalaz aktivitesi tayin edilmiştir.

Hazırlanan Numunelerin Çalışılması

	<u>Numune</u>	<u>Kontrol</u>	<u>Kör</u>
% 0.18 H ₂ O ₂	1 ml	1 ml	1 ml
0.05 M pH: 7.0 fosfat tamponu	2 ml	2 ml	2 ml
EGB 761 İçeren Eritrosit Süspansiyonu	0.01ml	-	-
Fosfat tamponu İçeren Eritrosit Süspansiyonu	-	0.01 ml	-
Deiyonize Su	-	-	0.01 ml

EGB 761 ve Fosfat tamponu ihtiva eden eritrosit süspansiyonları ortama en son eklenerek 25 °C'de 240 nm dalga boyunda da iyonize su körüne karşı, spektrofotometrede 3 dakika boyunca absorbans değişimi izlendi (Şekil 10).

Standart Serinin Hazırlanması

Standart olarak (Bovine Liver Catalase, Sigma) saf katalaz (18.600 Ü/mg) kullanıldı. Çalışma standartları; 2,5 µg/ml = 52.1 Ü/ml, 5,0 µg/ml = 104.2 Ü/ml, 7.5 µg/ml = 156.3 Ü/ml ve 10 µg/ml = 208, 4 Ü/ml olacak şekilde fosfat tamponu (0.05 M, pH: 7.0) içinde hazırlandı. Standartlar da numune gibi çalışıldı. Numunelerdeki katalaz miktarı önce standart eğriye göre hesaplandı (Şekil 9). Daha sonra Ünite/mg Hb cinsinden ifade edildi.

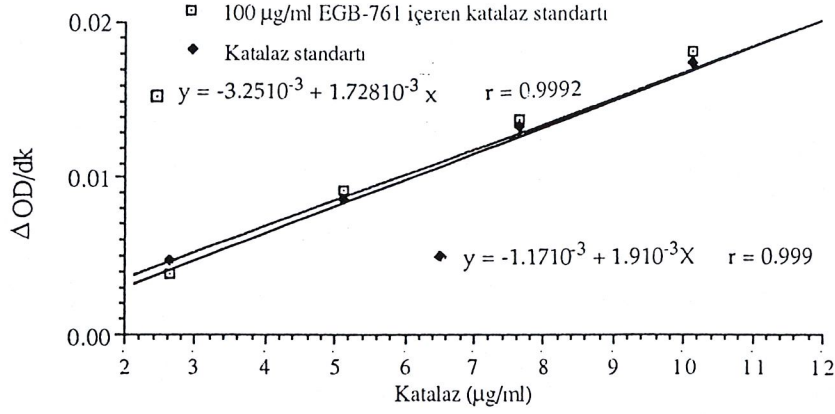
100 µg/ml EGB 761'in 2.5, 5.0, 7.5 ve 10 µg/ml katalaz içeren ortamdaki standart eğri üzerindeki etkisi incelendi (Şekil 9).

Katalaz aktivitesinde kullandığımız bu yöntemin C.V. değeri % 4.5 bulundu.

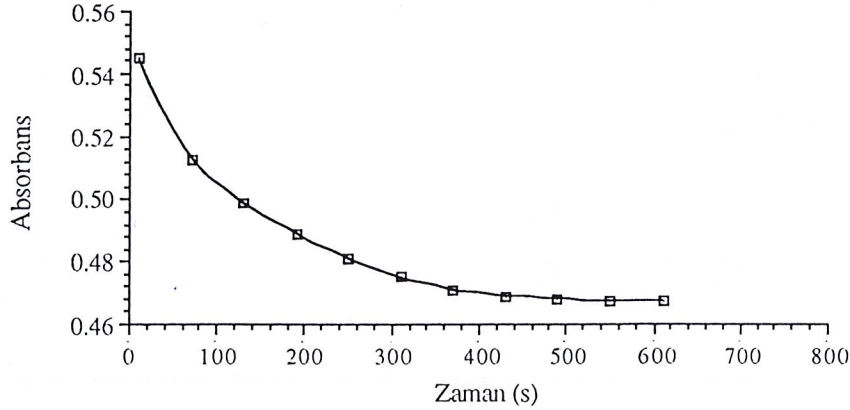
Katalaz (Ü/mg Hb)

n	X ± SX	SD	C.V. (%)
10	19.42 ± 0.28	0.88	4.5

n = Deney sayısı



Şekil 9. Katalaz ölçümüne ait standart eğri ile katalaz standartlarının, 100 µg/ml EGB 761 içermesi halinde oluşan standart eğri



Şekil 10. 7.5 µg/ml katalaz aktivitesinin zamana bağımlı olarak değişmesi

3.2.4. HEMOGLOBİN TAYİNİ (42)

Eritrosit süspansiyonlarında hemoglobin tayini için siyanomethemoglobin metodu (42) kullanıldı. Bu metodun esası, ferrisiyanür etkisiyle hemoglobinin yapısında bulunan Fe^{2+} 'nin Fe^{3+} 'e okside olarak methemoglobin oluşturması ve methemoglobinin de KCN eklenmesiyle stabil form olan siyanomethemoglobine dönüşmesi temel prensibe dayanmaktadır.

ÇÖZELTİLER

1) *Drabkin's Solüsyonu*: 0.20 g. $K_3Fe(CN)_6$, 0.05 g. KCN 1.00 g. $NaHCO_3$ tartılarak distile suda çözüldükten sonra 1000 ml'ye tamamlanır.

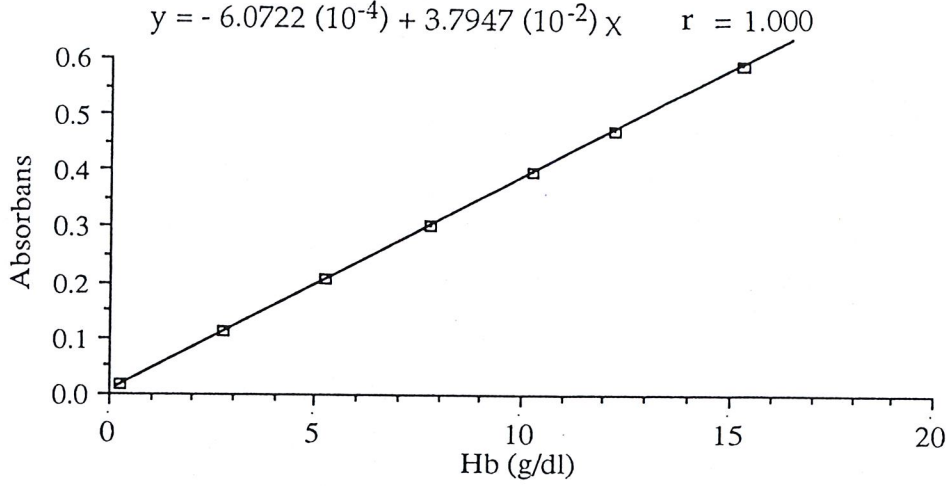
2) *Standart Solüsyon*: Hemoglobin standardı olarak 15 g/dl hemoglobin içeren, piyasada hazır preparatlar halinde satılan kalibrasyon kontrol kanı (Sigma) kullanıldı.

ÇALIŞMA

Fosfat tamponlu salin (pH= 7.4, 15 mM) ile yıkanan eritrosit süspansiyonları, eski hacmine tamamlandıktan sonra 0.02 ml alınarak 5.0 ml Drabkin's solüsyonu içine pipetlendi. Yavaşça karıştırıldıktan sonra 10 dakika beklendi ve 540 nm dalga boyunda köre karşı spektrofotometrede okundu. Kör olarak Drabkin's solüsyonu kullanıldı. Sonuçlar standart eğriden değerlendirildi (Şekil 11).

Standart Serinin Hazırlanması

15 g/dL ihtiva eden standart kan örneğinden 0.008, 0.017, 0.025, 0.033, 0.040, 0.05 ml alınarak 154 mM NaCl çözeltiyle ilk 5 örnek 0.05 ml'ye tamamlandı. Bu dilüsyonlar sırasıyla 2.5, 5, 7.5, 10, 12 ve 15 g/dL Hb içermektedir. Her bir standarttan 0.02 ml alınarak 5 ml Drabkin's solüsyonu içine pipetlendi ve numune gibi çalışıldı, standart eğri çizildi (Şekil 11).



Şekil 11. Hemoglobin standart eğrisi

HESAPLAMA

Standart Hb (g/dL)	Standart OD
X (Numune Hb)	Numune OD

$$X = A \text{ g/dL Hb}$$

Eritrosit süspansiyonunda kullandığımız bu yöntemin C.V. değeri % 2.5 olarak bulunmuştur.

Hb (g/dL)			
n	$X \pm SX$	SD	C.V. (%)
10	13.2 ± 0.11	0.34	2.5

n = Deney sayısı

İSTATİSTİKSEL METOD

İstatistik hesaplamalarda Student'in t testi kullanılarak iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi uygulandı (44).

4. BULGULAR

MDA, SOD ve katalaz aktivite tayinleri için 10 kadın 20 erkek olmak üzere toplam 30 kişi çalışma kapsamına alınmıştır. Çalışma kapsamına alınan kadın ve erkeklerin yaş ortalamaları arasında; lipid peroksidasyonu tayininde , SOD ve katalaz aktiviteleri tayinin de, istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tesbit edilmiştir (Tablo I).

Tablo I. Sağlıklı kişilerin yaş ve cinsiyet durumlarına çalışılan parametreler arası dağılımları

Çalışılan Parametreler	n	Kadın				Erkek			t	p
		%	$\bar{X} \pm SX$	SD	%	$\bar{X} \pm SX$	SD			
LP	10	50	27.0 ± 3.7	8.3	50	23.4 ± 2.58	5.8	0.80	> 0.05	
SOD	10	40	29.8 ± 2.9	7.2	60	26.8 ± 2.9	7.2	0.64	> 0.05	
Katalaz	10	20	32.5 ± 5.5	7.8	80	21.1 ± 1.0	2.6	2.03	> 0.05	

n = Kişi sayısı

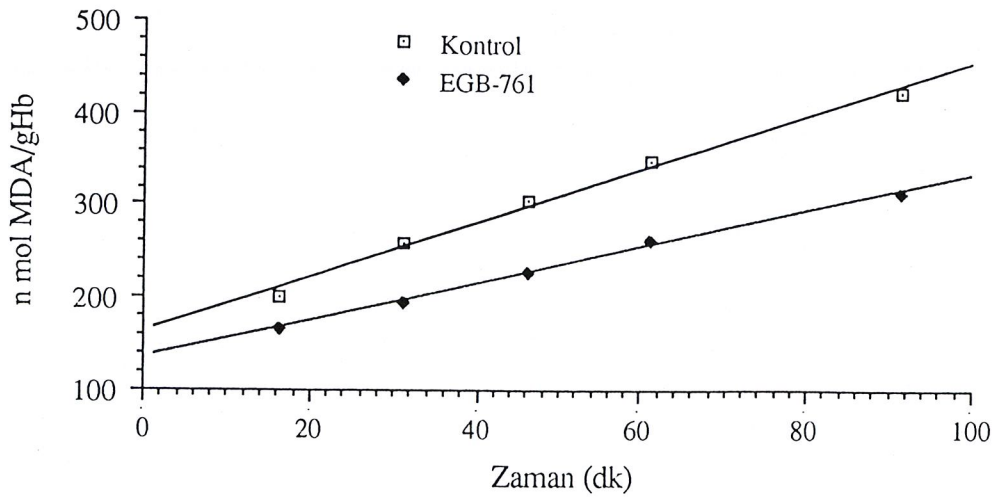
Değerler: Art. Ort. ± Standard hata, SD: Standard deviasyon

MDA tayin yönteminde EGb 761'in her hangi bir girişimsel etkisi olmadığı gözlemlendi (Şekil 6).

250 µg/ml EGb 761 ve kontrol olarak; (15 mM, pH=7.4) PBS-azid ihtiva eden ve t-butil hidroperoksitle indüklenen eritrosit süspansiyonlarında belirli zaman aralıklarıyla yapılan inkübasyon sonucu L.P değerleri karşılaştırıldığında, EGb 761 grubundaki değerlerin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli ölçüde düşük olduğu tesbit edilmiştir ($p < 0.01$) (Tablo I).

Tablo II. EGb 761 (250 µg/ml) ve kontrol olarak PBS-azid ihtiva eden eritrosit süspansiyonlarında belirli sürelerde inkübasyon sonucu LP değerleri

Süre(dk)	n	Kontrol (PBS-azid) nmol MDA/g Hb			EGb 761 (250 µg/ml) nmol MDA/g Hb			t	p
		$\bar{X} \pm Sx$	SD	% İnhibisyon	$\bar{X} \pm Sx$	SD			
15	10	189.6 ± 9.3	29.5	18	153.9 ± 8.7	27.4	2.8	> 0.01	
30	10	246.0 ± 9.8	31.0	25	184.7 ± 9.4	29.6	4.5	< 0.01	
45	10	294.1 ± 9.5	30.1	27	215.8 ± 8.7	27.4	6.1	< 0.01	
60	10	336.1 ± 9.5	29.9	26	249.5 ± 9.0	28.3	6.6	< 0.01	
90	10	409.4 ± 12.5	39.6	26	302.1 ± 9.7	30.7	6.7	< 0.01	



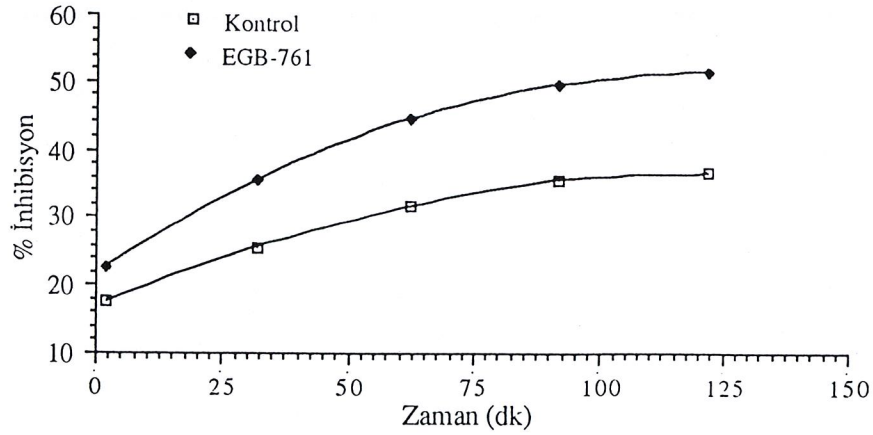
Şekil 12. t-Butil hidroperoksitle indüklenen, EGb 761 ve kontrol olarak PBS-azid ihtiva eden eritrosit süspansiyonlarının belirli sürelerde inkübasyon sonucu MDA oluşumuna ait grafik.

EGB 761 (100 µg/ml) ve kontrol olarak; 154 mM NaCl ihtiva eden eritrosit süspansiyonlarında belirli zaman aralıklarıyla yapılan inkübasyon sonucu, Cu-Zn SOD'ın % inhibisyon değerleri karşılaştırıldığında, EGB 761 grubundaki değerlerin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli ölçüde yüksek olduğu gözlemlendi ($p < 0,01$) (Tablo III). SOD tayin yönteminde EGB 761'in herhangi bir girişimsel etkisi olmadığı gözlemlendi (Şekil 7).

Tablo III. EGB 761 ve kontrol olarak NaCl içeren eritrosit süspansiyonlarında % inhibisyon cinsinden Cu-Zn SOD değerleri

Süre	Kontrol (NaCl)			Aktivasyon	EGB 761 (100 µg/ml)			t	p
	n	$\bar{X} \pm SX$	SD		$\bar{X} \pm SX$	SD			
0	10	16.0 ± 1.9	5.9	131	21.1 ± 1.9	6.0	1.91	>0.01	
30	10	23.6 ± 2.5	7.7	142	34.2 ± 1.6	4.9	3.67	<0.01	
60	10	29.5 ± 2.7	8.6	143	43.4 ± 2.1	7.0	3.96	<0.01	
90	10	34.1 ± 3.5	11.0	141	48.4 ± 2.5	7.9	3.34	<0.01	
120	10	35.2 ± 3.6	11.6	143	50.0 ± 2.6	8.1	3.30	<0.01	

n = Deney sayısı



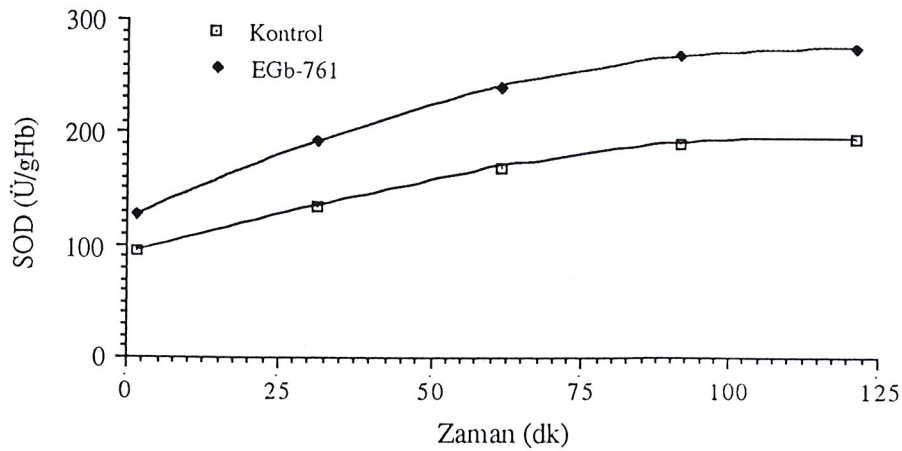
Şekil 13. EGB 761 ve kontrol olarak; NaCl içeren eritrosit süspansiyonlarında belirli sürelerde inkübasyon sonucu Cu-Zn SOD'ın % inhibisyon grafiği

EGb 761 (100 µg/ml) ve kontrol olarak 154 mM NaCl ihtiva eden eritrosit süspansiyonlarında belirli zaman aralıklarıyla yapılan inkübasyon sonucu Cu-ZnSOD'ın % inhibisyon değerlerinin Ü/g Hb cinsinden hesaplanarak karşılaştırıldığında EGb 761 grubundaki değerlerin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli ölçüde yüksek olduğu gözlemlendi ($p < 0.01$) (Tablo IV).

Tablo IV. EGB 761 (100 µg/ml) ve kontrol olarak NaCl içeren eritrosit süspansiyonlarında Ü/g Hb cinsinden Cu-Zn SOD değerleri

Süre (dk)	n	Kontrol (NaCl)		Aktivite (%)	EGb 761 (100 µg/ml)		t	p
		$\bar{X} \pm SX$	SD		$\bar{X} \pm SX$	SD		
0	10	85.9 ± 8.9	28.0	137	117.8 ± 10.5	33.1	1.88	>0.01
30	10	125.8 ± 13.1	41.4	144	182.4 ± 8.7	27.7	3.60	<0.01
60	10	160.5 ± 15.0	47.0	144	231.5 ± 11.5	36.3	3.79	<0.01
90	10	181.9 ± 18.8	59.0	143	258.1 ± 13.0	42.0	3.32	<0.01
120	10	186.6 ± 19.0	61.0	142	265.6 ± 13.7	43.0	3.30	<0.01

n = Deney sayısı



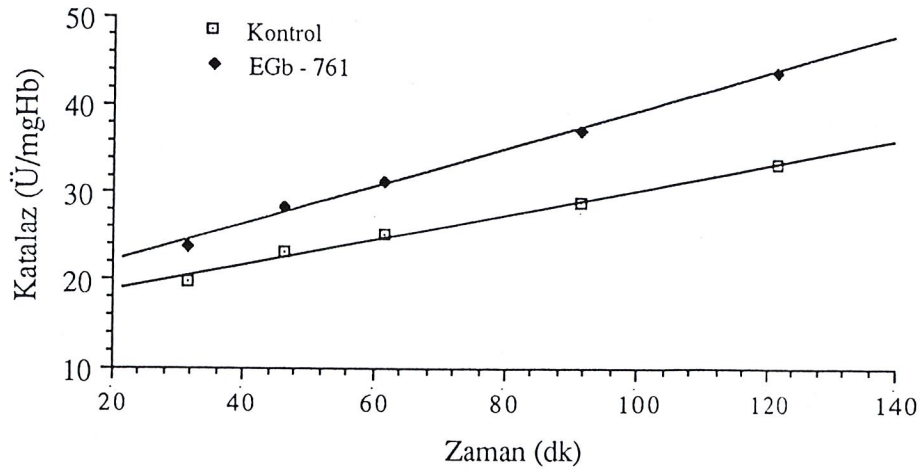
Şekil 14. EGb 761 ve kontrol olarak; NaCl ihtiva eden eritrosit süspansiyonlarında belirli sürelerde inkübasyonu sonucu SOD'ın Ü/g Hb cinsinden grafiği

EGb 761 (100 µg/ml) ve kontrol olarak 0.05 M fosfat tamponu ihtiva eden eritrosit süspansiyonlarında belirli zaman aralıklarıyla yapılan inkübasyon sonucu katalaz aktivitesinin değerleri karşılaştırıldığında EGb 761 eklenen grupta değerler kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli ölçüde yüksek bulundu ($p < 0.01$). EGB 761'in katalaz tayin yöntemine herhangi bir girişimsel etki yapmadığı da gözlemlendi (Şekil 9).

Tablo V. EGb 761 (100 µg/ml) ve kontrol olarak fosfat tamponu içeren eritrosit süspansiyonlarında katalaz aktivitesi değerleri

		Ü/mg Hb						
		Kontrol (fosfat tamponu)			EGb 761 (100 µg/ml)			
Süre (dk)	n	$\bar{X} \pm SX$	SD	% Aktivite Artışı	$\bar{X} \pm SX$	SD	t	p
30	10	18.6 ± 1.1	3.5	121	22.6 ± 1.6	5.0	2.1	> 0.01
45	10	22.0 ± 1.5	4.8	124	27.3 ± 1.9	6.0	2.2	> 0.01
60	10	24.1 ± 1.7	5.0	125	30.1 ± 1.6	5.2	2.6	> 0.01
90	10	27.7 ± 1.6	5.1	128	35.9 ± 1.6	4.8	3.7	< 0.01
120	10	32.2 ± 1.7	5.3	132	42.6 ± 1.6	5.2	4.4	< 0.01

$n = \text{Deney sayısı}$



Şekil 15. EGb 761 ve kontrol olarak fosfat tamponu içeren eritrosit süspansiyonlarında belirli zaman aralıklarıyla yapılan inkübasyon sonucu katalaz aktivitesine ait grafik

5. TARTIŞMA

Serbest oksijen radikalleri, oksijenle yaşıyan tüm canlılarda meydana gelen metabolik olaylar esnasında, kaçınılmaz bir şekilde üretilmektedir (2, 45).

Moleküler oksijenin kısmi redüksiyonu ve eksitasyonu sonucu oluşan serbest oksijen radikalleri (O_2^{\bullet} , $O_2^{\bullet 1}$, $\bullet OH$, H_2O_2) membranlarda doymamış yağ asitleri ve kolesterol'ün peroksidasyonunu indükleyerek LP'na neden olurlar ve membranların yapı ve fonksiyonunu bozarlar (2). LP sonucu açığa çıkan MDA ise toksik ve karsinojenik bir bileşiktir (3).

Lipid peroksidasyonuna yol açan serbest radikaller hem ekzojen uyarılarla oluşturulmakta, hem de endojen kaynaklı olabilmekte ayrıca, LP zincir reaksiyonlarında üretilen sekonder radikaller tarafından da oluşturabilmektedir (2,46).

Organizma, radikal hasarına karşı antioksidan savunma sistemiyle kendini korumaya çalışmaktadır. Genel anlamda antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya reaktif oksijeni ortamdan uzaklaştırarak LP'nu inhibe eden bileşiklerdir (24).

Antioksidanlar enzimatik ve non-enzimatik olarak sınıflandırıldığında; GSH-P_x, katalaz, SOD (6) ve Cp enzimatik antioksidanlardır. Karotenoidler, Vitamin C, Vitamin E, Se, Zn, Cu non-enzimatik antioksidanlardır (5).

Her ne kadar O₂[•] radikalleri diğer radikallerden çok daha az etkili ise de diğer radikallerin oluşumuna neden olması ve kendiliğinden dismutasyon tepkimelerinde ¹O₂ üretmesi SOD'ın önemini vurgular. SOD normal koşullarda O₂[•] ve ona bağımlı toksik etkileri önler. Ancak radikal oluşumunu artıran etkilerle veya ortamda oksijen derişiminin artması ile korunma mekanizması aşılır (1).

Süperoksit radikalleri enzimatik dismutasyonla temizlenirken antioksidan olarak bilinen bileşikler de organizmada oksijen radikallerinin temizlenmesini temin eder. A vitamini singlet oksijen bağımlı tepkimeleri inhibe eder. C vitamini de etkili bir ¹O₂ temizleyicisidir, miyeloperoksidaz da olduğu gibi radikal üreten enzimlerin, ürettikleri radikaller tarafından inaktive olmalarına karşı koruyucu olarak davranabilir (1).

α -Tokoferol, OH[•] ve HO₂[•] ile tepkimeye girerek oksitlenir ve oksijen radikallerinin toksik etkilerini önler (1,5).

Yukarıda açıklanan, antioksidan bileşiklerin serbest oksijen radikallerine karşı etki mekanizması açıklanırken; EGb-761'in antioksidan mekanizmasını yapılan araştırmaların ışığı altında açıklayabiliriz.

EGb-761'in büyük miktarda serbest oksijen radikallerini tutma etkisini; EGb-761 ekstraktının içinde bulunan flavanoidik bileşikler sağlamaktadır (5, 7).

Robak ve Gryglewski (47)'nin yaptıkları çalışmalar EGb-761'in antioksidan mekanizmasının açıklanmasına yardımcı olabilir; Bu araştırmacılar tarafından non-flavanoid antioksidanlar hariç, flavanoid antioksidanların enzimatik ve non-enzimatik sistemlerde O₂[•] konsantrasyonunu azalttıkları gösterilmiştir. Bununla beraber non-flavanoid antioksidanların rat karaciğer mikrozomlarında MDA inhibisyonu açısından flavanoid antioksidanlardan daha güçlü oldukları bildirilmiştir. Buna göre flavanoidlerin antioksidan olarak temel etkisi, O₂[•]'leri etkisiz hale getirmektir. Bunun yanında non-flavanoid anti-

oksidanlar serbest radikal zincir reaksiyonunu kırarlar ve genellikle OH• radikalini etkisiz hale getirirler (7,8).

Bunlara ilave olarak bir çok in vitro çalışma EGb-761'in, poliansatüre yağ asitlerinden bir hidrojeni çıkararak lipid peroksidasyonunu başlatan (OH• kadar toksik) perferryl iyonlarını, O₂^{•-} anyonlarını ve OH• radikallerini tuttuğunu göstermiştir (8,45).

Duke ve Salin (48), Ginkgo biloba yapraklarından demir içeren SOD'ı saflaştırmışlar ve saflaşma derecesini EGb-761 konsantrasyonuna göre belirlemişlerdir (7).

EGb-761'in antioksidan etkisi; O₂^{•-} toplayan flavanoid glikozidlere, OH• radikallerine, perferryl iyonları ve lipid peroksidleri tutan terpenoidlere (en önemlisi ginkgolid B) ve O₂^{•-} tutan ekstraktın SOD aktivitesine bağlıdır. Süperoksit iyonlarını inaktive eden bu mekanizma endotelyumdan kaynaklanan "relaxing" faktörü etkilediğinden önemli gibi görülmektedir. Bunun nedeni sadece vasküler endotelial hücrelerde değil aynı zamanda makrofajlarda, beyin dokularında, adrenal bezlerde ve nötrofillerde bulunan arjininden oluşan EDRF'nin nitrik oksit (•N=O) olduğunun kabul edilmesidir. Geçen 10 yıl içinde •N=O veya EDRF'nin moleküler mekanizmasıyla ilgili birçok çalışmalar yapılmıştır. Çünkü •N=O veya EDRF vasküler gevşetmeye aracılık etmektedir (8,38).

Daha önce yapılan çalışmalarda, •N=O'nun süperoksit dismutaz aktivitesine sahip olduğu ve aynı zamanda guanilat siklazı aktive ettiği gösterilmiştir. Hatta nitrooksitlerin zincir kırıcı tarzda antioksidan etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bunlar Fe²⁺'yi okside ederek hidroksil radikallerinin oluşumunu ve hasarı önlemektedir (49,50). EGb-761'in guanilat siklazı inhibe eden cGMP fosfodiesteraz enziminin aktivitesini baskılayarak, EDRF'yi koruduğu bilinmektedir. Bu yüzden EGb-761 yukarıda bahsedilen antioksidan etkilerine ilaveten indirek olarak •N=O mekanizmasını etkileyerek koruyucu rol oynayabilir (8).

Bu bulgular EGb-761'in antioksidan özellik gösterdiğini desteklemektedir. EGb-761'in serbest radikalleri toplayıcı etkisi membrandaki lipid peroksidasyonuna etkisini açıklayabilir ve lipid peroksitlerinin membranlarda oluşturduğu hasarı önlemede anlamlı olarak rol oynayabilir (8).

Köse ve Doğan (8) tarafından yapılan bir çalışmada EGb-761'in bir antioksidan gibi davrandığı ve eritrosit membranlarında poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Aynı araştırmacılar tarafından yapılan diğer bir çalışmada da, EGb-761'in antioksidan etkisinin, askorbik asit, glutatyon ve ürik asit gibi suda çözünen antioksidanlardan daha fazla olduğu; retinal asetat, α -tokoferol gibi yağda çözünen antioksidanlar ile karşılaştırılabilir olduğu ileri sürülmektedir (5). Bu etki mekanizması aşırı derecede serbest radikal oluşturan pek çok hastalıkların tedavisinde, serbest radikallerle indüklenen lipid peroksidasyonunun oluşturduğu hücre membranı hasarının önlenmesinde önemli olabilir (8).

Köse ve arkadaşlarının (22) yaptığı diğer bir çalışmada, Behçetli hastalar ve sağlıklı kişilerde H_2O_2 ile indüklenen lipid peroksidasyonunun derecesi birbiriyle karşılaştırıldığında; Behçetli hastalarda, sağlıklı kişilere göre, MDA oluşumunun daha fazla olduğu bulunmuştur. Ayrıca 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ve 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonlarda kullanılan EGb-761'in MDA oluşumunu istatistiksel olarak önemli ölçüde önlediği bildirilmektedir.

Ginkgo biloba ekstresinde bulunan ginkgolidler, özellikle ginkgolid B, platelet aktivasyon faktörü (PAF)'nin antagonisti olarak görev yaparlar. PAF, platelet yığılması nötrofillerin dağılımından ve ayrıca oksijen radikali üretiminden, ayrıca mikrovasküler geçirgenlikten ve bronşların kasılmasından sorumlu tutulmaktadır. Serebral iskemi oluşturulan deney hayvanlarında, ginkgolidler serebral metabolizmayı düzenler ve hipoksi hasarına karşı beyni korurlar (37,38,39).

t-Butil hidroperoksidin methemoglobin oluşturduğu ve t-Butil hidroperoksit ile yapılan deneylerde; methemoglobin eritrosit membranını LP'na karşı bir miktar koruyabildiği ileri sürülmektedir (16). Nitekim bulgularımızda görüldüğü gibi t-Butil hidroperoksit ile yapılan LP indüklenmesinde elde edilen değerler, Köse ve arkadaşlarının (5,8) değerlerinden daha düşüktür.

Gözlemlerimize göre EGb 761 deney ortamına katılan miktarlarda, MDA katalaz ve SOD tayini yöntemlerinde herhangi bir girişimsel etkide bulunmamaktadır. Bu sebepten dolayı enzim aktivitelerinde gözlenen değişiklikler, tamamen EGb 761'in antioksidan özelliklerine bağlıdır.

Çalışmamızda, deney ortamında 250 µg/ml EGb-761 içeren eritrosit süspansiyonu 37 °C'lik inkübasyon ortamında 15. dakikaya kadar % 18 oranında MDA oluşumunu engellerken 30. dakikada bu oran % 26'ya ulaşmakta ve 90. dakikaya kadar sabit kalmaktadır.

Pincemail ve arkadaşları (7) in vitro şartlarda ginkgo biloba ekstraktının hücre hasarında süperoksit anyonunun ortamdaki uzaklaştırarak etki ettiğini ileri sürmektedirler. O_2^- anyonunun serbest proton ortamında uzun süre kalabildiğini, kendiliğinden sulu ortamda H_2O_2 ve O_2 'e dönüşmediğini belirtmektedirler.

Çalışmamızda, SOD aktivitesiyle ilgili olarak deney ortamında 100 µg/ml EGb-761 içeren eritrosit süspansiyonunda 37 °C inkübasyon ortamında 0. dakikada % 131 oranında tesbit edilen SOD aktivitesi 30. dakikada % 143'e ulaşmakta ve 120. dakikaya kadar artış sabit kalmaktadır. Bulgularımız literatür ile uyum içindedir. Daha önce bahsedildiği gibi Duke ve Salin (48) ginkgo biloba ekstresinde, Fe içeren SOD bulunduğunu göstermişlerdir. Bulgularımızdan anlaşıldığı gibi; in vitro ortamda, SOD enzimini içeren EGb-761'in varlığı; SOD enziminin etkinliğini artırmaktadır.

Stocks ve arkadaşları (4) tarafından yapılan bir çalışmada; eritrositlerle yapılan bir deneyde, sodyum-azid içeren deney sisteminde, sodyum-azidin katalaz aktivitesini inhibe ettiği, dolayısıyla H_2O_2 'nin oto-oksidasyon potansiyelinin 50 kat arttığı bildirilmektedir.

Eritrositler, GSH- P_x yanında her zaman katalaz içerirler. Katalaz enziminin fizyolojik rolü tartışmalıdır. Enzimin H_2O_2 'e nisbeten düşük affinitesinin olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle; fizyolojik durumlarda H_2O_2 'i parçalamadaki rolü önemsiz olabilir. Hatta insanlarda katalaz gen defektinin olması durumunda, stabil olmayan bir mutant enzim üretirler, böylece eritrositlerde-

ki katalaz aktivitesi düşük olarak gözlenir.

Bu enzimin yokluğu Japon (51) ve İsviçre (52) ailelerinde ortaya konmuş ve bunlarda hemolitik aneminin olmadığı da gözlenmiştir (16).

Katalaz aktivitesi H_2O_2 'in yüksek konsantrasyonlarında daha da önemli hale gelir, hücre içi H_2O_2 üretimini artıran ilaçlara maruz kalan hücrelerde aktivitesi önemli miktarda artar (16).

Çalışmamızda EGb-761 katalaz aktivitesiyle ilgili olarak deney ortamında 100 $\mu g/ml$ EGb-761 içeren eritrosit süspansiyonunda 37 °C de yapılan 30 dakikalık bir inkübasyon sonunda EGb 761 katalaz aktivitesini % 121 oranında artırmakta; bu artış 45. dakikada % 124, 60. dakikada % 125, 90. dakikada % 128 ve 120. dakikada ise % 132'ye ulaşmaktadır.

Yaptığımız literatür taramasında çalışmamıza benzer bir çalışma bulamadığımız için bulgularımızı karşılaştırma imkanımız olmamasına rağmen bu bulgularımıza göre EGb-761 katalazın bir aktivatörü gibi görünmektedir. Ortamda EGb-761'in varlığı ile birlikte, SOD enzimi toksik olan O_2 'i daha az toksik olan H_2O_2 'ye dönüştürmektedir. Kontrol grubuna nazaran EGb 761 bulunan ortamda EGb 761'in SOD aktivitesinin bir ürünü olarak H_2O_2 üretimi daha fazladır. Ortamdaki H_2O_2 'in artması durumunda katalazın aktivitesi de artar, dolayısıyla EGb-761, katalazın da dolaylı bir aktivatörüdür.

Sonuç olarak; EGb-761'in eritrositlerde SOD ve katalaz enzimlerinin aktivitelerini artırdığını, buna bağlı olarak da eritrositlerde LP'nunu kısmen önlediğini söyleyebiliriz.

6. SONUÇLAR

Sağlıklı kişilerin eritrosit süspansiyonlarında, in vitro olarak EGb-761'in anti-oksidan etkisi belirli zaman aralıklarıyla yapılan inkübasyon süresince LP değerleri yanında EGb-761'in SOD ve katalaz enzim aktiviteleri üzerine etkileri ölçülmüş ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir;

EGb-761 içeren eritrosit süspansiyonu ile kontrol grubunun MDA değerleri belirtilen inkübasyon süreleri boyunca karşılaştırıldığında, EGb 761 içeren grupta MDA değerlerinin ($p<0.01$) istatistiksel olarak önemli ölçüde düşük olduğu gözlenmiştir.

EGb-761 içeren eritrosit süspansiyonu ile kontrol grubunun; SOD ve katalaz aktivitesi değerleri; belirli inkübasyon süreleri boyunca karşılaştırıldığında, EGb 761 grubunda SOD ve katalaz aktivitesi değerlerinin ($p<0.01$) kontrol gruplarına nazaran istatistiksel olarak önemli ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur.

7. ÖZET

Ginkgo biloba ekstraktının (EGb 761) aşırı serbest radikal üretimi olan hastalarda çok etkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca EGb 761'in SOD aktivitesi ve süperoksit anyonunu yakalama özelliği vardır.

Bu çalışmada Ginkgo biloba ekstresinin (EGb 761); sağlıklı ve Ginkgo biloba tedavisi almayan kişilerden elde edilen eritrosit süspansiyonlarında in vitro şartlarda t-Butil hidroperoksidin indüksiyonu ile oluşturulan lipid peroksidasyonuna etkisi incelendi. Ayrıca EGb 761'in antioksidan eritrosit enzimlerinden SOD ve Katalaz enzim aktiviteleri üzerine etkileri incelenerek kontrol grubuyla karşılaştırıldı.

EGb 761'in bulunduğu ortamda MDA oluşumu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı miktarda düşük bulunurken ($p<0.01$), SOD ve katalaz enzim aktivitelerinin, EGb 761'in bulunduğu ortamda kontrol grubuna nazaran istatistiksel olarak anlamlı miktarda yüksek olduğu gözlemlendi ($p<0.01$).

8. SUMMARY

Ginkgo biloba (EGb 761) is an effective complex in the treatment of several diseases associated with the excessive free-radical formation. In addition EGb 761 has superoxide dismutase (SOD) activity and scavenges superoxide anions.

In this study we examined the antioxidant effect of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on lipoperoxidation induced by t-butyl-hydroperoxide in erythrocytes obtained from normal healthy donors who have not taken Ginkgo Biloba extract (EGb 761), in vitro conditions. In addition effects of EGb 761 on SOD and Catalase antioxidant enzymes in erythrocytes were studied and compared to those in control group.

Although MDA levels of EGb 761 containing group were found to be significantly lower than those in control group ($p < 0.01$), the activity of SOD and Catalase in EGb 761 added group were observed to be significantly higher than the values in control group ($p < 0.01$).

9. KAYNAKLAR

1. Kılınç K: Oksijen Radikalleri: Üretimleri Fonksiyonları ve Toksik Etkileri. Biyokimya Dergisi 2:59-89, 1985.
2. Köse K, Doğan P: Lipid peroksidasyonu. Erciyes Tıp Dergisi; Prof. Dr.Ahmet Bilge Ek Sayısı: 340-350.1992.
3. Fridovich I: Superoxide radical: an endogenous toxicant. Ann Rev Pharmacol Toxicol 23: 239-57, 1983.
4. Stoks J, Dormandy TL: The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. Br J Haematol 20: 95-111, 1971.
5. Köse K, Doğan P: Lipoperoxidation induced by hydrogen peroxide in human erythrocyte membrane. 2. Comparison of the Antioksidant Effect of Ginkgo Biloba Extract (EGb 761) with those of water-soluble and lipid-soluble antioxidants. J Int Med Res 23: 9-18, 1995.

6. Masafra C, Buonocore C: Antioxidant erythrocyte enzyme activities during oral contraception. *Contraception* 47: 591-596, 1993.
7. Pincemail J, Dupuis M, Hans P, Haag-Burrurier M: Superoxide anion scavenging effect and superoxide dismutase activity of ginkgo biloba extract. *Experientia* 45: 708-712, 1989.
8. Köse K, and Doğan P: Lipoperoxidation induced by hydrogen peroxide in human erythrocyte membranes: 1-Protective effect of ginkgo biloba extract (EGb 761). *J Int Med Res* 23: 1-8, 1995
9. Halliwell B, and Gutteridge JMC: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *J Biochem* 219: 1-13, 1984.
10. Klebanoff SV: Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann Int Med* 93: 480-489, 1980.
11. Fantone JC, Wand PA: Role of oxygen derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pat* 107: 397-418, 1982.
12. Klug D, Rabani J: A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. *J Biol Chem* 247: 4839-4842, 1972.
13. Fridovich I: Superoxide dismutases. *Ann Rev Biochem* 44: 147-159, 1975.
14. Halliwell B, Gutteridge MC: Oxygen toxicity, Oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1-14, 1984.

15. Mc Cord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312: 159-163, 1985.
16. Clemens MR, Waller HD: Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem Phys Lipids* 45: 251-268, 1987.
17. Deby C, Pincemail J: Oxygen toxicity, free radicals and defense mechanisms. In: Rökan (Ginkgo Biloba) recent results in pharmacology and clinic (Funfgeld FW, ed). Berlin, Heidelberg, New-York: Springer Verlag, pp 57-70, 1988.
18. Tho LL, Candlish JK, Thai AC: Correlated of diabetes markers with erythrocytic enzymes decomposing reactive oxygen species. *Ann Clin Biochem* 25: 426-431, 1988.
19. Knight J.A, Prefer R.K, Mc Clellan L: Specificity of the thiobarbituric acid reaction: It's use in studies of lipid peroxidation. *Clin Chem* 34: 433-248, 1988.
20. Brody EJ: The destructive potential of free oxygen radicals. *International Herald Tribune* 2: 4-4, 1988.
21. Selvam R, Anuradha CV: Lipid peroxidation and antiperoxidative enzyme changes in erythrocytes in diabetes mellitus. *J Biol Chem* 25: 268-272, 1988.
22. Köse K, Doğan P, Aşçıoğlu M, Aşçıoğlu Ö: Behçetli hastalarda, eritrositlerde H₂O₂ ile indüklenen lipid peroksidasyonuna EGb 761'in in vitro antioksidan etkisi. *Erciyes Tıp Dergisi* 15 (4): 339-344, 1993.

23. Jain SK: Evidence for membrane lipid peroxidation during the *in vivo* aging of human erythrocytes. *Biochem Biophys Acta* 937: 205-210, 1988.
24. Halliwell B, Gutteridge JMC: Lipid peroxidation oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet* 23: 1396-1397, 1984.
25. Fridovich I: Superoxide dismutases, defence against endogenous superoxide radical. *Ciba Found Symp* 65 (new series), 1979, pp 77-93.
26. Galeotti T, Borello S, Seccia A, et al: Superoxide dismutase content in human epidermis and squamous cell epithelioma. *Arch Dermatol Res* 267: 83-86, 1980.
27. Sun Y, Oberley LW, Li Y: A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 34: 497-500, 1988.
28. Rest RF, Spitznagel JK: Subcellular distribution of superoxide dismutases in human neutrophils. *Biochem J* 166: 145-153, 1977.
29. Weisiger RA, Fridovich I: Superoxide dismutase: Organelle specificity. *J Biol Chem* 248: 3582-3592, 1973.
30. Weisiger RA, Fridovich I: Mitochondrial superoxide dismutase: Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* 248: 4793-4796, 1973.
31. Yost FJ, Fridovich I: An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 248: 4905-4908, 1973.
32. Gregory EM, Yost FJ, Fridovich I: Superoxide dismutases of *Escherichia coli*: Intracellular localization and functions. *J Bacteriol* 115: 987-991, 1973.

33. Grankwist K, Marklund SL, Taljedal IB: Cu-Zn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem J* 199: 393-398, 1981.
34. Strayer L: *Biochemistry*. WH Freeman and Company, New York 1988, pp 397-423, 592-593.
35. Torii KK, Hayashi S, Nakamoto H, et al: Properties of aspergillus niger catalase. *J Biochem* 92: 1449-1456, 1982.
36. Greene DA: Acute and chronic complications of diabetes mellitus in older patients. *Am J Med.* 80 (Sup II SA): 39-53, 1986.
37. Puglisi L, Salvadori S, Gabrielli G, et al: Pharmacology of natural compounds. I. Smooth muscle relaxant activity induced by a ginkgo biloba L.extract on guinea pig trachea. *Pharmacol Res Commun* 20: 573-589,1988.
38. De Feudis FV: *Ginkgo Biloba Extract EGb 761: Pharmacological activities and clinical applications*, Paris 1991: Editions Scientifiques Elsevier: pp 1- 8, 25-94.
39. Kleijnen J, Knipschild P: Ginkgo Biloba. *Lancet* 340:1136-1139, 1992.
40. Bruel A, Gardette J, Berrou E, et al: Effects Of Ginkgo Biloba Extract On Glucose Transport And Glycogen Synthesis Of Cultured Smooth Muscle Cells From Pig Aorta *Pharmacol Res* 21: 421-429, 1989.
41. Sticher O: Quality of ginkgo preparations. *Rev* 59: 2-11, 1993.

42. Tietz NW: Textbook of Clinical Chemistry. WB Saunders Company Philadelphia 1986, pp. 524-527, 595-596, 981-985.
43. Halliwell B, Gutteridge JMC: Free radicals in biology and medicine (2nd Ed) Clarendon Press Oxford 1989, pp 228.
44. Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V: Biyoistatistik Hatiboğlu Yayınevi, Ankara, 1990: ss 72-74.
45. Pincemall J, Deby C: Antiradical properties of ginkgo biloba extract (EGb 761). In: Rökan (Ginkgo Biloba) recent studies in pharmacology and clinic (Füngfeld Fw, ed). Berlin, Heidelberg: Spring-Verlag, 1988, pp 71-82.
46. Mulhol CW, Strain J: Serum total free radical trapping ability in acute myocardial infarction. Clin Biochem 24: 437-441, 1991.
47. Robak J, Gryglewski RS: Flavonoids are scavengers of superoxide anions. Biochem Pharmacol 37: 837-841, 1988.
48. Duke MV, Salin ML: Purification and characterization of iron-containing superoxide dismutase from a eucaryote Ginkgo biloba. Arch Biochem Biophys 243: 305-314.
49. Buettner GR: The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate (Invited paper). Arch Biochem Biophys 300: 535-543, 1993.
50. Weglicki WB, Mak IT: Antioxidant drug mechanisms: transition metal-binding and vasodilation. Mol Cell Biochem 118: 105-111, 1992.

Ek Tablo III. EGb-761 içeren eritrosit süspansiyonları ile kontrol grubunda katalaz aktivitesi değerleri

Sıra No	Yaş	Cins	Hb (g/dL)	KATALAZ (Ü/mg Hb)									
				30 dk EGb-761 Kontrol	45 dk EGb-761 Kontrol	60 dk EGb-761 Kontrol	90 dk EGb-761 Kontrol	120 dk EGb-761 Kontrol					
1	38	K	11	21	18.8	30.4	24.1	34.5	25	37.6	29	40.7	37.6
2	25	E	14	22.9	16.6	31.3	18.8	34.5	19.7	37.6	25	40.7	34.5
3	27	K	12	23.8	15.7	26.9	20.9	29	23.8	34.5	29	40.7	34.5
4	23	E	14	15.7	14.4	18.8	16.6	23	17.5	28.2	18.8	34.5	21.9
5	19	E	12	35.4	26.9	37.6	34.5	41	37.6	44.8	39.5	47	40.7
6	19	E	14	24.1	18.8	34.5	21.9	27	24.7	29	26	43.8	27.9
7	23	E	13	20.7	18.5	24.1	20.7	29.1	25	31.3	27.3	40.7	34.5
8	18	E	13	22	18.8	24.1	21.9	28.2	24.1	34.5	28.5	37.6	31.3
9	19	E	14	18.8	16.6	20.7	18.8	26	20.6	34.5	26.9	50.1	30.1
10	23	E	14	21.9	20.7	24.1	21.9	28.2	22.8	37.6	23.3	50.1	29.1