

54896

T. C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

PREFRONTAL KORTEKSTE
STRES İLE OKSİDAN STRES
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
SIÇANLARDA İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Osman AÇIKGÖZ

T 54896

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ataman GÜRE**

TEZ KÜRETİM VE
DOKÜMANTASYON BÜROSU

**Mayıs 1996
İZMİR**

TEŞEKKÜR

Bu tezin yürütölmesi sırasında büyük yardım ve katkılarını gördüğüm tez danışmanım Prof. Dr. Ataman Güre'ye; uzmanlık eğitimime katkılarından dolayı Prof. Dr. Hamit Özgönül, Prof. Dr. Bedri Özen; Doç. Dr. İlgı Şemin, Yard. Doç. Dr. Giray Yalaz, Öğr. Gör. Uzm. Dr. Hayri Güvel'e; deney aşamalarındaki yardımları için Öğr. Gör. Uzm. Dr. Sevil Gönenç, Vet. Hek. Çetin Pekçetin, Uzm. Dr. Muammer Kayatekin, Dr. Nazan Uysal, Tıp Tek. Ferma Kandemir, Ar. Gör. Deniz Şahin, Dr. Hüray İşlekel, Dr. Semra Gezer'e teşekkür ederim. Bu tezin yazımındaki çok büyük katkıları için Öğr. Gör. Uzm. Dr. Hayri Güvel'e ayrıca teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

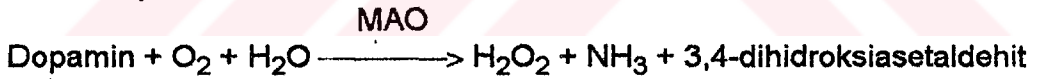
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	4
1. Merkezi Sinir Sistemi ve Dopamin	4
2. Serbest Radikaller ve Hücre Hasarı	8
3. Oksidan Stres	28
4. Merkezi Sinir Sistemi ve Oksidan Stres	29
GEREÇ ve YÖNTEM	35
1. Deney Düzenegi	35
2. Deney Hayvanları	35
3. Deney	35
4. Homojenizasyon	36
5. SOD Aktivitesinin Ölçümü	36
6. GPx Aktivitesinin Ölçümü	38
7. MDA Ölçümü	39
8. Protein Ölçümü	40
9. İstatistiksel Değerlendirme	41
SONUÇLAR	42
TARTIŞMA	46
ÖZET	57
ABSTRACT	58
KAYNAKLAR	59

GİRİŞ VE AMAÇ

Oksidatif metabolizma hızının yüksekliği, hücre zarı lipidlerinin kolay okside olabilen çoklu doymamış yağ asitlerinden zengin oluşu, koruyucu antioksidan enzimlerin düşük düzeylerde olması gibi nedenlerle, beyin serbest radikal hasarına karşı, bedenın diğer bölgelerine oranla daha duyarlıdır (40).

Mitokondride elektron taşıma zinciri tepkimeleri, prostaglandin metabolizması, mikrogial hücrelerin aktivasyonu, katalaminlerin monoamino oksidaz (MAO) tarafından yıkılması gibi çeşitli metabolik olaylar sırasında beyinde serbest radikaller oluşur (40, 50).

Çeşitli metabolik olaylar sonucu hücre içinde oluşan süperoksit radikali, süperoksit dismutaz enzimi tarafından hidrojen peroksite (H_2O_2) dönüştürülür (41). Dopaminin MAO tarafından yıkılması sırasında da hidrojen peroksit oluşur (22, 56, 70, 101).



Hücreler için zararlı bir bileşik olan hidrojen peroksit, glutatyon peroksidaz enzimi tarafından zararsız hale getirilir. Hidrojen peroksit serbest radikal değildir. Ancak demir, bakır gibi geçiş metalleriyle tepkimeye girerek hücreler için oldukça toksik olan hidroksil radikalini oluşturur. Hidroksil radikali büyük bir hızla hücredeki bütün moleküllerle (zar lipidleri, proteinler, DNA, karbonhidratlar) tepkimeye girerek hücrede işlev bozukluğuna ya da hücre ölümüne neden olabilir. Hidroksil radikali zar lipidleriyle tepkimeye girerek lipid peroksidasyonunu başlatır. Lipid peroksidasyonunun yıkım ürünlerinden biri de toksik bir bileşik olan malondialdehittir (47, 50).

Dopaminerjik nöronlarda dopaminin MAO tarafından yıkılması sırasında hidrojen peroksit oluşması nedeniyle dopaminerjik nöronların etkinliğinin artması oksidatif strese neden olabilir. Deneysel çalışmalarda striatumda dopaminin yıkımının artırılmasının oksidan strese neden olduğu gösterilmiştir (23, 86, 87).

Ventral tegmental alanda bulunan dopaminerjik hücre gövdeleri prefrontal kortekste sonlanarak mezokortikal sistemi oluştururlar. Bu sistemde dopamin turnoverı, diğer dopaminerjik sistemlere göre daha yüksektir (7, 43). Frontal korteksin glutasyon peroksidaz aktivitesi beyin diğer bölgelerine oranla daha düşüktür (5, 19, 68). Bu iki nedenle prefrontal korteks oksidan hasara duyarlı olabilir.

Şiddet ve süresine bağlı olarak stres, değişik dopaminerjik sistemlerde dopaminin sentez ve yıkımını artırır. Örneğin hafif ayak şoku yalnızca prefrontal kortekste sonlanan dopaminerjik nöronlarda dopaminin yıkımını artırırken, daha şiddetli ve daha uzun süreli stres uygulamaları, nükleus akkumbens ve striatum gibi diğer bölgelerde sonlanan dopaminerjik nöronlarda da dopaminin yıkımını artırır (34, 38, 80). Diazepam, prefrontal korteks ve mezolimbik bölgede stresin neden olduğu dopamin sentez ve metabolizmasındaki artışı önler (20, 34, 53, 59, 63, 80).

Mezokortikal dopaminerjik sistemin mezolimbik dopaminerjik sistem üzerinde inhibitör bir etkiye sahip olduğu öne sürülmektedir (95). Prefrontal kortekste dopaminerjik sinir uçlarının seçici olarak tahrip edilmesi bu inhibisyonun ortadan kalkarak mezolimbik dopaminerjik sistemin etkinliğinin artmasına neden olur (73). Bu olay şizofrenin kliniğinde görülen ikili yapıyı açıklayabilir. Şizofrenide görülen negatif belirtilerin mezokortikal dopaminerjik

sistemdeki yetmezlik, pozitif belirtilerin ise mezolimbik dopaminerjik sistemin etkinliğinin artması sonucu ortaya çıktığı düşünölmektedir (30).

Şizofreninin ortaya çıkış ve alevlenmelerinde stresin önemli bir yeri vardır (95).

Bu çalışmada stresin prefrontal kortekste hücreler için zararlı olan oksidan strese neden olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.



GENEL BİLGİLER

1. MERKEZİ SINIR SİSTEMİ VE DOPAMİN

Dopamin merkezi sinir sisteminde yaygın olarak bulunan bir katekolamindir. Dopaminerjik nöronların duygulanım ile ilgili olaylarda; hareketin başlatılması, eşgüdümü, normal bir şekilde sürdürülmesinde; ödüllendirme sisteminde; ön hipofizin salgılama işlevinin düzenlenmesinde önemli katkıları vardır (60).

1.1. Dopaminerjik Sistemler

Merkezi sinir sisteminde yer alan dopaminerjik nöronlar dört ana sistemde sınıflandırılabilir: Tuberoinfundibuler, nigrostriatal, mezolimbik, mezokortikal dopaminerjik sistemler (58).

1.1.1. Tuberoinfundibuler Dopaminerjik Sistem: Hücre gövdeleri hipotalamus ve nükleus arkuatusda bulunur; aksonları hipotalamusun daha kaudal kısmında bulunan eminensiya mediada sonlanır (58, 60). Bu sistemdeki dopaminerjik aksonlardan salınan dopamin portal sistemle ön hipofize gider. Buradan prolaktin, büyüme hormonu ve gonadotropin salgılanmasını frenler (60). Bu sistem şizofrenide görülen bazı ikincil nöroendokrin anormalliklerin oluşumuna katkıda bulunabilir (58).

1.1.2. Nigrostriatal Dopaminerjik Sistem: Bu sistemi oluşturan hücrelerin gövdeleri, substansiya nigra pars kompaktada (A9 alanı) bulunur; aksonları striatumun büyük bir bölümünde sonlanır (9). Bu sistemdeki dopaminerjik nöronlardan salınan dopamin, hem kortikostriatal sinir uçlarını inhibe ederek eksitator bir nöromediyator olan glutamat salınmasını engeller,

hem de striatumdaki kolinerjik nöronların gövdelerinde bulunan reseptörlere bağlanarak postsinaptik inhibisyon yapar. Beyindeki toplam dopaminin yaklaşık % 75'i striatumda bulunur (60). Bu sistemdeki dopaminerjik nöronların dejenerasyonu Parkinson Hastalığı'na neden olur.

1.1.3. Mezolimbik Dopaminerjik Sistem: Bu sistemi oluşturan hücrelerin gövdeleri ventral tegmental alanda (A10 alanı) bulunur. Ventral tegmental alan substansiya nigranın mediali ve süperiorundadır. Bu hücrelerin aksonları nükleus akkumbens, limbik sistemin mezial bölümü, stria terminalis nükleusları, amigdala, hipokampus, lateral septal nükleuslar, mezial frontal korteks, anterior singulat korteks, entorinal kortekste sonlanır (9, 58). Bu sistemdeki hücrelerin bir bölümü substansiya nigrada da bulunur. Aynı şekilde nigrostriatal sistemi oluşturan nöronların bir bölümü de ventral tegmental alandan kaynaklanmaktadır (64). Mezolimbik sistemde yer alan nöronların sonlandığı yapılar arasında nükleus akkumbensin önemi büyüktür. Şizofrenide görülen pozitif belirtilerin mezolimbik dopaminerjik sistemin aşırı aktivitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (58).

1.1.4. Mezokortikal Dopaminerjik Sistem: Hücre gövdeleri ventral tegmental alanda bulunur; aksonları neokortekste, yoğun olarak prefrontal kortekste sonlanır (58). Primatlarda prefrontal korteks basit olarak santral sulkusun önünde yer alan korteks olarak tanımlanmıştır. Bugün bu kortikal alanın iyi gelişmiş granüler hücre tabakası IV'e sahip olan rostral bölümü prefrontal korteks olarak tanımlanır. Diğer bölümleri ise premotor suplementar motor korteksler ve frontal göz alanıdır (32). Sıçan beyinde medial prefrontal korteks olarak tanımlanan alan, çeşitli ayrı alanlardan oluşur: Medial presentral korteks, anterior singulat korteks, prelimbik korteks, infralimbik korteks.

İnfralimbik korteks hariç (32), diğer tüm bölgeler mediodorsal talamik nükleusdan afferentler alır (32, 65).

Prefrontal korteks motivasyon ve planlama, davranışın organizasyonu, dikkat ve sosyal davranışlarla ilgilidir. Şizofrenide görülen negatif belirtilerin prefrontal kortekste sonlanan dopaminerjik nöronların aktivitesindeki azalmadan kaynaklandığı düşünülmektedir (58).

1.2. Dopaminin Sentez ve Metabolizması

Dopamin (DA) sentezinin hız kısıtlayıcı enzimi olan tirozin hidroksilaz, tirozini 3,4-dihidroksifenilalanin'e (L-DOPA) dönüştürür. Dokularda çok az miktarda L- DOPA bulunur. L-DOPA, DOPA dekarboksilaz enzimi aracılığı ile dopamine dönüştürülür. Bu basamaklar sitoplazmada gerçekleşir. Sitoplazmada sentezlenen dopamin veziküllerin içine alınarak depolanır (98).

Dopaminerjik nöronlar içinde sitoplazmada bulunan dopamin MAO tarafından metabolize edilerek 3,4-dihidroksifenilasetikası'te (DOPAC) dönüştürülür (99). MAO'nun MAO-A ve MAO-B olmak üzere iki tipi bulunur. L-deprenil seçici olarak MAO-B'yi inhibe ederken klorjilin MAO-A'yı inhibe eder. Her iki madde diğer tip MAO üzerine de etkilidir. Ancak inhibisyon çok düşük derecededir (24).

Hücre dışında DOPAC katekol-O-metil-transferaz (COMT) enzimi aracılığıyla homovanilik aside (HVA) dönüştürülür (99). Hücre dışındaki dopamin COMT aracılığı ile 3-metoksitiramin'e (3-MT), o da HVA'e dönüştürülür (24, 99). Hücre dışındaki HVA'in % 80'i DOPAC'tan gelir. Dopamin % 90 oranında MAO ile DOPAC'a, % 10 oranında ise COMT ile 3-MT'e dönüştürülür (99).

Lavielle ve arkadaşları DOPAC/DA oranının dopaminerjik aktivitenin duyarlı bir göstergesi olduğunu öne sürmüştür (63). Değişik araştırmalarda DOPAC/DA oranı frontal kortekste 0.41-0.50, olfaktor tüberkülda 0.30, nükleus akkumbenste 0.18-0.30, striatumda 0.12-0.25 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara bakıldığında dopamin turnoverının frontal kortekste en yüksek olduğu görülmektedir (7).

1.3. Dopamin Reseptörleri

Günümüzde D₁'den D₅'e kadar 5 farklı dopamin reseptörü gösterilmiştir. Dopamin reseptörleri, yapısal olarak birbirlerine benzemelerine karşın, biyokimyasal ve farmakolojik özelliklerine göre iki gruba ayrılmaktadır: D₁ grubu (D₁, D₅), D₂ grubu (D₂, D₃, D₄) (58, 81, 98).

1.3.1. D₁ Grubu Dopamin Reseptörleri: D₁ ve D₅ reseptörlerinden oluşmaktadır. Bu reseptörlere bağlanan dopamin (DA) G_s proteini aracılığıyla adenilat siklazı aktive eder. Adenilat siklaz ATP'yi cAMP'ye dönüştürür (98). D₁ reseptörü beyinde en yüksek yoğunlukta bulunan dopamin reseptörüdür. Striatum, çeşitli neokortikal bölgeler ve limbik bölgelerde yüksek yoğunlukta bulunur. Prefrontal kortekste bulunan D₁ reseptörleri bellek, duygulanım, biliş gibi şizofrenide bozulmuş işlevlerle ilişkilidir (81).

D₅ reseptörleri çeşitli beyin bölgelerinde bulunur. Striatumda D₅ reseptörlerinin yoğunluğu D₁ reseptörlerine göre daha düşüktür. D₅ reseptörlerinin işlevi bilinmemektedir (81).

1.3.2. D₂ Grubu Dopamin Reseptörleri: D₂ reseptörünün iki alt tipi vardır. D_{2a} inhibitör G protein aracılığıyla adenilat siklazı inhibe eder. D_{2b} başka bir G proteinine bağlanarak fosfoinositol turnoverını artırır. D_{2b} inhibitör otreseptördür. Hem dopaminerjik nöronların gövdesinde hem de presinaptik

uçta bulunur. Otoresseptörler nöronların ateşleme hızını ve dopamin salınmasını kontrol ederler. D_2 reseptörleri yoğunluk yönünden D_1 reseptörlerinden sonra ikinci sırada yer alır. Striatumda bol miktarda bulunur. Ayrıca orta beyin, nükleus akkumbens, amigdala, hipokampus ve serebral korteksin bazı bölümlerinde bulunur (58).

D_3 reseptörleri en yoğun olarak nükleus akkumbens, olfaktor tüberkül, striatumun ventral kısmı gibi limbik yapılar ve hipotalamusta bulunur. Bu reseptörlerin, duygulanım ve bilişsel süreçlerin dopaminerjik kontrolüne aracılık eden ana reseptörler olduklarına inanılmaktadır (60). Hem dopaminerjik nöronlarda otoresseptör olarak, hem de postsinaptik nöronlarda bulunur (84).

D_4 reseptörleri frontal korteks, orta beyin, amigdala ve az miktarda da striatumda bulunur (58).

D_3 ve D_4 reseptörlerinin etki düzeneği tam olarak bilinmemektedir (98).

2. SERBEST RADİKALLER VE HÜCRE HASARI

Hücrenin yaşamı ve bütünlüğü homeostazisin sürdürülmesine bağlıdır. Normal fizyolojik koşullarda, hücresel homeostazis hem iç, hem de dış etkenler tarafından sürekli olarak tehdit edilir. Hücre bu zararlı etkenlere karşı kendini koruyucu savunma düzenekleri geliştirmiştir. Bu düzenekler hücresel iç ortamın bozulmasını azaltarak ve en uygun hücresel aktiviteyi sağlayarak dış etkenlerin zararlı etkilerini bastırır (102).

Aerobik organizmalarda hücresel homeostazisi tehdit eden temel iç etken oksijenin metabolizması sırasında oluşan serbest radikallerdir. Serbest radikaller hücrenin işlevini sürdürebilmesi için zorunlu olan işlemler sırasında oluşur. Serbest radikallerin hücreler için zararlı etkilerini yok etmek için evrimsel süreç

içinde koruyucu savunma düzenekleri geliştirilmiştir. Bu koruyucu düzenekler antioksidan savunma sistemleri olarak sınıflandırılır (102). Normal koşullarda organizmada serbest radikal üretimi ile antioksidan savunma sistemleri yaklaşık olarak dengededir. Bu dengenin serbest radikaller yönünde değişmesi hücrenin biyokimyasını bozar. Bu dengenin bozulması oksidan stres olarak adlandırılır (45).

2.1. Serbest Radikal Kavramı ve Türleri

Atom çekirdekte bulunan pozitif yüklü proton ve yüksüz nötron ile çekirdek çevresinde bulunan negatif yüklü elektronlardan oluşur. Elektronların çekirdek çevresinde bulunduğu enerji düzeylerine orbital denir. Her orbitalde en çok iki elektron bulunur. Bunlardan biri saat yönünde dönerken diğeri ters yönde döner. Eğer bir yörüngede tek elektron bulunursa, o elektron çiftleşmemiş olarak adlandırılır. Radikal, bir ya da daha çok çiftleşmemiş elektron içeren herhangi bir atom ya da molekül olarak tanımlanır (47, 48, 50). Biyolojik moleküllerin çoğu çiftleşmiş elektron içerdiklerinden radikal değildir. Serbest radikaller kimyasal sembollerinin üst tarafına konulan nokta ile gösterilirler. Örneğin $O_2^{\cdot-}$: süperoksit radikali, OH^{\cdot} : hidroksil radikali (45).

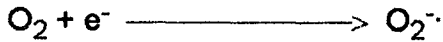
Çiftleşmemiş iki elektron içerdiğinden oksijen molekülü (O_2) de bir radikaldir. Nitrik oksit (NO^{\cdot}) ve nitrojen dioksit (NO_2^{\cdot}) diğeri gaz serbest radikallerdendir. Serbest radikallerin kimyasal reaktiviteleri çok değişiktir. Serbest radikaller genellikle radikal olmayan maddelere göre daha reaktiftir. Oksijen molekülü bu kuralın dışında kalır. Oksijen molekülünün çiftleşmemiş elektronlarının herbiri farklı orbitallerde bulunur ve bunlar birbirleriyle aynı yönde dönerler. Aynı yönde dönüş oksijenin zayıf reaktivitesinin nedenini açıklar. Oksijen molekülü herhangi bir molekülden iki elektron alarak onu yükseltirken

(okside ederken), bu elektronların mutlaka oksijendeki elektronların zıt yönünde dönmesi gerekir. Dönüş kısıtlaması oksijenin radikal olmayan moleküllerle tepkimeye girmesini yavaşlatır. Oksijen daha çok radikallerle tepkimeye girer (47, 102).

İki serbest radikalın birleşmesi sırasında, onların çiftleşmemiş elektronları birleşerek bir çift oluşturur. Böylece her iki radikal ortadan kalkar. Bununla birlikte organizmada yer alan moleküllerin çoğunluğu çiftleşmemiş elektron içermediğinden, serbest radikaller daha çok radikal olmayan maddelerle tepkimeye girerek yeni serbest radikaller oluştururlar. Bu nedenle serbest radikal tepkimeleri, zincir tepkimeleri olarak sürmek eğilimindedir. Bu kural serbest radikal kimyasının temel kuralıdır (45).

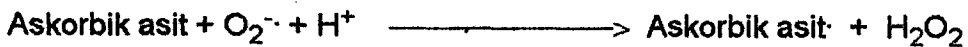
Oksijen molekülünün metabolizmasının temel yolu dört elektron alarak suya indirgenmesidir. Oksijenin indirgenmesi sırasında süperoksit ve hidroksil radikali oluşur (45).

2.1.1. Süperoksit Radikali: Oksijen molekülüne bir elektron eklendiğinde süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) oluşur (47, 50).



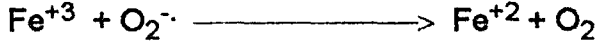
Süperoksit radikali; hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve perhidroksil radikali gibi diğer birçok reaktif türlerin oluşmasına neden olur (102).

Süperoksit radikalının kimyasal davranışı çözündüğü ortama bağlı olarak değişiklik gösterir. Sıvı ortamda süperoksit radikali çok reaktif değildir. Bazen bir elektron alarak zayıf bir yükseltgen olarak etki eder. Örneğin askorbik asidi yükseltgen ve askorbik asit radikali (askorbik asit $^{\cdot-}$) oluşturur (45).



Sıvı ortamlarda süperoksit radikali daha çok indirgen olarak etki eder.

Örneğin Fe^{+3} 'ü, Fe^{+2} 'ye indirger (45).



Organik çözücülerde süperoksit radikali daha reaktif ve tehlikelidir.

Biyolojik zarların iç bölümünde üretilen süperoksit radikali hasara neden olabilir (45).

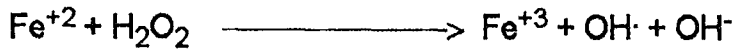
2.1.2. Hidrojen Peroksit: Sıvı ortamda süperoksit radikalinden hidrojen peroksit oluşur. Bu tepkimeye dismutasyon denir (50).



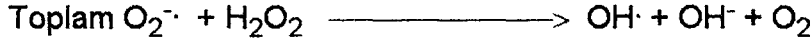
Süperoksit dismutaz enzimi bu tepkimenin hızını 10^4 kat artırır (41).

Hidrojen peroksit çiftleşmemiş elektron içermediğinden radikal değildir. Ancak biyolojik olarak önemli bir yükseltgendir. Hidrojen peroksit yüksek konsantrasyonları dışında yalnız başına hücreler için toksik değildir. Ancak geçiş metalleri ile birleşerek hücreler için zararlı olan hidroksil radikalini oluşturur. Hidrojen peroksit küçük yüksüz bir molekül olduğundan zarlardan kolaylıkla geçer (47, 50).

2.1.3. Hidroksil Radikali: Hidroksil radikali ($OH\cdot$) bilinen en reaktif oksijen radikalidir. Çok büyük biyolojik hasar yapma potansiyeline sahiptir. Tüm biyolojik moleküllere etki ederek serbest radikal zincir tepkimelerini başlatır. Hücre içinde çeşitli yollarla oluşmakla birlikte başlıca iki önemli kaynağı vardır. Bunlardan birincisi Fenton tepkimesi yolu ile hidrojen peroksit'ten oluşmasıdır (102).



İkinci yol Haber-Weiss tepkimesi ile süperoksit radikali ve hidrojen peroksitden oluşmasıdır (49, 67).



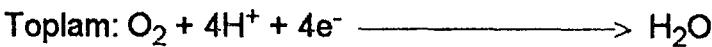
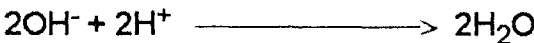
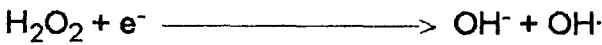
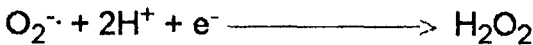
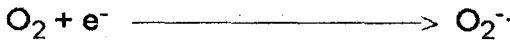
Fenton tepkimesine demir dışında, bakır, kobalt, mangan, titanyum gibi diğer geçiş metalleri de katılabilir (49).

Hidroksil radikali iyonize radyasyon sonucu da oluşur (85).

2.2. Serbest Radikallerin Biyolojik Kaynakları

Süperoksit radikali oluşturan temel biyolojik kaynak mitokondri elektron taşıma zinciridir (102). Soluduğumuz oksijenin yaklaşık % 85-90'ı mitokondri tarafından kullanılır. Oksidatif fosforilasyonda ATP üretilirken oksijen 4 elektron ve 4 H⁺ alarak suya indirgenir (25).

Oksijenin suya indirgenmesi basamaklar halinde gerçekleşir. Birinci basamakta oksijen bir elektron alarak süperoksit radikalini oluşturur. Süperoksit radikali, 2H⁺ ve 1 e⁻ alarak hidrojen peroksiti oluşturur. Hidrojen peroksit bir e⁻ alarak hidroksil radikali ve hidroksil iyonunu (OH⁻) oluşturur. İki hidroksil iyonu, iki H⁺ ile birleşerek iki molekül suyu oluşturur (45).



Elektron taşıma zincirinde sitokrom oksidaz enzim sistemi oksijeni kullanır. Oksijen suya dönüşürken serbest radikaller de oluşur. Ancak bu ara ürünler sitokrom oksidazın aktif bölgelerine sıkıca bağlıdır ve hücreye zarar

verici etkiler oluşmaz (85).

Elektron taşıma zincirinden geçen elektronların bir bölümü indirgenmiş elektron taşıyıcılarından sızar. Sızan elektron oksijen ile birleşerek süperoksit radikali oluşturur. Oksijenin fizyolojik konsantrasyonlarında elektronların sızma hızı, zincirden geçen toplam elektron akımının % 5'inden azdır. Oksijen konsantrasyonu arttıkça sızma hızı da artar (47). Elektronların sızması zincirin erken basamaklarında olmaktadır (45).

Mikrozomal ve nükleer zarlar da elektron taşıma zincirleri içerirler. Bunlar sitokrom P450 ve sitokrom b5'tir. Bu zincirlerde de serbest radikaller oluşur(102).

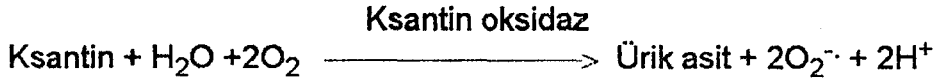
Soluduğumuz oksijenin % 10-15'i mitokondri tarafından alınmaz; çeşitli oksidaz ve oksijenaz sistemleri tarafından ya da doğrudan kimyasal tepkimeler yolu ile kullanılır (45). İnsan vücudunda süperoksit dismutaz dışında yer alan birkaç enzim doğrudan hidrojen peroksit oluşturur. Bu enzimler monoamino oksidaz , glikolat oksidaz, L-amino oksidazdır (76).

Proteinlerin yapısında kullanılan amino asitler L-tipidir. D tipi amino asitler protein yapımında kullanılmaz . Bununla birlikte D tipi amino asitler bakteriler tarafından üretilir ve vücuda alınır. Doğal olmayan bu tür amino asitler D amino oksidazlar tarafından parçalanırken hidrojen peroksit oluşur (45).

Tirozin hidroksilaz , triptofan hidroksilaz , indolamin dioksijenaz ve ksantin oksidaz gibi enzimler doğrudan süperoksit radikali oluştururlar (76) .

Katekolaminler, hemoglobin, myoglobin, indirgenmiş sitokrom c, indirgenmiş ferrodoksinler, tetrahidrobiopterinler otooksidasyona uğrayarak süperoksit radikali oluşturur (41).

Dokularda bol miktarda ksantin dehidrojenaz enzimi bulunur. İskemi sırasında sitozolik serbest Ca^{+2} artması sonucu hücre içi proteazlar aktive olarak ksantin dehidrojenazı ksantin oksidaza dönüştürür. İskeminin başlamasıyla ATP katabolizması sonucu oluşan adenzin, inozine dönüştürülür. İnozin de hipoksantine dönüşür . Böylece dokularda bol miktarda hipoksantin birikir. Biriken hipoksantin ve ksantin, reperfüzyon ile gelen O_2 ile ksantin oksidaz enzimi aracılığı ile birleşerek süperoksit radikali oluşturur (8, 25).



İskemi sırasında salınan katekolaminlerin oksidasyonu da süperoksit radikali oluşturur (8).

Organizmada prostaglandin sentezi sırasında da serbest radikaller oluşur. Fosfolipaz A_2 'nin Ca^{+2} 'ye bağımlı aktivasyonu sonucu araşidonik asit salınır. Araşidonik asitten lipoksijenaz ve siklooksijenaz enzimi aracılığıyla eikosanoidler oluşurken, bu basamakta süperoksit radikali de oluşur (25) .

Serbest radikallerin oluştuğu diğer bir önemli kaynak fagositik hücrelerdir. Fagositik aktivite sırasında oluşan solunumsal patlamada serbest radikaller oluşur. Fagositoz sırasında hücre zarına bağlı indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz enzimi aktifleşir. Bunun sonucunda oksijenden süperoksit radikali ve hidrojen peroksit oluşur. Genellikle aktive olmuş fagositik hücrelerin bol miktarda hidrojen peroksit oluşturduğuna inanılır. Hidrojen peroksit, yerel doku yangısında görülen sitotoksik potansiyelden sorumludur. Fagositoz sırasında Fenton ve Haber-Weiss tepkimeleri aracılığıyla hidrojen peroksitten hidroksil radikali de üretilir (102).

Nötrofillerde bulunan diğer bir öldürme sistemi miyeloperoksidaz enzimidir. Bu enzim makrofajlarda bulunmaz. Miyeloperoksidaz varlığında

hidrojen peroksit ve klor birleşerek güçlü bakterisidal etkiye sahip olan hipokloröz asiti oluşturur (48).

2.3. Serbest Radikallerle Oluşan Hücresel Hasarlar

2.3.1 Lipid Peroksidasyonu: Hücre zarı çift tabaka fosfolipid içerir. Taşıma molekülü, enzim, reseptör gibi işlevlere sahip olan proteinler çift katlı lipid tabakasına gömülüdür. Hücre zarının görevlerini yapabilmesi akışkanlığına bağlıdır. Akışkanlık büyük ölçüde zarda bulunan çoklu doymamış yağ asidi yan zincirlerine bağlıdır. Çoklu doymamış yağ asidi yan zincirlerinin alt yüzü serbest radikal hasarlarına çok duyarlıdır (45).

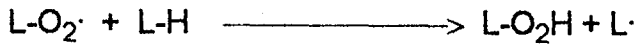
Hidroksil radikalleri zardaki çoklu doymamış yağ asidi yan zincirlerinden (L-H) bir hidrojen atomu çıkararak lipid peroksidasyonunu başlatır. Hidroksil radikali bir H^+ ile birleşerek su ve lipid radikali ($L\cdot$) oluşturur.



Lipid radikali aerobik koşullarda zarda çözünmüş olan oksijen ile birleşerek peroksil radikalini ($L-O_2\cdot$) oluşturur.



Peroksil radikali oldukça reaktiftir. Zar proteinleri ve zardaki komşu yağ asidi yan zincirleri ile tepkimeye girerek lipid hidroperoksitlerini ($L-O_2H$) ve lipid radikali oluşturur.

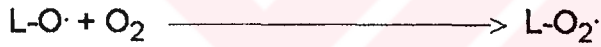
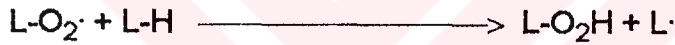
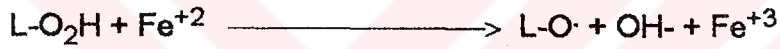
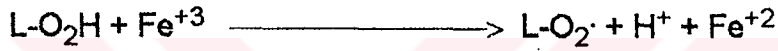


Oluşan lipid radikali yukarıdaki tepkimelerde gösterildiği gibi yine oksijen ile birleşir. Bu tepkimeler zincirleme şekilde sürer (45, 47).

Lipid hidroperoksit, perokside olmayan yağ asidi yan zincirinden daha hidrofildir. Bu nedenle lipid hidroperoksit zar yüzeyine göç etmeye çalışır.

Bunun sonucu olarak zar yapısı ve akışkanlık bozulur; Ca^{+2} gibi iyonlar hücre içine girer (45, 47).

Lipid hidroperoksitleri ortamda demir ve bakır gibi metal iyonları bulunmadığı sürece kararlı bileşiklerdir. Metal iyonları ve onların kompleksleri, özellikle demir ve bakır, lipid hidroperoksitlerini parçalayarak lipid peroksidasyonuna neden olur. Demir lipid hidroperoksitleri ile birleşerek peroksil ve alkoksil ($L-O\cdot$) radikalini oluşturur. Bu radikaller de peroksidasyona neden olurlar (44).



Lipid peroksidasyonunun son ürünleri hidrokarbon gazlar ve toksik aldehitlerdir (47, 85). Aldehitlerden malondialdehit (MDA) ölçümü lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak MDA, 4-hidroksi-2,3-trans-nonenal gibi sitotoksik ürünlerle karşılaştırıldığında oldukça zararsızdır (47). Bu aldehitler komşu hücrelere zarar verebilirler; zardaki enzimler ve reseptörleri inaktive edebilirler. Zarların peroksidasyonu sıçan korteksinde serotoninin reseptörlerine bağlanmasını, insanlarda spiroperidolün kaudat ve putamendeki D_2 reseptörlerine bağlanmasını azaltır (47). Bu ürünler fosfolipaz aktivitesini artırıp, araşidonik asit salınmasını uyararak prostoglandin ve çeşitli endoperoksitlerin oluşumuna neden olabilir (85).

Lipid peroksidasyonunun temel yan ürünlerinden olan MDA ve 4- hidroksinonenal hem sitotoksik hem de mutajeniktir (37, 61, 102). Bu aldehitlerin potansiyel sitotoksitesine karşı koruyucu olarak hücreler onları detoksifiye edecek düzenekler geliştirmiştir. Aldehit dehidrogenaz ile MDA'nın mitokondrial oksidasyonu buna örnektir. Yaşla birlikte mitokondrial oksidasyon kapasitesi azalır. Bu olay yaşlılardaki MDA birikiminin hücrel kaynağını açıklar (61).

Hücre zarlarında lipid peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri linoleik asit, araşidonik asit, dokasaheksaenoik asit ve diğer çoklu doymamış yağ asitleridir. Yukarıdaki yağ asitleri peroksidasyona uğradıklarında sırasıyla 2, 6 ve 10 farklı hidroperoksit türü oluşur (102).

2.3.2. Proteinler ve Serbest Radikal Hasarı: Peptid ve proteinlerin yapıtaşı olan amino asitler de serbest radikallerin hedeflerindedir. Proteinlerde yer alan amino asitlerin yükseltgenmesi, proteinlerin yapısında değişikliğe neden olur. Bu fiziksel değişiklikler üç grupta toplanabilir: Parçalanma, çökme, proteolitik sindirime duyarlılık. Oksidan hasar sırasında albumin, kollajen ve globulinlerin parçalandığı gösterilmiştir. Kollajen ve albumine olan serbest radikal atağı proline seçicidir. Prolinin hidroksil radikali ataklarına duyarlılığı büyüktür. Histidin ve arjinin üzerinden de serbest radikal hasarı oluşur (102).

Seruloplazminde ve lens proteininde gösterildiği gibi oksidan hasar denatürasyonla proteinlerin çökmesine neden olur. Proteinlerin çökmesinin nedeni hidroksil radikalının çapraz bağlar oluşturabilmesine bağlı olabilir (100).

Yükseltgenme proteinlerin yapısında büyük değişiklikler oluşturduğundan hasarlı proteinler proteolitik sindirime daha duyarlıdır. Serbest radikallerin oluştuğu yerlerin yanında protein turnoverı artar (102).

Birçok hücre sel sürecin önemli bir uyarıcısı olan Ca^{+2} iyonları, hücre içinde çok düşük düzeylerde dir. Geçici olarak Ca^{+2} düzeylerindeki artış, önemli metabolik olaylara neden olur. Serbest radikaller Ca^{+2} 'yi hücre içinde düşük düzeyde tutmaya yarayan proteinleri hasara uğratabilir. Bunun sonucu olarak Ca^{+2} düzeylerinde uzun süreli ve aşırı bir artış görülür. Eğer Ca^{+2} düzeylerindeki artış çok yüksek ise DNA'yı parçalayan nükleaz enzimleri aktive olarak DNA hasarına neden olur (45).

Proteinlerin serbest radikallerle hasara uğraması beyinde olduğu gibi birçok dokuda yaşlanmayla birlikte görülen işlev yitiminin nedenini açıklayabilir. Gerbil beyinde yapılan çalışmalar; hasarlı proteinlerin birikiminin, yaşa bağlı olarak görülen bazı fizyolojik işlevlerin yitiminin nedeni olabileceğini işaret etmektedir (88).

2.3.3. Karbonhidratlar ve Serbest Radikal Hasarı: Serbest radikaller uygun koşullarda glukoz ve diğer monosakkaritleri de hasara uğratabilir. Basit monosakkaritler fizyolojik koşullar altında, otooksidasyona uğrayarak dikarbonil bileşikleri ve hidrojen peroksit oluşturur. Örneğin glukoz geçiş metallerinin varlığında otooksidasyona eğilimlidir. Otooksidasyon sonucunda hidrojen peroksit ve peroksil radikali oluşur. Diabette görülen lipid peroksidasyonundaki artış, plazma glukoz düzeyindeki artışa bağlanmaktadır (102).

2.3.4. DNA ve Serbest Radikal Hasarı: Serbest radikaller baz lezyonları, şeker lezyonları, tek zincir kırılması, DNA-protein çapraz bağları oluşturma gibi çok değişik yollarla DNA ve nükleoproteinlerde çok sayıda lezyonlara neden olurlar (36).

Serbest radikallerle karşılaşmış hücrelerde sıklıkla DNA parçalanması görülür. Bu olayda Ca^{+2} artışı DNA parçalanması görülür. Bu olayda Ca^{+2} artışı

sonucu aktive olan Ca^{+2} 'ye bağımlı nükleazlar ya da çekirdekte oluşan hidroksil radikalleri sorumlu olabilir. DNA ve ona komşu proteinlerin yapısında, hidroksil radikali oluşumunu katalizleyen metaller bulunur. Eğer, DNA yapısında demir ya da bakır bulunduruyorsa, çekirdeğe ulaşabilen hidrojen peroksit, hidroksil radikali oluşturarak DNA'yı hasara uğratabilir (45).

Nükleazlar ya da hidroksil radikali aracılığıyla oluşan DNA parçalanmasındaki artış, hücrede bulunan poli (ADP-riboz) sentetaz enziminin aktivasyonuna neden olur. Bu enzim hücre işlevlerinde anahtar rol oynayan NAD^{+} 'ye etki ederek NAD^{+} 'nin parçalanmasına ve olası olarak DNA onarım süreçlerine yardımcı olmak amacıyla, parçaların çekirdek proteinlerine yapışmasını sağlar. Eğer DNA'daki parçalanma çok fazla ise sentetaz enzimi daha çok NAD^{+} kullanır. Bunun sonucu olarak metabolizma duraklar, hücre ölür. Bu öldürücü NAD^{+} azalmasının ciddi DNA hasarına uğramış hücrelerin bedenden atılmasında yer alan koruyucu bir düzenek olduğu düşünülmektedir. Çünkü büyük miktarda DNA onarımı mutasyona neden olabilir. DNA onarım enzimleri küçük de olsa hata yapabilme olasılığına sahiptir. Bu hatalar mutasyonlara neden olabilir (45).

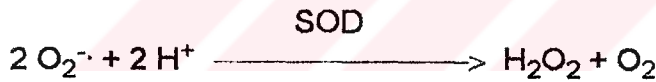
2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest radikallerin potansiyel zararlı etkilerini önleyen maddeler genellikle antioksidan savunma sistemleri adı altında toplanırlar. Antioksidanlar hem hücre içinde, hem de hücre dışı sıvıda bulunarak eşgüdümlü çalışarak serbest radikal hasarını önlerler. Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi antioksidan enzimler hem sitozolde, hem de hücre içinde serbest radikallerin en çok üretildiği yer olan mitokondride bulunurlar. Hücre içinde bulunan antioksidanların yanısıra hücre dışındaki antioksidanlar da serbest

radikal tepkimelerinin önlenmesinde görevlidirler. En önemli hücre dışı antioksidanlar süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz, seruloplazmin ve transferrindir (102).

Antioksidan savunma sistemleri birincil ve ikincil savunma sistemleri olarak iki grupta toplanırlar. Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz gibi enzimler; A, E, C vitaminleri; glutatyon ve ürik asit gibi bileşikler birincil savunma sistemini oluştururken; lipolitik enzimler, proteazlar, peptidazlar, DNA onarım enzimleri, endonükleaz, eksonükleaz ve ligaz ikincil savunma sistemini oluşturur (102).

2.4.1. Süperoksit Dismutaz: Süperoksit radikalierinin H^+ ile hidrojen peroksite dismutasyonunu katalizleyen bir enzimdir. Bu tepkime normal koşullarda çok yavaştır. Süperoksit dismutaz (SOD) bu tepkimeyi 10^4 kat hızlandırır (41).



Yapısında bulunan metale göre üç farklı SOD sınıflandırılmıştır: Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD. Cu,Zn-SOD ve Mn-SOD insanlarda bulunurken, Fe-SOD bakterilerin çoğunda ve bazı bitkilerde bulunur, insanlarda bulunmaz. Mn-SOD mitokondrilerde bulunur. Mitokondri elektron taşıma zincirindeki sızma sonucu ve mitokondrial oksidaz enzimleri tarafından oluşturulan süperoksit radikalini uzaklaştırır. Cu,Zn-SOD sitozol, çekirdek ve olası olarak peroksisomlarda bulunur. Sitozoldeki oksidazlar, endoplazmik retikulümde bulunan sitokrom P450 enzimleri tarafından oluşturulan süperoksit radikallerini uzaklaştırır (45). Hücre dışı sıvısında da bir miktar SOD aktivitesi

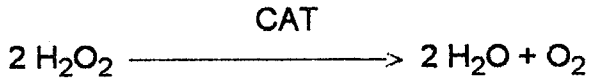
bulunmaktadır. Cu,Zn-SOD'un katalitik aktivitesi bakıra, yapısı ise çinkoya bağlıdır (102).

SOD aktivitesi dokulara göre değişiklikler göstermektedir. Karaciğer, böbreküstü bezi, böbrek ve dalakta en yüksek düzeylerde (102). SOD aktivitesi doku oksijenlenmesine duyarlı olan biyosentezi aracılığıyla düzenlenmektedir. Artmış pO_2 ya da hücre içi oksijen konsantrasyonlarındaki artış SOD biyosentezini artırır. Örneğin yüksek oksijen basıncıyla karşılaşmış sıçanların akciğerlerinde SOD biyosentezi artmış bulunmuştur (41). Süperoksit radikali oluşturan parakuat adlı bir madde de SOD üretimini artırmaktadır (102).

SOD'un biyolojik önemi SOD içermeyen bakteri ve mantar mutantları gibi basit mikroorganizmalarda gösterilmiştir. Bu mutantlar serbest radikal hasarına çok duyarlıdır. SOD geninin bu bakterilere yerleştirilmesi ile oksidatif hasarlara karşı direnç gelişmiştir (51). Reveillaud ve arkadaşlarının çalışması da bu bulguları destekler niteliktedir. SOD eksprese edilen drosofilalar süperoksit radikali üreticisi olan parakuat ile oluşturulan oksidatif hasara daha büyük direnç gösterirler (78).

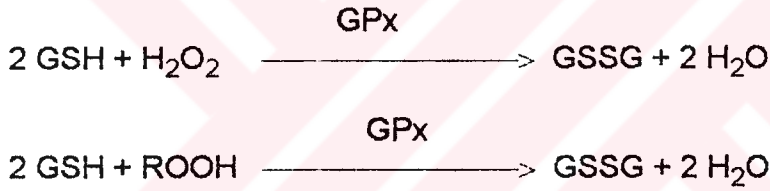
2.4.2. Katalaz: Katalaz (CAT) aktif bölgesinde hem'e bağlı demir içeren büyük bir enzimdir. Memeli dokularının çoğunda CAT peroksizomlarda bulunur. Bununla birlikte kalp dokusunda, mitokondride de az miktarda CAT bulunur (45). Sitozol ve mikrozomlarda da az miktarda CAT bulunur. CAT dokularda yaygın şekilde bulunur ancak karaciğer, böbrek ve eritrositlerde diğer dokulara göre daha yüksek CAT aktivitesi bulunur (45, 102).

CAT hidrojen peroksiti doğrudan oksijen ve suya parçalar. CAT'ın hidrojen peroksiti yıkma kapasitesi çok yüksektir.



Ancak hidrojen peroksite affinitesi çok düşük olduğundan, hızlı çalışması için yüksek hidrojen peroksit konsantrasyonu gereklidir (45). Düşük konsantrasyonlarda hidrojen peroksit glutatyon peroksidaz tarafından yıkılırken, yüksek konsantrasyonlarda hidrojen peroksit CAT tarafından yıkılır (102).

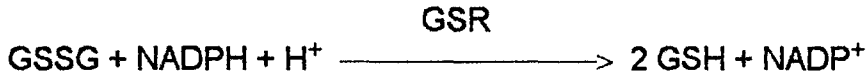
2.4.3. Glutatyon Peroksidaz: Glutatyon peroksidaz (GPx) hidrojen peroksiti suya dönüştürür. GPx hücre içinde sitozol ve mitokondride bulunur. GPx hem hidrojen peroksiti, hem de organik hidroperoksitlerin suya indirgenmesini katalizler (102).



GPx'in selenyuma bağımlı ve selenyumdan bağımsız her iki tipi de yukarıdaki tepkimeleri katalizleyerek peroksitleri suya dönüştürerek hücreyi serbest radikal hasarına karşı korur. Selenyuma bağımlı GPx sitozolde bulunur ve daha düşük hidrojen peroksit konsantrasyonlarında etkilidir. Selenyumdan bağımsız GPx ise organik hidroperoksitleri ve aşırı derəcede artmış hidrojen peroksitin suya indirgenmesini sağlar (102)

GPx büyük bir hızla hidrojen peroksiti suya indirgerken indirgenmiş glutatyonu (GSH), yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) dönüştürür. GSH memeli hücrelerinde yüksek konsantrasyonda bulunan, serbest bir tiyol grubuna (-SH) sahip bir tripeptiddir (45). Tepkimeye giren glutatyonlar disülfid bağları ile birbirine bağlanarak indirgeyici özelliklerini yitirirler. GPx'ın işlevini

sürdürebilmesi için ortamda GSH bulunması gereklidir. Bu nedenle GSSG NADPH bağımlı bir enzim olan glutatyon redüktaz (GSR) tarafından GSH'ye dönüştürülür (2, 45, 87).



Bu tepkimelere kofaktör olarak kullanılan NADPH'nin yeniden sentezi için heksozmonofosfat şantı ve bu şantın anahtar enzimi olan glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) enzimi gereklidir. Bu nedenle GSR ve G6PD enzimleri de antioksidan savunma sistemi içinde yer alır (10).

Başka bir selenyuma bağımlı GPx türü de fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidazdır. Sitozolda bulunan bu enzim fosfolipid hidroperoksitlerin parçalanmasından sorumludur (15, 94).

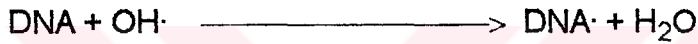
GPx memeli hücrelerinde büyük oranda sitozolda bulunur. Ancak az miktarda GPx mitokondride de bulunur. Benzer bir yerleşim SOD'da da görüldüğünden Cu,Zn-SOD tarafından sitozolda, Mn-SOD tarafından mitokondride üretilen hidrojen peroksitin yıkılmasından temel olarak GPx'in sorumlu olduğu düşünülmektedir (45).

Selenyuma bağımlı GPx'in antioksidan aktivitesinden yapısında bulunan Se sorumludur. GPx aktivitesi ile kan Se konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon vardır (102). Süperoksit radikali GPx'i inaktive eder (11).

2.4.4. Glutatyon: İndirgenmiş glutatyon (GSH) serbest tiyol grubu içeren bir tripeptiddir (γ -glutamil-sistein-glisin). GSH hemen hemen tüm memeli dokularında yüksek konsantrasyonlarda bulunur (45, 102). GSH'nin hidrojen peroksitin suya dönüştürülmesindeki görevinin yanısıra antioksidan özellikleri de

vardır. GSH kolaylıkla süperoksit radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve organik radikallerle tepkimeye girerek serbest radikal hasarını önleyebilir (102).

Radyasyon hasarını önlemede de GSH'nin rolü olabilir. Radyasyon sonucu oluşan hidroksil radikali DNA'dan bir hidrojen atomu çıkararak DNA radikali (DNA·) oluşturur. GSH DNA'ne bir hidrojen iyonu ekleyerek glutatyon radikaline (GS·) dönüşür. 2 GS· birleşerek GSSG'yi oluşturur. Ancak bazı araştırmacılar GS'nin oksijen ile birleşerek daha toksik radikallere dönüştüğünü öne sürmektedir (45).



GSH hücre içinde bazı toksinlerle birleşerek onları zararsız hale getirir. Bu tepkime memeli hücrelerinde yaygın bir şekilde bulunan glutatyon transferaz enzimi tarafından katalizlenir (45).

2.4.5. E Vitamini: E vitamini hem bitkilerde hem de hayvanlarda yaygın olarak bulunan bir antioksidandır (102). E vitamini aktivitesine sahip olan sekiz farklı madde bulunmaktadır: d- α , d- β , d- γ , d- δ tokoferoller; d- α , d- β , d- γ , d- δ tokotrienoller (45). En güçlü antioksidan özelliğe sahip olan d- α tokoferoldür (45, 102). Diğerleri antioksidan özellik taşımalarına karşın insanda daha az öneme sahiptir. Bunlar insanda barsaklardan daha az emildiklerinden dokularda daha az birikirler (45).

Tokoferoller lipidperoksi radikalleri ve alkoksil radikali ile birleşerek lipid peroksidasyonunu önlerler (43, 48, 102). Tokoferoller yukarıdaki radikallerle birleşerek, bu radikallerin yağ asitleri ve zar proteinleri ile tepkimeye girmesini

önlerler. Tokoferoller zincir tepkimelerini önlediğinden zincir kırıcı antioksidan adını da alır (48).

Tokoferollerin hidroksil grubu peroksil radikaline bir H^+ vererek onu lipid peroksite dönüştürür. Bu arada α tokoferol radikali (α tokoferol \cdot) oluşur. α tokoferol radikali diğer radikallere oranla reaktivitesi az olan bir radikaldir. Askorbik asit (C vitamini) bu radikali α tokoferole dönüştürür. Bu tepkime sonucu oluşan askorbik asit radikalinin reaktivitesi oldukça düşüktür. İki askorbik asit radikali birleşerek askorbik asit ve dehidroaskorbik asiti oluşturur (24).



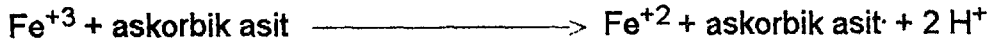
E vitamini zarlarda bulunan zincir kırıcı bir antioksidandır. Ancak zarlar çok miktarda E vitamini içermezler. Bin çoklu doymamış yağ asidi yan zincirine karşın, bir tane E vitamini molekülü bulunur.

E vitamini böbreküstü bezi, kalp, testis, karaciğer gibi dokularda yüksek düzeyde bulunur. Hücre içinde E vitamini mitokondri ve endoplazmik retikulum zarları gibi lipidden zengin zarlarda bulunur (102).

2.4.6. C Vitamini: E vitaminine karşıt olarak C vitamini hidrofiliktir ve sıvı ortamlarda E vitamininden daha iyi işlev görür. C vitamini (askorbik asit) doğrudan süperoksit radikali, hidroksil radikali ve çeşitli lipid hidroperoksitlerle tepkimeye girerek antioksidan özellik gösterir. Ayrıca α tokoferol radikalini α tokoferole çevirerek ona antioksidan özellik kazandırır (45).

C vitamini yaygın bir şekilde memeli dokularında bulunur. Böbreküstü bezi ve hipofizde diğer dokulara oranla daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Karaciğer, dalak, pankreas ve beyinde az miktarda bulunur (102).

C vitamini antioksidan özelliği yanısıra prooksidan özellik de gösterir (69). Yüksek konsantrasyonda C vitamini geçiş metallere varlığında prooksidan olarak etki yapar. C vitamininin prooksidan özelliği Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgemesinden kaynaklanır (8).



Askorbik asit radikali yukarıda açıklandığı gibi askorbik asit ve dehidroaskorbik asite dönüşür (45). Başka bir yol da askorbik asit radikalinin Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgemesidir (8).



Tedavi amacıyla kullanılan demirin emilimini artırmak için C vitamini ve demir kombinasyonu içeren preparatlar kullanılmaktadır. Kuramsal olarak bu kombinasyon kemiricilerde görülen lipid peroksidasyonu sonucu oluşan intestinal hasarın nedeni olabilir (8).

2.4.7. A Vitamini: Karotenler serbest radikalleri uzaklaştırdıklarından antioksidanlar arasında yer almaktadır. Beta karoten ksantin oksidaz aracılığıyla oluşan lipid peroksidasyonunu önler. Beta karoten C vitamini gibi hem antioksidan hem de prooksidandır. Düşük oksijen parsiyel basınçlarında antioksidan etkinlik gösterirken, yüksek parsiyel oksijen basınçlarında prooksidan etkinlik gösterir (102).

2.4.8. Ürik Asit: Purin metabolizmasının son ürünüdür. Antioksidan etkiye sahiptir. Antioksidan etkinliğini hangi yollarla gerçekleştirdiği tam olarak bilinmemektedir (102). Ürik asit demir iyonları ile birleşerek antioksidan etkinlik gösterebilir (28).

2.4.9. Transferrin ve Ferritin: Plazmada demiri bağlayan bir glikoprotein olan transferrin, en önemli demir taşıyan bileşiktir. Her transferrin

molekölü en çok iki demir atomu bağlayabilir. Asidik pH demirin transferrinden salınmasına neden olur (6). Bunun sonucunda serbest demir ferritin gibi diğer demir bağlayıcı proteinlere bağlanabilir. Hücre içinde demirin çoğu ya sitozolde ferritine bağlı olarak ya da lizozomlarda bulunur (102). Her ferritin molekülü 4500 demir atomunu depolama kapasitesine sahiptir. Ferritin en yoğun olarak karaciğer dalak ve kemik iliğinde bulunur (93).

Fizyolojik koşullarda demirin biyoyararlığı ve düzenlenmesi dolaşan transferrinin durumuna bağlıdır. Transferrin serbest demiri bağlayarak demirin lipid peroksidasyonu tepkimelerini başlatmasını önler. Transferrin demirle tam doyurulmadığı sürece antioksidan etkinlik gösterir. Ancak demirle tam olarak doyurulduğunda plazmaya demir salarak prooksidan etkinlik gösterir (102). Barsaklarda emilen demir kanda transferrine bağlı olarak taşınır. pH 7.4'te transferrinin demire affinitesi çok yüksektir. Transferrin endositozla hücre içine girer. Vakuol içinde pH düştüğü zaman transferrinden demir salınır. Süperoksit ve diğer radikaller ferritinden demiri serbestleştirebilir (47).

2.4.10. Seruloplazmin: Bakır bağlayan bir glikoproteindir. Fizyolojik pH ' da 6 ya da 7 bakır atomu bağlar. Seruloplazminin antioksidan etkinliği üç ayrı yoldan gerçekleşir. Seruloplazmin Fe^{+2} 'nin Fe^{+3} 'e yükseltgenmesini katalizleyen ferrokسيداز gibi işlev görerek demirin transferrine bağlanmasını kolaylaştırır. Zayıf da olsa süperoksit radikalının zararlı etkilerini önler. Bu etki hücre dışı sıvının antioksidan etkinliğinde önemli bir rol oynayabilir. Son olarak seruloplazmin prooksidan bir metal olan bakırı bağlayarak antioksidan etkinlik gösterir (102).

2.4.11. Lipolitik Enzimler: Hücreler, hasarlanmış ya da bozulmuş bileşenlerinin yeniden yapılmasında görevli çeşitli enzimlere sahiptir. Fosfolipaz

aracılığıyla hasarlı yağ asitlerinin hücre zarından uzaklaştırılması zar bütünlüğünün sağlanmasında en etkin yoldur. Lipid peroksidasyonunun fosfolipaz A₂'nin lipolitik etkinliğini uyardığı gösterilmiştir (102).

2.4.12. Proteolitik Enzimler: Çeşitli proteolitik enzimler hasara uğramış proteinleri parçalayarak antioksidan savunmaya katılır (29). Proteolitik enzimler hasara uğramış ve değişmiş proteinlerin hücre içinde birikimini önler. Bu etki özellikle yaşlanmada önemlidir. Hasarlı proteinlerin birikimi hücreler için zararlı olabilir. Proteazom ve makroksiproteinaz serbest radikal hasarına uğramış proteinleri parçalayan proteinaz kompleksleridir. Hücre için proteolitik aktivitenin serbest radikal oluşumunu takiben arttığı bilinmektedir (4).

3. OKSİDAN STRES

İnsan bedeninde serbest radikaller ve hidrojen peroksit sabit bir hızla üretilir. Serbest radikallerin zararlı etkileri antioksidan savunma sistemleri tarafından azaltılır. Normal hızda üretilen serbest radikallere karşı yeterli etkinlikte antioksidan savunma sistemleri bulunur. Ancak antioksidan savunma sistemlerinin büyük bir yedeği yoktur. Belki de bunun nedeni, bazı radikallerin fagositoz gibi yararlı olaylarda görev alması olabilir (45).

Serbest radikal üretimi ile antioksidan savunma sistemleri yaklaşık olarak dengededir. Oksidan stres olarak adlandırılan dengenin serbest radikaller yönünde değişmesi, hücrenin biyokimyasını bozar. Hücrelerin çoğu hafif derecede oksidan stresi tolere edebilir. Çünkü onarım sistemleri hasarlı molekülleri tanır ve uzaklaştırır; yerine yeni moleküller yapılıp. Ayrıca hücreler oksidan strese yanıt olarak antioksidan savunmalarını artırabilir. Örneğin % 100 O₂ bulunan bir ortama koyulan sıçanlar birkaç gün içinde ölür. Ancak hayvanlar

giderek artan düzeyde O₂ konsantrasyonlarıyla karşılaştığında akciğerler antioksidan savunmalarını artırarak uyum sağlayabilirler. Böylece hayvanlar % 100 oksijene dayanabilirler. Bununla birlikte şiddetli oksidan stres hücreleri hasara uğratabilir, hatta öldürebilir. Antioksidanların azalması, serbest radikal üretiminin ya da geçiş metallerinin artması oksidatif strese neden olabilir (45).

4. MERKEZİ SINIR SİSTEMİ VE OKSİDAN STRES

Sinir sistemi birçok anatomik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri nedeniyle, bedenin diğer organlarına göre serbest radikal hasarına karşı daha duyarlıdır. Ayrıca sinir sisteminin yapısal ve işlevsel özellikleri, serbest radikal hasarını daha da önemli duruma getirir. Bu özellikler aşağıdaki şekilde özetlenebilir (40).

a)Merkezi sinir sisteminin oksidatif metabolizma hızı yüksektir.

b)Özellikle zardaki çoklu doymamış yağ asitleri gibi kolayca okside olabilen maddeler yüksek konsantrasyonda bulunur.

c)GPx, CAT gibi koruyucu antioksidan enzimler düşük düzeylerde bulunur.

d)Dopaminin metabolizması gibi özel nörokimyasal tepkimeler aracılığıyla hücre içinde serbest radikaller oluşur.

e)Özelleşmiş nöronal iletim ve sinaptik iletimin etkinliği zarların iyi çalışmasına bağlıdır.

f)Zarların yüzey alanının sitoplazmik hacme oranı yüksektir.

g)Uzun aksonal yapı periferik hasar oluşumuna eğilimlidir.

h)Sinirsel anatomik ağ bozulmaya duyarlıdır.

i)Sinir hücreleri replike olamaz.

4.1. Beynin Oksijen Metabolizması ve Serbest Radikal Üretimi

Yüksek metabolik etkinliği nedeniyle beyin çok miktarda moleküler oksijen kullanır. Genç bir erişkinde 100 g beyin dokusu dakikada 3.5 ml oksijen kullanır. Bu açıdan bakıldığında, beyin beden ağırlığının yalnızca % 2'sini oluşturmasına karşın, dinlenim durumunda toplam oksijenin % 20'sini kullanır (21).

Sinir hücresinde oksijen temel olarak mitokondride karbonhidratların oksidasyonuna katılır ve beyinde dakikada 4×10^{21} mol ATP üretilir (76). Sinir hücresinde mitokondri hücre gövdesinin yanısıra, hücre zarı boyunca iyonik gradienti sağlayan ATPaz'ların bulunduğu dendritler, aksonlar ve sinaptik düğmeler gibi uzantılarda da bulunur (25). Mitokondride oksidatif fosforilasyon sırasında ATP üretilirken, solunum zincirinden elektronların sızması sonucu serbest radikaller de üretilir (25, 47, 50, 76). Beyinde oksijen yüksek miktarda kullanıldığından serbest radikal üretimi de artmıştır (76).

Mitokondri solunum zincirinin bileşenlerini kodlayan genler hem çekirdek DNA'sı, hem de mitokondri DNA'sında yer alır. Mitokondri DNA'sında mutasyon hızı çekirdek DNA'sına göre 10 kat daha yüksektir. Ayrıca mitokondri DNA'sında onarım düzeneklerinin etkinliği de daha düşüktür. Beyinde mitokondri DNA'sında yaşla birlikte okside nükleotidlerin miktarında 15 kat artış bulunmuştur. Kalıtsal mitokondri DNA'sı mutasyonları ve delesyonlarının nörodejenerasyon ve inme gibi belirtilerin görüldüğü sendromlarla ilişkili olması, yaşlanma sırasında oluşan mutasyonların elektron taşıma zincirini bozarak oksidan stresi artırabileceğini düşündürmektedir (25).

4.2. Sinir Hücresi Zarının Lipid İçeriği

Beyin çok miktarda çoklu doymamış yağ asidi içerir (25, 47, 50, 76, 77). Hidroksil radikali gibi radikaller zardaki çift bağlardan kolaylıkla H^+ uzaklaştırıp lipid peroksidasyonu zincir tepkimelerini başlatabilir (25).

4.3. Beyindeki Antioksidan Savunma Sistemleri

Beyinde CAT'ın etkinliği çok düşüktür. SOD ve GPx etkinliği ise orta düzeydedir (47). SOD etkinliği insan ve sıçan beyninin hemen hemen tüm bölgelerinde görülür. Toplam SOD etkinliğinin büyük bölümü Cu,Zn-SOD'dan kaynaklanır (50, 76).

CAT'ın etkinliği karaciğer, böbrek ve eritrositlerde yüksek düzeyde iken beyinde çok düşüktür. CAT hücrelerde peroksizomlar içinde bulunur. Beyinde bulunan peroksizomlar karaciğerdekilere göre çok küçük olduğundan sıklıkla mikroperoksizom olarak adlandırılırlar. Beyinde az miktarda bulunan CAT hipotalamus ve substansiya nigra da yoğunlaşmaktadır (50).

Beyinde üretilen hidrojen peroksite çoğu büyük bir olasılıkla GPx tarafından parçalanır (50, 76). GPx beyinde yaygın bir şekilde dağılmıştır. GPx'in temel olarak nöronlardan çok glia hücrelerinde yoğunlaştığı kabul edilmektedir (76). İnsanda yapılan bir çalışmada mezensefalonda bulunan dopaminerjik nöronların GPx içermediği, bunları çevreleyen astrositlerde GPx etkinliği bulunduğu saptanmıştır (27).

GPx hidrojen peroksiti suya dönüştürürken GSH'de GSSG'ye çevrilir. GSSG glutasyon redüktaz enzimi aracılığıyla yeniden GSH'ye çevrilir. Bu tepkimeye NADPH de katılır. NADPH pentoz fosfotaz yoluyla oluşturulmaktadır. Sıçan beyin sinaptozomlarında katekolaminlerin MAO ile oksidasyonu sırasında oluşan hidrojen peroksit uzaklaştırılırken pentoz fosfotaz yolu da hızlanmaktadır.

GSH sentezinin bozulduğu doğumsal hastalıklarda şiddetli mental ve motor gerilik, epileptik nöbetlere benzer nöbetler görülmektedir (50).

E vitamini zarların iç yüzünde yoğunlaşan yağda eriyen bir antioksidandır. İnsanlarda E vitamininin eksikliği diyetle alınan yağın emiliminin bozulduğu abetaliproteinemili hastalarda incelenmiştir. Bu hastalarda görülen temel özellik, ilk on yılın sonuna doğru gelişen şiddetli ve ilerleyici nöropati ve retinopatidir. Erken başlayan E vitamini tedavisi nörolojik komplikasyonları önler. Serebellum beyin diğer bölgelerine oranla daha az E vitamini içerir (50).

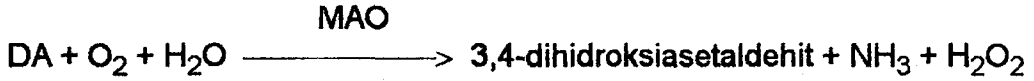
C vitamini gri cevher ve beyaz cevherde bol miktarda bulunur. Koroid pleksusta bulunan özel bir aktif taşıma sistemi BOS'daki C vitamini yoğunluğunu kana göre 10 kat artırır. Nöronlarda bulunan ikinci bir taşıma sistemi C vitaminini hücre içinde yoğunlaştırır (47, 76).

Pineal bezde üretilen melatonin güçlü bir antioksidandır (72, 76, 77). Melatonin lipidlerde ve suda eridiğinden kolaylıkla hücre içine girer. Melatonin hidroksil ve lipid radikallerini uzaklaştırarak hem lipid peroksidasyonunun başlamasını, hem de ilerlemesini önler. Melatonin bu iki etkiye sahip bilinen tek antioksidandır. Melatonin DNA ve proteinleri de serbest radikal hasarına karşı korur. Ayrıca melatonin beyin GPx etkinliğini de artırır (76, 77). Melatonin bilinen en güçlü hidroksil radikali uzaklaştırıcı antioksidandır (72).

İnsanda BOS çok az transferrin ve seruloplazmin içerir. Ayrıca BOS'da radikal tepkimelerini katalizleyen düşük moleküler ağırlıklı demir ve bakır kompleksleri bulunmaktadır. Sıçan beyinde demir tuzları serotonin reseptörlerine bağlanmasında görev alır (47, 50). İnsan beyinde globus pallidum ve substansiya nigra demirden zengindir (101). Globus pallidum ve substansiya nigrada yaşamın ilk otuz yılında demir miktarı artar.

4.4. Dopaminin Oksidasyonu

Dopaminin otooksidasyonu ya da MAO ile oksidasyonu sonucu hidrojen peroksit oluşur (22, 56, 70, 101). Dopaminin MAO ile oksidasyonu sırasında hidrojen peroksitin yanısıra 3,4-dihidroksiasetaldehit ve NH_3 de oluşur (52).



Dopaminin otooksidasyonu sırasında semikinonlar ($\text{SQ}\cdot$), süperoksit radikali ve hidrojen peroksit oluşur (52).



Sonraki basamaklarda semikinonlardan nöromelanin oluşur. Semikinonlar GSH ile birleşerek GSH konsantrasyonunu düşürür (50).

Parkinson Hastalığı temel olarak ortabeyindeki dopaminerjik nöronların yitimiyle karakterizedir. Bunun biyokimyasal sonucu striatumda dopaminin azalmasıdır. Bu hastalık öncelikle substansiya nigrada yer alan nöromelanin içeren hücreleri etkiler (27, 52). Parkinson Hastalığı'nın etyolojisi bilinmemektedir. Oksidan stresin Parkinson Hastalığı'nın etyolojisinde rol oynadığını düşündürülen çeşitli bulgular aşağıda özetlenmiştir:

a) Parkinson Hastalığı'nda lipid peroksidasyonu bulguları artmıştır (52, 56, 57).

b) Substansiya nigrada CAT ve GPx etkinliğinin azaldığını belirten yayınların (52) yanısıra, bu enzimlerin etkinliğinin normal düzeyde olduğunu belirten yayınlar da vardır (57). SOD enziminin etkinliği artmıştır (52, 57). GSH azalmıştır (52, 56, 57). SOD etkinliğindeki artış, GPx ve GSH düzeylerindeki azalma hidrojen peroksit birikimine neden olarak oksidan strese neden olabilir.

c) Substansiya nigranın demir ve ferritin içeriği artmıştır (52, 56, 57, 101).

d) Ortabeyindeki diğer katekolaminerjik n6ronların bulunduğu alanlarla karşılaştırıldığında, GPx pozitif h6crelerin yoğunluğu substansiya nigrada en azdır (27, 52).

e) Melanin içeren katekolaminerjik n6ronların dejenerasyona eğilimi fazladır. Sinir h6crelerinde n6romelaninin g6sterilmesi, bu h6crelerde serbest radikallerin oluştuğunu kanıtlamaktadır. Parkinson Hastalığı'nda substansiya nigradaki dejenere dopaminerjik n6ronların y6ksek oranda g6r6lmesi, bu h6crelerde bol miktarda serbest radikaller 6retildiğini d6ř6nd6rmektedir (52).

4.5. Serbest Radikallerin Sinaptik İletime Etkisi

Serbest radikallerle karşılaşma n6ronların işlevlerini etkiler. Hipokampal dilimlerde serbest radikaller sinaptik etkinliği azaltır ve spike 6retimini zayıflatır. Oksidan stres serebral kortikal sinaptozomlardan hasar yapıcı potansiyele sahip olan glutamat salınmasını artırır (42). Glutamatın serbest radikal hasarında rol6 olduğu 6ne s6r6lmektedir (25).

Serbest radikaller n6rotransmitterlerin resept6rlere bağlanmasını azaltmaktadır. Zarların peroksidasyonu sıçan korteksinde serotoninin resept6rlere bağlanmasını, spiroperidol6n insan beyinde kaudat ve putamendeki dopamin (D₂) resept6rlere bağlanmasını azaltır (47).

Lipid peroksidasyonu n6rotransmitterlerin geri alınması 6zerine değişik etkilere sahiptir (26).

GEREÇ VE YÖNTEM

1. DENEY DÜZENEĞİ

Zemini 1 cm aralıklarla döşenmiş, 0.3 cm kalınlığında paslanmaz çelikten, duvarları pleksiglastan yapılmış olup; eni 10 cm, boyu 21 cm, yüksekliği 17 cm'dir. Grass Model S 48 Stimülatör ve Grass Model CCU 1 Sabit Akım Birimi kullanılarak düzeneğin zeminine istenilen süre ve şiddette elektrik akımı verilebilmiştir.

2.DENEY HAYVANLARI

189.57 ± 5.92 g (Ortalama ± Standart Hata) ağırlığında erkek Rattus norvegicus Wistar sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar 12 saat aydınlık (07.00 - 19.00), 12 saat karanlık (19.00 - 07.00) ortamda, 20 ± 2 °C'de barındırılmıştır. Deney hayvanlarının standart pellet yemlerinde ve içme sularında kısıtlama yapılmamıştır.

3.DENEY

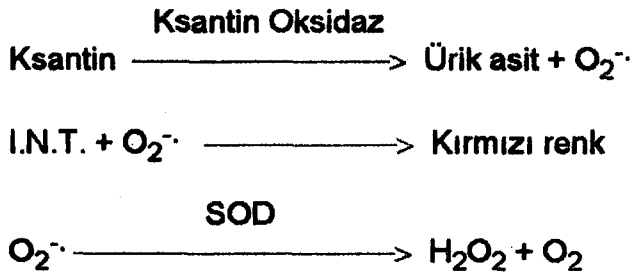
Deneyler 7'şer hayvandan oluşan 3 grupta yapılmıştır. Birinci gruptaki hayvanlara 160 ms süre ve 160 ms aralıklarla 0.2 mA şiddetinde akım verilmiş; deney 20 dak. sürmüştür (80). İkinci bir gruba deney yapılmadan 30 dakika önce 5 mg / kg intraperitoneal diazepam enjekte edilmiş; aynı deney bu grupta da yinelenmiştir (80). Üçüncü grup hiçbir işlem yapılmayan kontrollerden oluşmuştur. Deneylerin hemen bitiminde sıçanlar servikal dislokasyon yapılarak ex edilmiş; beyinleri en çok 30 saniye içinde çıkarılmıştır. Homojenizasyon sıvısı olan soğuk distile su ile beyinler hemen yıkanmış; buzla soğutulmuş zemin üzerinde prefrontal korteks en çok 1 dakika içinde çıkarılmıştır. Tüm deneyler ve kontroller 9.30 - 12.00 saatleri arasında gerçekleştirilmiştir.

4.HOMOJENİZASYON

Homojenatlar Carrillo ve arkadaşlarının yöntemine göre hazırlanmıştır (18). Prefrontal korteks darası alınmış ependorf tüpünde tartılmıştır. Beyin örnekleri homojenizatör (Potter S - B. Braun) ile 1300 devir / dakika'da, 2 ml soğuk distile su içinde homojenize edilmiştir. Homojenat ultrasonik homojenizatörde (Vibra Cell - Sonics Material) 1 dak. süreyle sonike edilmiştir. Homojenizasyon işlemleri buzla soğutulmuş ortamda yapılmıştır. Malondialdehit ölçümü için ependorf tüpüne tam homojenat alınmış, geri kalan homojenat + 4 °C'de 10000 g'de 2 dak süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatant enzim ve protein ölçümleri için ayrılmıştır. Örnekler - 70 °C'de saklanmış; ölçümler 15 gün içinde yapılmıştır.

5.SOD AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ

SOD aktivitesi Randox'un RANSOD (Kat. No. SD 125) kiti ile ölçülmüştür. SOD'un rolü, oksidatif enerji süreçleri sırasında oluşan toksik süperoksit radikalinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu sağlamaktır. Kitin çalışma yöntemi, süperoksit radikalleri oluşturmak üzere ksantin ve ksantin oksidazı kullanır. Oluşan süperoksit radikalleri 2-(4-iodophenil)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (I.N.T.) ile tepkimeye girerek, kırmızı renk oluşturur. Yöntemin temeli, bu tepkimenin SOD tarafından inhibisyon derecesine dayanır.



5.1. Spektrofotometrik yöntem

Ölçümler 505 nm dalga boyunda, 37 °C'de, Shimadzu UV-1201V spektrofotometrede yapılmıştır. 0.05 ml süpernatana 1.7 ml miyar eklenip iyice karıştırılmış; daha sonra bu karışıma 0.25 ml ksantin oksidaz eklenmiş ve aynı anda süre başlatılmıştır. 30 saniye sonra başlangıç absorbansı (A_1) ve bundan 3 dakika sonra son absorbans (A_2) okunmuştur. Aynı işlemler standart ve kör için de yapılmıştır.

5.2. Sonuçların hesaplanması:

Kör, standart ve örnekler için ΔA hesaplanmıştır.

$$\Delta A = \frac{A_2 - A_1}{3}$$

Değişik konsantrasyonlarda hazırlanan standartların ve örneklerin % inhibisyon değerleri aşağıdaki formüllerle hesaplanmıştır.

$$\% \text{ inhibisyon} = 100 - \frac{(\Delta A \text{ std. / dak.} \times 100)}{(\Delta A \text{ kör / dak.)}}$$

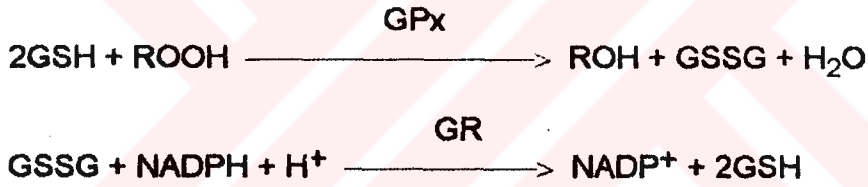
$$\% \text{ inhibisyon} = 100 - \frac{(\Delta A \text{ örn. / dak.} \times 100)}{(\Delta A \text{ kör / dak.)}}$$

Standartlardan yapılan ölçümler sonucunda, yatay eksene Ünite/ml (Ü/ml) SOD, düşey eksene % inhibisyon değerleri gelecek şekilde standart eğri hazırlanmıştır. Örneklerden yapılan ölçümlerle SOD değeri, standart eğriden Ü/ml süpernatana olarak çıkarılmıştır. Ölçülen protein miktarına göre, enzim aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplanarak Ü/mg protein olarak gösterilmiştir.

$$\text{SOD Ü / mg protein} = \frac{\text{SOD Ü / ml süpernatant}}{\text{mg protein / ml süpernatant}}$$

6. GPx AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ

GPx aktivitesi Randox'un RANSEL (Kat. No. RS 504) kiti ile saptanmıştır. Bu kit Paglia ve Valentine'in tanımladığı yönteme göre hazırlanmıştır (71). GPx, kümen hidropersit ile glutasyonun (GSH) oksidasyonunu katalizler. Glutasyon redüktaz (GR) ve NADPH varlığında, okside glutasyon (GSSG) süratla indirgenmiş formuna (GSH) çevrilir, bu sırada NADPH, NADP⁺'e okside olur. Spektrofotometrede 340 nm'de, 37 °C'de absorbansdaki azalma ölçülür.



6.1. Spektrofotometrik yöntem

0.02 ml süpernatana 1.00 ml miyar eklenip karıştırılmış; daha sonra karışıma 0.04 ml kümen hidropersit eklenmiştir. 1 dakika sonra örneğin başlangıç absorbansları Shimadzu UV-1201V spektrofotometrede okunmuş; aynı anda süre başlatılmıştır. Bundan 1 (A₁) ve 2 dakika (A₂) sonra absorbanslar okundu. Aynı işlemler kör için de yapılmıştır.

6.2. Sonuçların hesaplanması

Örnek ve kör için Δ değerleri aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\Delta (\text{örnek veya kör için}) = \frac{A_1 + A_2}{2}$$

Süpernatanın GPx konsantrasyonu aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Ü / L süpernatın} = 8412 \times \Delta A \text{ 340 nm/dak}$$

$$\Delta A = \Delta \text{ örnek} - \Delta \text{ kör}$$

Ölçülen protein miktarına göre, enzim aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplanarak Ü/mg protein olarak gösterildi.

$$\text{GPx Ü/mg protein} = \frac{\text{GPx Ü / ml süpernatın}}{\text{mg protein / ml süpernatın}}$$

7. MDA ÖLÇÜMÜ

MDA değerleri Rehncrona ve ark. yöntemine göre ölçülmüştür (75). 0.5 ml homojenat, 0.5 ml % 20'lik triklor asetik asitle karıştırılarak 10 dakika (3000 devir / dak.) santrüfuj edilmiştir. Santrüfujden sonra 0.9 ml süpernatın alınarak üzerine 1 ml % 0.67'lik tiyobarbitürik asit eklenmiştir. Örnekler kaynar su banyosunda 10 dakika bekletilmiş; soğuduktan sonra 532 nm'de absorbanslar ölçülmüştür.

MDA standardından (1, 1, 3, 3 tetraethoksiopropan) yapılan ölçümlerle, yatay eksen standart konsantrasyonunu, düşey eksen absorbans değerlerini gösterecek şekilde standart eğri grafiği hazırlanmıştır. Örneklerin MDA miktarları grafikten bulunup sonuçlar nmol/ml olarak hesaplanmıştır. Bu değer homojenatta bulunan doku miktarına bölünerek nmol/g doku olarak gösterilmiştir.

8. PROTEİN ÖLÇÜMÜ

Süpernatanın protein miktarı Markwell'in modifiye Lowry yöntemi ile saptanmıştır (66). Yöntem alkali ortamdaki iki değerlikli bakırın protein ile etkileşmesiyle oluşan, Cu^{+2} aromatik amino asitlerin (tirozin, triptofan) fosfomolibdik ve fosfotungustik asitleri (Folin-Ciocalteau reaktifi) hetero polimolibdenyuma indirgeyip mavi renkli bir kompleks oluşturmaları temeline dayanır.

8.1. Ayıraçlar

8.1.1. Reaktif A: % 2 Na_2CO_3 , % 0.4 NaOH, % 0.16 sodyum tartarat, % 1 sodyum dodesil sülfat içermektedir. 5 g Na_2CO_3 , 1.2 g NaOH, 0.04 g sodyum tartarat, 2.5 g sodyum dodesil sülfat tartılarak bidistile su ile 250 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

8.1.2. Reaktif B: % 4 $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ içerir. 2 g CuSO_4 tartılarak bidistile su ile 50 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

8.1.3. Folin Ayıracı: 2 N Folin - Ciocalteau reaktifi 1/1 oranında bidistile su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

8.1.4. Reaktif C: 100 hacim Reaktif A , 1 hacim reaktif B ile karıştırılarak taze olarak hazırlanmıştır.

8.1.5. Protein Standart Çözeltileri: Sığır serum albumini standart olarak kullanılmıştır. Bidistile su içinde 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanmıştır.

8.2. Yöntem

0.01 ml süpernatın bidistile su ile 1 ml'ye tamamlanmıştır. Kör olarak kullanılacak tüpe 1 ml bidistile su koyulmuştur. Tüplerin üzerlerine 3 ml reaktif C eklenerek 25 °C'de 30 dakika bekletilmiş; bu süre sonunda tüplere 0.30 ml

seyreltik folin ayıracı eklenerek 25 °C'de 45 dakika bekletilmiştir. Daha sonra oluşan rengin absorbansı 660 nm'de köre karşı spektrofotometrede okunmuştur. Protein miktarları, standart protein çözeltilerinin absorbansları ile konsantrasyonları arasında çizilen grafikten yararlanarak saptanmıştır.

9. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Grupların ortalamaları arasındaki fark, Microsta programında Mann Whitney-U testi kullanılarak değerlendirilmiştir.



SONUÇLAR

Kontrol grubunun sonuçları tablo 1'de, ayak şoku uygulanan grubun sonuçları tablo 2'de, ayak şokundan 30 dakika önce 5 mg/kg intraperitoneal diazepam uygulanan grubun sonuçları tablo 3'te gösterilmektedir.

SOD aktivitesi kontrol grubunda 1.064 ± 0.073 (Ortalama \pm Standart Hata: Ort \pm SH), ayak şoku uygulanan grupta 0.925 ± 0.069 , ayak şokundan 30 dakika önce 5 mg / kg intraperitoneal diazepam uygulanan grupta 1.012 ± 0.134 Ü / mg protein olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p > 0.05$) (Grafik 1).

GPx aktivitesi kontrol grubunda 0.126 ± 0.005 , ayak şoku uygulanan grupta 0.087 ± 0.009 , ayak şokundan 20 dakika önce 5 mg / kg intraperitoneal diazepam uygulanan grupta 0.138 ± 0.012 Ü / mg protein olarak bulunmuştur. Ayak şoku uygulanan grubun GPx aktivitesi hem kontrol grubu, hem de ayak şokundan 30 dakika önce 5 mg / kg intraperitoneal diazepam uygulanan gruba göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p = 0.006358$) (Grafik 2).

MDA düzeyleri kontrol grubunda 34.579 ± 6.875 , ayak şoku uygulanan grupta 47.423 ± 9.378 , ayak şokundan 20 dakika önce 5 mg / kg intraperitoneal diazepam uygulanan grupta 36.862 ± 5.667 nmol / g doku olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p > 0.05$) (Grafik 3).

TABLO 1: Kontrol grubunun sonuçları.

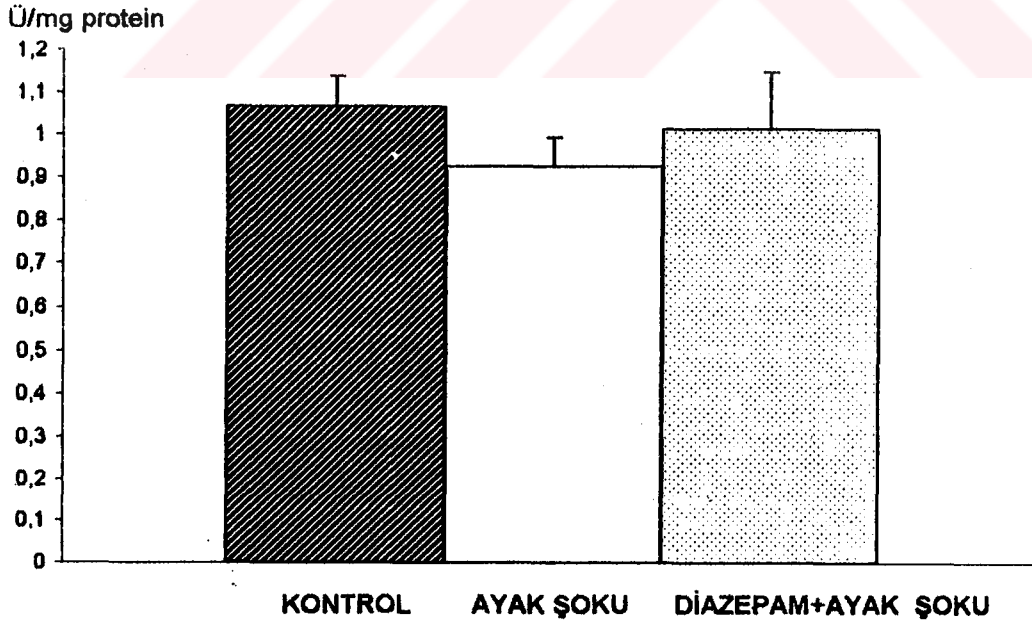
DENEK NO	SOD (Ü/mg protein)	GPx (Ü/mg protein)	MDA (nmol/g doku)
1	0.788	0.104	48.687
2	1.019	0.124	65.470
3	1.374	0.143	26.981
4	1.168	0.142	18.191
5	1.016	0.132	14.066
6	1.173	0.121	27.821
7	0.910	0.119	40.835
Ort ± SH	1.064 ± 0.073	0.126 ± 0.005	34.579 ± 6.875

TABLO 2: Ayak şoku uygulanan grubun sonuçları.

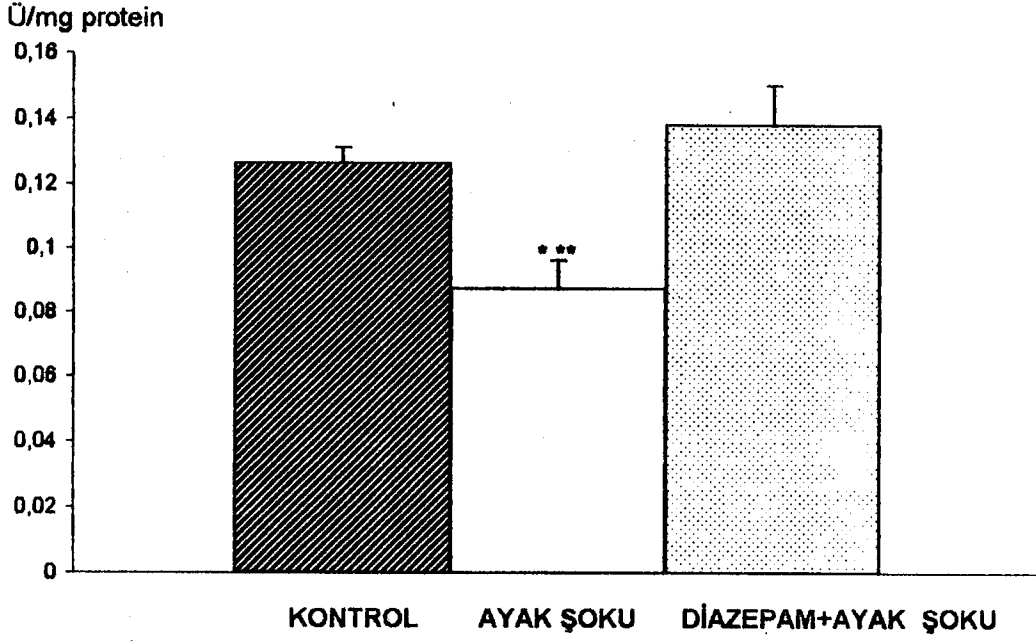
DENEK NO	SOD (Ü/mg protein)	GPx (Ü/mg protein)	MDA (nmol/g doku)
1	0.695	0.083	55.674
2	1.080	0.079	88.409
3	0.859	0.072	55.126
4	0.893	0.074	61.099
5	0.814	0.104	28.148
6	1.245	0.064	19.519
7	0.889	1.135	23.988
Ort ± SH	0.925 ± 0.069	0.087 ± 0.009	47.423 ± 9.378

TABLO 3: Ayak şokundan 30 dakika önce 5 mg / kg intraperitoneal diazepam uygulanan grubun sonuçları.

DENEK NO	SOD (Ü/mg protein)	GPx (Ü/mg protein)	MDA (nmol/g doku)
1	0.858	0.107	36.224
2	1.469	0.125	21.712
3	1.177	0.175	58.610
4	0.585	0.131	45.759
5	1.404	0.109	49.878
6	0.610	0.190	20.817
7	0.982	0.127	25.034
Ort ± SH	1.012 ± 0.134	0.138 ± 0.012	36.862 ± 5.667



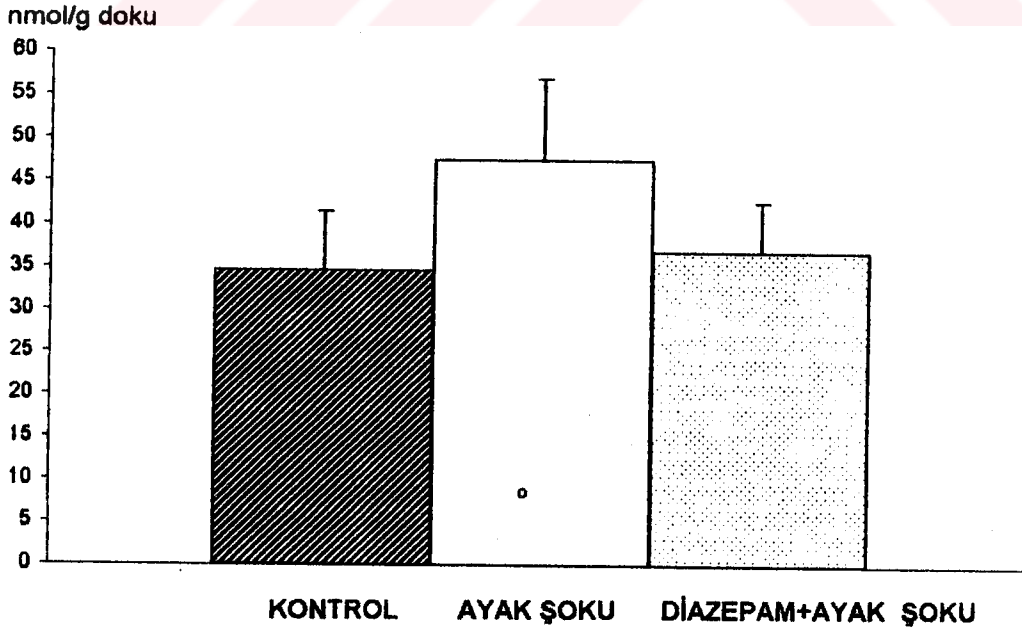
GRAFİK 1: SOD aktivitesi ölçüm değerleri. Sonuçlar Ort ± SH olarak gösterilmiştir (p > 0.05).



GRAFİK 2: GPx aktivitesi ölçüm değerleri.

*: Ayak şoku uygulanan grup kontrolden farklıdır ($p=0.006358$).

**:.Ayak şoku uygulanan grup ayak şokundan 30 dakika önce 5 mg / kg intraperitoneal diazepam uygulanan gruptan farklıdır ($p=0.006358$).



GRAFİK 3: MDA değerleri ($p > 0.05$).

TARTIŞMA

Dopaminerjik sinir uçlarında bulunan dopaminin büyük bir kısmı veziküllerde depolanırken çok az bir kısmı da sitoplazmada bulunur. Sitoplazmada bulunan dopamin mitokondrinin dış zarında bulunan MAO enzimi aracılığı ile metabolize edilir. Dopaminin yıkılması sırasında dihidroksifenilasetaldehitin yanı sıra amonyak ve hidrojen peroksit oluşur (22, 56, 70, 101). Hidrojen peroksit daha sonra hücreler için çok toksik olan hidroksil radikaline dönüşür. Hidroksil radikali hücredeki tüm moleküllerle tepkimeye girerek hücre hasarına neden olabilir. Dopaminin MAO tarafından yıkılması hücreler için potansiyel bir biyolojik stresör olabilir.

Dopaminin yıkılması sırasında oluşan hidrojen peroksit GSH tarafından GSSG'ye dönüştürülür. GSSG de glutatyon redüktaz aracılığı ile yeniden GSH'ye çevrilir. GSSG etkin bir şekilde GSH'ye çevrildiği için beyin dokusunda toplam glutatyonun (GSH + GSSG) yalnızca % 1'i GSSG'dir (87).

Spina ve Cohen presinaptik DA yıkımını artırmak için rezepin kullanmışlardır. Rezerpin sitozoldeki dopaminin veziküller içine taşınmasını engelleyerek dopaminin depolanmasını önler. Sonuç olarak dopaminin MAO tarafından yıkılması hızlanır. Bu etki nöronal aktivitenin artışına benzer. Nöronal aktivitenin artışı transmitter salınması ve geri alımını artırarak dopaminin presinaptik yıkımını hızlandırır (86, 87).

Spina ve Cohen intraperitoneal rezepin enjeksiyonunun striatumda GSSG düzeyini artırdığını göstermiştir. Rezerpinden önce seçici MAO-A inhibitörü olan klorjilin enjeksiyonu GSSG artışını baskılamıştır. Yalnız başına

klorjilin enjeksiyonu GSSG düzeylerini değiştirmemiştir. Rezerpin dopaminin metabolitlerini striatumda anlamlı düzeyde artırmıştır. Frontal korteks GSSG düzeylerinde fark bulunmamıştır. Ancak bu çalışmada frontal kortekste dopamin metabolitleri ölçülmemiştir. GSSG düzeylerinin frontal kortekste artmaması, katekolaminerjik nöron terminallerinin bu bölgede striatuma göre daha az bulunmasına bağlanmıştır (86).

Rezerpinin *invivo* olarak striatal GSSG düzeyini arttırdığı izole sinir uçlarında yapılan deneylerde de *invitro* olarak desteklenmektedir. Striatal sinaptozomlar rezerpin + L-DOPA ya da rezerpin + dopamin ile inkübe edildiklerinde GSSG düzeyleri anlamlı olarak artmıştır. Bu sonuçlar rezerpinize sinir uçlarında hem eksojen dopaminin sinir ucuna alınmasının hem de L-DOPA' dan yeni dopamin sentezinin hidrojen peroksit düzeyini artırdığını kanıtlamaktadır. Sinaptozomların klorjilin ile preinkübasyonu GSSG artışını önlemiştir (87).

Dopaminin metabolizmasının artırılmasının bir başka yolu da haloperidol enjeksiyonudur. Haloperidol enjeksiyonu DOPAC ve HVA düzeylerini artırır. Farelere haloperidol enjeksiyonundan bir saat sonra striatumda GSSG düzeyinin arttığı gösterilmiştir. Ancak daha önce MAO-B inhibitörü olan deprenil enjeksiyonu bu artışı anlamlı ölçüde baskılamıştır. Yalnız başına deprenil enjeksiyonu striatumdaki GSSG düzeyini etkilememiştir (23).

Başka bir çalışmada haloperidolün striatum ve kortekste GSH düzeyini düşürdüğü MDA düzeyini artırdığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada haloperidol striatumda GSSG düzeylerini de artırmıştır. Bu çalışmada korteks GSSG düzeylerine bakılmamıştır (82).

Yukarıdaki tüm çalışmalar dopaminin metabolizmasının artmasının oksidan strese neden olduğunu göstermektedir.

Şiddet ve süresine bağlı olarak stres değişik dopaminerjik sistemlerin etkinliğini artırır. Thierry ve ark. (92) hafif ayak şoku stresinin anteromedial prefrontal kortekste sonlanan dopaminerjik aksonların biyokimyasal aktivasyonuna neden olduğunu göstermiştir. Stresle karşılaşma prefrontal kortekste dopamin kullanımında belirgin bir artışa neden olmuştur. Daha az da olsa nükleus akkumbenste de dopamin kullanımında artış gözlenmiş, olfaktor tüberkül ve striatumda herhangi bir değişiklik bulunmamıştır. Daha sonra yapılan çok sayıda çalışma bu bulguları destekler niteliktedir. Bu çalışmalarda belirgin kaçma davranışı ve bağırma oluşturmayacak şiddetteki ayak şoku (38, 80), koşullu korku (35), yiyecekte yoksun bırakılma (16), psikolojik stres (59) gibi hafif streslerle karşılaşmanın prefrontal kortekste sonlanan dopaminerjik sistemin metabolik etkinliğini artırdığı gösterilmiştir. Hafif şiddette ayak şoku stresi prefrontal kortekste dopamin metabolitleri DOPAC ve HVA'nın düzeylerini, DOPAC/DA oranını artırmıştır (38, 80). Diğer dopaminerjik bölgelerde herhangi bir değişiklik saptanmamıştır. Deutch ve arkadaşları (35) daha önce işitsel uyarı ve ayak şoku verilerek koşullandırılan sıçanlarda, ayak şoku uygulanmadan yalnızca işitsel uyarının verilmesinin prefrontal kortekste DOPAC düzeyini artırdığı, diğer dopaminerjik sonlanma bölgelerinde değişiklik olmadığını saptamışlardır.

24 saat yiyecekte yoksun bırakılma sadece prefrontal kortekste DOPAC ve DOPAC/DA oranını artırmıştır. Hafif ayak şokundaki dopamin metabolizmasındaki benzer değişiklikler görüldüğünden, yiyecekte yoksun bırakılma stresör olarak kabul edilmektedir (16).

Kaneyuki ve ark. (59) 30 dakikalık psikolojik stresin sıçanlarda medial prefrontal kortekste DOPAC düzeyini artırdığı diğer dopaminerjik sonlanma bölgelerinde değişiklik olmadığını göstermişlerdir. Bu çalışmada sıçanların bir grubuna yüksek şiddette elektrik akımı verilmiştir, psikolojik strese sokulacak olan sıçanlara ise elektrik akımı verilmemiştir. Yüksek şiddette elektrik akımı alan sıçanların bağıрма, sıçrama, idrar yapma ve dışkılamasıyla karşılaşan sıçanlar psikolojik strese girmiştir.

Hafif ayak şoku (34, 38, 80, 92) dışında, engellenme stresi (17, 39, 54, 62), koşullu korku (20, 35, 53), yiyecekte yoksun bırakılma (16), psikolojik stres (59) prefrontal korteks dopamin metabolizmasını artırır. Bu nedenle hafif ayak şokundaki dopamin metabolizması artışı ağırlı uyaranlara bağlanamaz.

Koşullu korku, psikolojik stres gibi hafif şiddetli stresörlerle karşılaştıktan sonra seçici olarak prefrontal kortekste dopaminin kullanımı artar. Ancak daha yüksek şiddette (örneğin artmış akım şiddetinde ayak şoku) ya da daha uzun süreyle (uzamış engellenme stresi) stresle karşılaşma bu seçiciliği ortadan kaldırır. Stresin süre ya da şiddetinde artış nükleus akkumbens gibi mezolimbik alanlarda (daha şiddetli stresler striatumda da) dopaminin metabolizmasını artırır (34, 38, 39, 80).

Bu çalışmada 0.2 mA şiddetinde 160 ms süre, 160 ms aralıklarla toplam 20 dakika elektrik akımı uygulanmıştır. Bu şiddette elektrik akımıyla karşılaşan sıçanlarda belirgin kaçma davranışı ve bağıрма gözlenmemiştir. Akım şiddeti 0,3-0,4 mA'e çıkarıldığında sıçrama ve bağıрма davranışları görülür. Bu çalışmada kullanılan akım şiddeti; psikolojik stres, koşullu korku ve yiyecekte yoksun bırakılma gibi ağırlı uyaranın bulunmadığı deneylerde olduğu gibi yalnızca prefrontal kortekste dopamin metabolizmasını artırır. Roth ve ark. (80)

aynı şiddette elektrik akımı kullanarak sıçanlarda yaptığı çalışmada prefrontal kortekste DOPAC düzeyini artmış bulmuş, diğer dopaminerjik nöronların sonlanma bölgelerinde herhangi bir değişiklik saptamamışlardır. Dunn ve ark. (38) farelerde 0.18 mA akım şiddetinde yaptığı deneylerde sadece prefrontal kortekste DOPAC düzeyini artmış bulmuşlardır. Daha yüksek akım şiddetiyle yapılan deneylerde diğer dopaminerjik sonlanma bölgelerinde de dopaminin metabolizmasının arttığı gösterilmiştir (20, 34, 38).

Stresle prefrontal korteks dopamin metabolizmasının uyarılması benzodiazepin agonistleri gibi klinikte etkili anksiyolitiklerin daha önce verilmesiyle önlenabilir. Diazepamın, prefrontal korteks ve mezolimbik bölgede stresin neden olduğu dopamin sentez ve metabolizmasındaki artışı önlediği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (20, 34, 53, 59, 63, 80). Benzodiazepinlerin tam tersi fizyolojik etkilere sahip olan anksiyojenik benzodiazepin ters agonistleri prefrontal kortekste stresle oluşturulan dopamin yanıtına benzer bir metabolik yanıt oluşturur. Anksiyojenik ters agonistler prefrontal kortekste dopamin metabolizmasını artırırken diğer bölgelerde bir değişiklik oluşturmazlar (90, 91). Bu verilerin tümü, benzodiazepin/ γ -aminobütirik asit (GABA) tanıma bölgelerinin mezoprefrontal dopamin nöronları üzerinde güçlü ve seçici düzenleyici etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir. Ventral tegmental alanda yer alan dopaminerjik nöronların gövdelerinde benzodiazepin/GABA reseptörleri bulunmaktadır. GABAerjik sinyallerin dopaminerjik nöronların aktivitesini düzenlediği düşünülmektedir (34, 80, 90).

Bu çalışmada stresin prefrontal korteks süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi düzeylerine etkisi ile lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyi araştırılmıştır. Deneylerde uygulanan şiddette

elektrik akımı seçici olarak prefrontal kortekste dopaminin yıkımını artırır (80). Her dopamin molekülü yıkılırken 1 mol hidrojen peroksit oluşur. Hidrojen peroksit geçiş metalleri ile birleşerek hücreler için çok zararlı olan hidroksil radikalini oluşturabilir. Bu nedenle stres sırasında prefrontal kortekste dopaminin yıkımının artması hidroksil radikali oluşumunu artırarak oksidan strese neden olabilir. Bu çalışmada 20 dakika süre ile aralıklı olarak uygulanan ayak şoku prefrontal korteks GPx aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. GPx hidrojen peroksitin suya dönüştürülmesinde görevli bir enzim olduğundan, aktivitesinde azalma enzimin kullanılmasına bağlı olabilir. Hidrojen peroksit oluşturan bir başka kaynak SOD enzimidir. SOD süperoksit radikalinin dismutasyonunu katalizleyerek hidrojen peroksit oluşturur. Bu çalışmada SOD aktivitesinde bir değişiklik saptanmaması, stresin süperoksit radikali aracılığıyla hidrojen peroksit oluşumuna katkıda bulunmadığı şeklinde yorumlanabilir. Stresten 30 dakika önce diazepam uygulanmasının prefrontal kortekste dopaminin yıkımını önlediği çok sayıda çalışmada gösterilmiştir (20, 34, 53, 63, 80). Ayak şokundan 30 dakika önce 5 mg/kg intraperitoneal diazepam yapılan sıçanlarda GPx aktivitesi kontrollerden farklı bulunmamıştır. Bu grupta SOD aktivitesinde de bir değişiklik saptanmamıştır. Ayak şokundan önce diazepam yapılan sıçanlarda GPx aktivitesindeki düşmenin önlenmesi, diazepamın prefrontal kortekse gelen dopaminerjik nöronların aktivitesini azaltarak daha fazla hidrojen peroksit oluşumunu önlemesine bağlanabilir. Deneylerden çıkan sonuçlar stresin hidrojen peroksit oluşumunu artırarak GPx aktivitesinde azalmaya neden olduğunu düşündürmektedir.

Deneylerde lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Ancak

stres uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, MDA düzeylerinde artış saptanmıştır. MDA düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın saptanmaması prefrontal korteksin antioksidan savunma kapasitesinin hafif şiddette stresin yaratabileceği oksidan stresle başa çıkabileceğini düşündürmektedir.

Haan ve ark. farelerde yaptıkları çalışmada yaşlanma ile birlikte SOD aktivitesinde doğrusal bir artış bulmuş, GPx aktivitesinde ise doğrusal bir artış bulmamış; yaşla birlikte lipid peroksidasyonunda da artış bulmuşlardır (46). Araştırmacılar SOD aktivitesindeki artışın süperoksit radikalinde artışın sonucu olabileceğini; SOD aktivitesindeki artışa paralel olarak GPx aktivitesinde artışın bulunmaması hidrojen peroksitin daha toksik olan hidroksil radikaline dönüşerek lipid peroksidasyonuna neden olabileceğini öne sürmüşlerdir. İnsan beyinde yapılan çalışmalar SOD aktivitesindeki artışın GPx aktivitesinde artışa neden olmadığını göstermiştir. Bu sonuç diğer dokulardaki sonuçların tersinedir. Diğer dokularda SOD aktivitesindeki artışa paralel olarak GPx aktivitesinde artış görülmektedir. Bu durum uyum yanıtı olarak adlandırılır. Bu araştırmalar beyin dokusunda GPx aktivitesinin artmış hidrojen peroksite uyum yanıtı göstermediğini düşündürmektedir (46). Down Sendromunda da beyinde SOD aktivitesinde artma görülürken, GPx aktivitesinde bir değişiklik saptanmamıştır. Artmış hidrojen peroksit üretiminin Down sendromu etyolojisinde rol oynadığı sanılmaktadır (40). Hidrojen peroksit artışına uyum yanıtı olarak beyinde GPx aktivitesinde artış bulunmaması kronik strese önemli olabilir. Bu nedenle kronik stresin GPx aktivitesi ve MDA düzeylerine etkisinin araştırılması planlanmaktadır.

Prefrontal korteks motivasyon, planlama, davranışın organizasyonu, dikkat ve sosyal davranışla ilgilidir. Şizofrenide görülen negatif belirtiler frontal lobun, özellikle prefrontal korteksin cerrahi olarak çıkarılmasından doğan belirtiler ile benzerlikler gösterir. Dorsal prefrontal korteksin kaybından sonra hastalar düz bir duygulanıma sahiptir; motivasyonu, planlamaları zayıflar (58).

Bölgesel beyin kan akımı çalışmaları şizofrenide frontal lob disfonksiyonu olduğu görüşünü destekler niteliktedir. Çok sayıda çalışmada, şizofrenlerde frontal loba olan kan akımı azalmış bulunmuştur. Entellektüel işlerde normal kişilerde frontal lob kan akımı artarken şizofrenlerde artmaz (3).

Brozoski ve ark. (12) maymunlarda 6-hidroksidopamin kullanarak prefrontal kortekse gelen dopaminerjik sinir uçlarını tahrip etmişlerdir. Prefrontal kortekste dopaminin tüketilmesi maymunlarda bilişsel performansı ölçen gecikmiş yanıt testinde yetersizliğe neden olur. Bu durum prefrontal korteksin çıkarılmasıyla görülen etkilerle benzerlikler gösterir. Dopamin prekürsörü L-DOPA ya da dopamin agonisti apomorfine verilerek bilişsel kayıp önlenir .

İnsanlarda Wisconsin Kart Seçme Testi prefrontal korteksin bilişsel işlevlerini ölçer. Normal kişilerde bu test sırasında dorsolateral prefrontal kortekse olan kan akımı artarken, şizofrenlerde test sırasında kan akımında değişiklik görülmemiştir (96, 97).

Bilgisayarlı tomografi ile yapılan çalışmalarda şizofrenlerde frontal korteks atrofisi saptanmıştır (95).

Yakın zamanda manyetik rezonans görüntüleme tekniği ile yapılan bir çalışmada şizofrenlerin kontrollere göre daha küçük beyin hacmine sahip olduğu gösterilmiştir. Ancak yapılan bölgesel ölçümler sonucunda yalnızca frontal lob dokusunda görece bir azalma saptanmıştır (4).

Weinberger prefrontal kortikal dopaminerjik aktivitedeki azalmanın şizofreninin negatif belirtilerine, mezolimbik bölgedeki dopaminerjik aktivitedeki artışın pozitif belirtilere neden olduğunu öne sürmüştür. Weinberger mezokortikal yoldan prefrontal kortekse gelen dopaminerjik nöronların mezolimbik dopaminerjik sistem üzerinde inhibitör etkisi olduğunu; prefrontal kortekste dopaminerjik aktivitenin azalması durumunda bu inhibisyonun ortadan kalkarak mezolimbik dopaminerjik sistemde aşırı aktiviteye neden olduğunu öne sürmektedir (95). Davis ve ark. şizofrenlerde daha önce yapılan çalışmaları inceleyerek yaptıkları derlemede, bu görüşü destekler sonuçlar ortaya koymuşlardır (30).

Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda mezolimbik ve mezokortikal sistemler arasında karşılıklı etkileşimler olduğunu destekleyen kanıtlar vardır. Pycoc ve ark. sıçanlarda 6-hidroksidopamin kullanarak prefrontal kortekse gelen dopaminerjik sinir uçlarını tahrip ettikleri çalışmalarında, nükleus akkumbens ve striatumda dopamin metabolitleri ve reseptör sayısında artış bulmuşlardır (73). Benzer şekilde yapılan çalışmaların bir kısmında bu sonuçlar desteklenirken diğerlerinde aynı sonuçlar alınamamıştır (32). Deutch ve ark. prefrontal kortikal dopaminerjik sinir uçlarının tahribinin nükleus akkumbensin strese verdiği yanıtı değiştirdiğini göstermişlerdir. Hafif şiddette ayak şoku kontrol grubunda prefrontal kortekste DOPAC düzeyini artırırken nükleus akkumbens ve striatumda bir değişiklik saptanmamıştır. Ancak prefrontal korteks lezyonu olan sıçanlarda nükleus akkumbenste DOPAC düzeyi artmış bulunmuştur (33). Jaskiw ve ark. ibotenik asit kullanarak prefrontal korteksi lezyona uğrattıkları çalışmalarında hafif subkronik stresin nükleus akkumbenste dopamin ve metabolitlerini artırdığını göstermişlerdir (55). Rosin ve ark.

prefrontal korteks lezyonunun nükleus akkumbens ve striatumda bazal dopaminerjik tonusu değiştirmediğini ancak bu nöronların haloperidole verilen yanıtı artırdiğını göstermişlerdir (79). Yukarıdaki çalışmalar prefrontal kortikal dopaminerjik sistem lezyonunun bazal dopaminerjik tonusu değiştirmese de, mezolimbik sistemin strese verdiği yanıtı şiddetlendirdiğini ortaya koymaktadır.

şizofrenide prefrontal kortekste dopaminerjik aktivitenin azalmasının nedeni bilinmemektedir. şizofreninin ortaya çıkış ve alevlenmelerinde stresin önemli bir yeri vardır (95). Stres prefrontal kortekste hidrojen peroksit üretimini artırdiğından hidroksil radikali aracılığıyla doku hasarına neden olabilir. Hidrojen peroksit kolaylıkla hücre zarından geçebildiğinden hem dopaminerjik nöronlarda hem de çevresindeki hücrelerde hidroksil radikali oluşturabilir. Buckman ve ark. şizofrenlerde yaptıkları iki ayrı çalışmada eritrosit ve trombosit GPx aktivitesi ile beyin atrofisi arasında negatif korelasyon bulmuşlardır. Araştırmacılar genetik olarak düşük GPx aktivitesine sahip olan bireylerin doku hasarına daha duyarlı olacaklarını; hiperoksi, virüs ya da toksinlerle karşılaşma, şiddetli emosyonel stres gibi nedenlerin serbest radikalleri oluşturarak doku hasarına neden olabileceğini öne sürmüşlerdir (13, 14). Reddy ve ark. şizofrenlerde eritrosit GPx aktivitesinde bir değişiklik bulmamışken (74), Abdalla ve ark. ilaç almayan kadın şizofrenlerde eritrosit GPx aktivitesinde düşme saptamışlardır (1).

Frontal korteks GPx aktivitesi beynin diğer bölgelerine göre daha düşüktür (5, 19, 68). Bu çalışmada hafif şiddette ayak şoku prefrontal korteks GPx aktivitesinde düşmeye, MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artmaya neden olmuştur. Stres prefrontal korteksde beynin diğer bölgelerine göre daha düşük olan GPx aktivitesini daha da düşürdüğünden, genetik olarak düşük GPx aktivitesi ya da beyinde yüksek düzeyde geçiş metallere sahip olan

bireylerde hidrojen peroksitten hidroksil radikali oluşturarak doku hasarına neden olabilir.

Bu çalışmada 20 dakikalık stresin bitiminden hemen sonra öldürülen hayvanların prefrontal korteksinden hazırlanan homojenatlardan ölçümler yapılmıştır. İleride yapılacak çalışmalarda stres sona erdirildikten sonraki dönemde enzim aktiviteleri ve MDA düzeylerinde ne gibi değişiklikler olduğunun araştırılması planlanmaktadır. Daha uzun süre ve şiddette yapılacak stres deneyleri, stres ile oksidan stres arasındaki ilişkinin araştırılmasında yararlı sonuçlar verebilir. Ayrıca kronik stresin etkileri de araştırılması gerekli konulardandır. Stuphin ve ark. düşük selenyum içeren diyetle beslenen farelerde beyin GPx aktivitesinde yaklaşık olarak % 50 azalma saptamışlardır (89). Bu nedenle selenyumdan fakir diyetle beslenen hayvanlarda yapılacak stres deneyleri stres ile oksidan stres arasındaki ilişkinin araştırılmasında çok değerli sonuçlar verebilir.

1980 ve sonraki yılları içeren Medline taramasında prefrontal kortekste stres ile oksidatif stres ilişkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmanın sonuçları başka çalışmalarla karşılaştırılamamıştır.

Bu çalışmada hafif ayak şoku stresinin prefrontal kortekste GPx aktivitesini düşürdüğü, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da MDA düzeylerini artırdığı saptanmıştır. Bu bulgular prefrontal korteksin hafif şiddette stresin neden olduğu hidrojen peroksit artışını tolere edebileceğini düşündürmektedir. Prefrontal kortekste stres ile oksidan stres arasındaki ilişkinin aydınlatılabilmesi için yukarıda açıklandığı gibi çeşitli araştırmaların yapılması gerektiği kanısına varılmıştır.

ÖZET

Organizmada serbest radikaller ve hidrojen peroksit sabit bir hızla üretilir. Serbest radikallerin zararlı etkileri antioksidan savunma sistemleri tarafından azaltılır. Organizma normal hızda üretilen serbest radikallere karşı yeterli düzeyde antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Bununla birlikte antioksidan savunma kapasitesinin büyük bir yedeği yoktur. Serbest radikal üretimi ile antioksidan savunma sistemleri yaklaşık olarak dengededir. Dengenin bozulması oksidan stres olarak adlandırılır.

Dopamin monoamino oksidaz tarafından metabolize edilir ve ürün olarak hidrojen peroksit oluşur. Sinir hücreleri için zararlı bir bileşik olan hidrojen peroksit glutatyon peroksidaz tarafından uzaklaştırılır. Bu nedenle dopaminin metabolizması oksidan strese neden olabilir. Birçok çalışmada, prefrontal kortekste sonlanan mezokortikal dopamin nöronlarının strese yanıt olarak aktive olduğu gösterilmiştir. Ayak şoku bu nöronlarda dopaminin metabolizmasını artırır; benzodiazepinler dopaminin metabolizmasındaki artışı önlerler.

Bu çalışmada hafif şiddette 20 dakika süreyle uygulanan ayak şoku, sıçan prefrontal korteksinde glutatyon peroksidaz aktivitesini anlamlı olarak azaltmıştır ($p=0.006358$). Süperoksit dismutaz aktivitesi ve malondialdehit düzeylerinde anlamlı değişiklik gözlenmemiştir. 5 mg / kg intraperitoneal diazepam prefrontal kortikal glutatyon peroksidaz aktivitesindeki strese uyarılmış düşmeyi önlemiştir ($p=0.006358$).

Bu bulgular prefrontal korteksin hafif şiddette stresin neden olduğu oksidan stresi tolere edebildiğini düşündürmektedir.

ABSTRACT

Free radicals and hydrogen peroxide are constantly produced in the organism. Damaging effects of free radicals are diminished by the action of antioxidant defence systems. The organism has just sufficient antioxidant defence systems to balance the normal rate of production of free radicals. However, there is no great reserve of antioxidant defence capacity. Generation of free radicals and the level of antioxidant defence systems are approximately balanced. The imbalance is called oxidative stress.

Dopamine is metabolized by monoamine oxidase, and hydrogen peroxide is produced as a product. Hydrogen peroxide that is hazardous to neurons is scavenged by glutathione peroxidase. Hence, metabolism of dopamine may be associated with an oxidative stress. Several studies have demonstrated that the mesocortical dopamine neurons projecting to the prefrontal cortex are activated in response to stress. Footshock increases dopamine metabolism in these neurons, and benzodiazepines antagonise the increase in dopamine metabolism.

In this study, mild-intensity intermittent footshock for 20 min. significantly decreased glutathione peroxidase activity in the rat prefrontal cortex ($p=0.006358$). Significant changes in superoxide dismutase activity and malondialdehyde levels were not observed. Diazepam (5 mg / kg intraperitoneal) antagonized stress-induced decrease in prefrontal cortical glutathione peroxidase activity ($p=0.006358$).

The results of this study suggested that, prefrontal cortex can tolerate the oxidative stress produced with mild stress.

KAYNAKLAR

1. Abdalla D. S. P., Montelro H. P., Oliviera J. A. C., Bechara E. J. H. Activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in schizophrenic and manic-depressive patients. *Clinical Chemistry* 1986; 32, 805-807.
2. Al-Turk W. A., Stohs S. J., El-Rashidy F. H., Othman S., Shaheen O., Changes in glutathione reductase and glutathione-S-Transferase as a function of cell concentration and age. *Pharmacology* 34: 1-8, 1987.
3. Andreasen N. C. Brain imaging: Applications in psychiatry. *Science* 1988; 239, 1381-1388.
4. Andreasen N. C., Flashman L., Flaum M., Arndt S., Swayze V., O'Leary D. S., Ehrhardth J. C., Yuh W. T. C. Regional brain abnormalities in schizophrenia measured with magnetic resonance imaging. *JAMA* 1994; 272, 1763-1769.
5. Ansari K. A., Kaplan E., Shoeman D., Age-related changes in lipid peroxidation and protective enzymes in the central nervous system. *Growth. Development and Aging* 1989; 53, 117-121.
6. Aruoma O. I., Halliwell B., Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron, *Biochem. J.* 1987; 241, 273-278.
7. Bannon M. J., Roth R. H. Pharmacology of mesocortical dopamine neurons. *Pharmacological Reviews* 1983; 35, 53-68.

8. Bast A., Haenen G. R. M. M., Doelman C. J. A., Oxidants and antioxidants: state of the art. *The American Journal of Medicine* 1991; 91 (Suppl 3C), 2S-13S.
9. Beckstad R. T., Domesick V. B., Nauta W. J. H. Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Brain Research* 1979; 175, 191-217.
10. Benzi G., Pastoris O., Villa R. F. Changes induced by aging and drug treatment on cerebral enzymatic antioxidant system. *Neurochemical Research* 1988; 13, 467-478.
11. Blum J., Fridovich I., Inactivation of Glutathione Peroxidase by superoxide radical, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1985; 240,500-508.
12. Brozoski T. J., Brown R. M., Rosvold H. E., Goldman P. S. Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in prefrontal cortex of rhesus monkey. *Science* 1979; 205, 929-932.
13. Buckman T. D., Kling A. S., Eiduson S., Suthpin M. S., Steinberg A., Glutathione peroxidase and CT scan abnormalities in schizophrenia. *Biological Psychiatry* 1987; 22, 1349-1356.
14. Buckman T. D., Kling A. S., Suthpin M. S., Steinberg A., Eiduson S., Platelet glutathione peroxidase and monoamine oxidase activity in schizophrenics with CT scan abnormalities: Relation to psychosocial variables. *Psychiatry Research* 1990; 31, 1-14.
15. Burk R.F., Protection against free radical injury by selenoenzymes. *Pharmac. Ther.* 1990; 45, 383-385.

16. Carlson J. N., Herrick K. F., Baird J. L., Glick S. D. Selective enhancement of dopamine utilization in the rat prefrontal cortex by food deprivation. *Brain Research* 1987;400, 200-203.
17. Carlson J. N., Fitzgerald L. W., Keller R. W., Glick S. D. Side and region dependent changes in dopamine activation with various durations of restraint stress. *Brain Research* 1991;550, 313-318.
18. Carrillo M. C., Kanai S., Nokubo M., Kitani K. (-) Deprenyl induces activities of both superoxide dismutase and catalase but not of glutathione peroxidase in the striatum of young male rats. *Life Sciences* 1991; 48, 517-521.
19. Ciriolo M. R., Fiskin K., De Martino A., Corasaniti M. T., Nistico G., Rotillo G. Age-related changes in Cu,Zn superoxide dismutase, Se-dependent and -independent glutathione peroxidase and catalase activities in specific areas of rat brain. *Mechanism of Ageing and Development* 1991; 61, 287-297.
20. Claustre Y., Rivy J. P., Dennis T., Scatton B. Pharmacological studies on stress-induced increase in frontal cortical dopamine metabolism in the rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1986; 238, 693-700.
21. Clarke D. D., Sokoloff L. Circulation and energy metabolism of the brain. *Basic Neurochemistry* Ed: Siegel G. J., Agranoff B. W., Albers R. W., Molinoff P. B. Fifth edition, Raven Press, New York. 1994; 645-680.
22. Cohen G., Monoamine oxidase, hydrogen peroxide, and Parkinson's disease. *Advances in Neurology* 1986; 45, 119-125.
23. Cohen G., Spina M. B., Deprenyl suppresses the oxidants stress associated with increased dopamine turnover. *Annals of Neurology* 1989; 26, 689-690.

24. Commissiong J. W. Monoamine metabolites: Their relationship and lack of relationship to monoaminergic neuronal activity. *Biochemical Pharmacology* 1985; 34, 1127-1131.
25. Coyle J.T., Puttfarcken P., Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders, *Science* 1993; 262, 689-695.
26. Dabrowiecki Z., Gordon-Majszak W., Lazarewicz J. Effects of lipid peroxidation on neurotransmitters uptake by rat synaptosomes. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* 1985; 37, 325-331.
27. Damier P., Hirsch E. C., Zhang P., Agid Y., Jayov-Agid F. Glutathione peroxidase, glial cells, Parkinson's disease. *Neuroscience* 1993; 52, 1-6.
28. Davies K. J. A., Sevanian A., Muakkassah-Kelly S. F., Hochstein P., Uric acid-iron ion complexes, *Biochem. J.* 1986; 235, 747-754.
29. Davies K. J. A., Protein damage and degradation by oxygen radicals, *The Journal of Biological Chemistry*, 1987; 262, 9895-9901.
30. Davis K. L., Kahn R. S., Ko G., Davidson M. Dopamine in schizophrenia: A review and reconceptualization. *Am. J. Psychiatry* 1991; 148, 1474-1486.
31. Deby C., Goutier R., New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochemical Pharmacology* 1990; 39, 399-405.
32. Deutch A.Y. Prefrontal cortical dopamine systems and elaboration of functional corticostriatal circuits: Implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *J. Neural Transm. (GenSect)* 1993; 91, 197-221.
33. Deutch A.Y., Clark W. A., Roth R. H. Prefrontal cortical dopamine depletion enhances the responsiveness of mesolimbic dopamine neurons to stress. *Brain Research* 1990; 521, 311-315.

34. Deutch A.Y., Roth R. H. The determinants of stress-induced activation of the prefrontal cortical dopamine system. *Progress in Brain Research* 1990; 85, 367-403.
35. Deutch A.Y., Tam S-Y., Roth R. H. Footshock and conditioned stress increase 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in the ventral tegmental area but not substantia nigra. *Brain Research* 1985; 333, 143-146.
36. Dizdaroğlu M., Chemistry of free radical damage to DNA and nucleoproteins. *DNA and Free Radicals*, Ed: Halliwell B., Aruoma O. I., Ellis Horwood, New York, 1993; 19-39.
37. Draper H. H., Hadley M., A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde. *Xenobiotica* 1990; 20, 901-907.
38. Dunn A. J. Stress-related activation of cerebral dopaminergic systems. *Annals New York Academy of Sciences* 1988; 537, 188-205
39. Dunn A. J., File S. E. Cold restraint alters dopamine metabolism in frontal cortex, nucleus accumbens and neostriatum. *Physiology and Behaviour* 1983; 31, 511-513.
40. Evans P. H., Free radicals in brain metabolism and pathology. *British Medical Bulletin* 1993; 49, 577-587.
41. Fridovich I., Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1987; 23, 239-257.
42. Gilman S. C., Bonner M. J., Pellmar T. C. Effect of oxidative stress on excitatory amino acid release by cerebral cortical synaptosomes. *Free Radical Biology and Medicine* 1993; 15, 671-675.

43. Glowinski J., Tassin J. P., Thierry A. M., The mesocortico-prefrontal dopaminergic neurons. *TINS* November 1984; 415-418.
44. Gutteridge J. M. C. Lipid peroxidation initiated by superoxide-dependent hydroxyl radicals using complexed iron and hydrogen peroxide. *FEBS* 1984; 172, 245-249.
45. Gutteridge J. M. C., Halliwell B. *Antioxidants in Nutrition, Health, and Disease* First edition, Oxford University Press, New York. 1994.
46. Haan J. B., Newman J. D., Kola I. Cu/Zn superoxide dismutase mRNA and enzyme activity, and susceptibility to lipid peroxidation, increases with aging in murine brains. *Molecular Brain Research* 1992; 13, 179-187.
47. Halliwell B., Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. *Acta Neurology Scandinavia* 1989; 126, 23-33.
48. Halliwell B., Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine* 1991; 91 (Suppl 3C), 14S-22S.
49. Halliwell B., Gutteridge J. M. C., Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1986; 246, 501-514.
50. Halliwell B., Gutteridge J. M. C., Oxygen radicals and the nervous system. *TINS* January 1985; 22-26.
51. Harris E. D., Regulation of antioxidant enzymes. *The FASEB Journal* 1992; 6, 2675-2683.
52. Hirsch E. C., Does oxidative stress participate in nerve cell death in Parkinson's disease. *Eur. Neurol.* 1993; 33 (Suppl 1), 52-59.

53. Ida Y., Tsuda A., Sueyoshi K., Shirao I., Tanaka M. Blockade by diazepam of conditioned fear-induced activation of rat mesoprefrontal dopamine neurons. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour* 1989; 33, 477-479.
54. Imperato A., Puglisi-Allegra S., Casolini P., Angelucci L., Changes in brain dopamine and acetylcholine release during and following stress are independent of the pituitary-adrenocortical axis. *Brain Research* 1991; 538, 111-117.
55. Jaskiw G. E., Karoum F. K., Weinberger D. R. Persistent elevations in dopamine and its metabolites in the nucleus accumbens after mild subchronic stress in rats with ibotenic acid lesions of the medial prefrontal cortex. *Brain Research* 1990; 534, 321-323.
56. Jenner P. Altered mitochondrial function, iron metabolism and glutathione levels in Parkinson's disease. *Acta Neurology Scandinavia* 1993; 87 (Suppl 146) 6-13.
57. Jenner P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. *The Lancet* 1994; 344, 796-798.
58. Kandel E. R. Disorders of thought: Schizophrenia. *Principles of Neural Science* Ed: Kandel E. R., Schwartz J. H., Jessel T. M., Third edition, Appleton and Lange, USA. 1991; 853-868.
59. Kaneyuki H., Yokoo H., Tsuda A., Yoshida M., Mizuki Y., Yamada M., Tanaka M. Psychological stress increases dopamine turnover selectively in mesoprefrontal dopamine neurons of rats: reversal by diazepam. *Brain Research* 1991; 557, 154-161.

60. Kayaalp S. O. Santral sinir sistemi farmakolojisinin temelleri. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji* 2. Cilt, 7. Baskı, Feryal Matbaacılık, Ankara.1995;
61. Kim J. W., Yu B. P., Characterization of age-related malondialdehyde oxidation: The effect of modulation by food restriction. *Mechanisms of Ageing and Development* 1989; 50, 277-287.
62. Kurata K., Tanii Y., Shibata R., Kurachii M. Differential effects of tight and loose 2-hour restraint stress on extracellular concentrations of dopamine in nucleus accumbens and anteromedial frontal cortex. *The Japanese Journal of Psychiatry and Neurology* 1993; 47, 57-61.
63. Lavielle S., Tassin J-P., Thiery A-M., Blanc G., Herve D., Barthelemy C., Glowinski J. Blockade by benzodiazepines of the selective high increase in dopamine turnover induced by stress in mesocortical dopaminergic neurons of the rat. *Brain Research* 1978; 168, 585-594.
64. Le Moal M., Simon H. Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiological Reviews* 1991; 71, 155-234.
65. Lindvall O., Björklund A., Divac I. Organization of catecholamine neurons projecting to the frontal cortex in the rat. *Brain Research* 1978; 142, 1-24.
66. Markwell M. A. K., Haas S. M., Bieber L. L., Tolbert N. E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochem.* 1978; 87, 206-210.
67. McCord J. M., Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clinical Biochemistry* 1993; 26, 351-357.

68. Mizuno Y., Ohta K. Regional distributions of thiobarbituric acid-reactive products, activities of enzymes regulating the metabolism of oxygen free radicals, and some of the related enzymes in adult and aged rat brains. *Journal of Neurochemistry* 1986; 46, 1344-1352.
69. Niki E. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *Am. J. Clin. Nutr.* 1991; 54, 1119-1124.
70. Olanow C. W., Calne D. Does selegiline monotherapy in Parkinson's disease act by symptomatic or protective mechanism? *Neurology* 1992; 42 (Suppl 4), 13-26.
71. Paglia D. E., Valentine W. N., Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 1967; 70, 158-169.
72. Poeggeler B., Reiter R. J., Tan D-X., Chen L.-D, Manchester L. C., Melatonin, hydroxyl radical mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis. *Journal of Pineal Research* 1993;14, 151-168.
73. Pycock C. J., Kerwin R. W., Carter C. J. Effect of lesion of cortical dopamine terminals on subcortical dopamine receptors in rats. *Nature* 1980;286, 74-77.
74. Reddy R., Sahebarao M. P., Mukherjee S., Murthy J. N. Enzymes of the antioxidant defense system in chronic schizophrenic patients. *Biological Psychiatry* 1991; 30, 409-412.
75. Rehncrona S., Smith D. S., Akesson B., Westerberg E., Siesjo B. K., Peroxidative changes in brain cortical fatty acids and phospholipids, as characterized during Fe²⁺ and ascorbic acid-stimulated lipid peroxidation in vitro. *J Neurochem* 1980; 34, 1630-1638.

76. Reiter R. J., Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *The FASEB Journal* 1995; 9, 526-533.
77. Reiter R. J., Poeggeler B., Tan D-X., Chen L-D., Manchester L. C., Guerro J. M. Antioxidant capacity of melatonin: a novel action not requiring a receptor. *Neuroendocrinology Letters* 1993; 15, 103-115.
78. Reveillaud I., Niedzwiecki K., Bensch K. G., Fleming J. E., Expression of bovine superoxide dismutase in drosophila melanogaster augments resistance of oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* 1991; 11, 632-640.
79. Rosin D. L., Clark W. A., Goldstein M., Roth R. H., Deutch A. Y. Effects of 6-hydroxydopamine lesions of the prefrontal cortex on tyrosine hydroxylase activity in mesolimbic and nigrostriatal dopamine systems. *Neuroscience* 1992; 48, 831-839.
80. Roth R. H., Tam S-Y., Ida Y., Yang J-X., Deutch A.Y. Stress and the mesocorticolimbic dopamine systems. *Annals New York Academy of Sciences* 1988; 537, 138-147
81. Sedwall G., Farde L. Chemical brain anatomy in schizophrenia. *The Lancet* 1995; 346, 743-749.
82. Shivakumar B. R., Ravindranath V. Oxidative stress induced by administration of the neuroleptic drug haloperidol is attenuated by higher doses of haloperidol. *Brain Research* 1992; 595, 256-262.
83. Singer T. P., Ramsay R. R. Monoamine oxidases: old friends hold many surprises. *The FASEB Journal* 1995; 9, 605-610.
84. Sokoloff P., Giros B., Martres M-P., Bouthenet M-L., Schwartz J-C. *Nature* 1990; 347, 146-151.

85. Southorn P. A., Powis G., Free radicals in medicine. 1. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin.Proc.* 1988; 63, 381-389.
86. Spina M. B., Cohen G. Dopamine turnover and glutathione oxidation: Implications for Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; 86, 1398-1400.
87. Spina M. B., Cohen G. Hydrogen peroxide production in dopamine neurons. *Oxygen Radicals in Biology and Medicine* Ed: Simic M. G., Taylor K. A., Ward J. F., Sonntag C. v. Plenum Press, New York. 1988; 1011-1014.
88. Stadtman E. R., Protein oxidation and aging. *Science* 1992; 257, 1220-1224.
89. Stuphin M. S., Buckman T. D. Effects of low selenium diets on antioxidant status and MPTP toxicity in mice. *Neurochemical Research* 1991; 16, 1257-1263.
90. Tam S-Y., Roth R. H. Modulation of mesoprefrontal dopamine neurons by central benzodiazepine receptors. 1. Pharmacological characterization. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1990; 252, 989-996.
91. Tam S-Y., Roth R. H. Selective increase in dopamine metabolism in the mesoprefrontal cortex by the anxiogenic beta-carboline FG 7142. *Biochemical Pharmacology* 1985; 34, 1595-1598.
92. Thierry A. M., Tassin J. P., Blanc G., Glowinski J. Selective activation of mesocortical DA system by stress. *Nature* 1976; 263, 242-244.
93. Thomas C. E., Morehouse L. A., Aust S. D. Ferritin and superoxide - dependent lipid peroxidation. *The Journal of Biological Chemistry* 1985; 260, 3275-3280.

94. Ursini F., Maiorino M., Gregolin C. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1985; 839, 62-70.
95. Weinberger D. R. Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 1987; 44, 660-669.
96. Weinberger D. R., Berman K. F., Illowsky B. P. Physiological dysfunction of dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia III. A new cohort and evidence for a monoaminergic mechanism. *Arch. Gen. Psychiatry* 1988; 45, 609-615.
97. Weinberger D. R., Berman K. F., Zec R. F. Physiologic dysfunction of dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia I. Regional cerebral blood flow evidence. *Arch. Gen. Psychiatry* 1986; 43, 114-124.
98. Weiner N., Molinoff P. B. Catecholamines. *Basic Neurochemistry* Ed: Siegel G. J., Agranoff B. W., Albers R. W., Molinoff P. B. Fifth edition, Raven Press, New York. 1994; 645-680.
99. Westerink B. H. C. Sequence and significance of dopamine metabolism in the rat brain. *Neurochem. Int.* 1985; 7, 221-227.
100. Winyard P., Lunec J., Brailsford S., Blake D., Action of free radical generating systems upon the biological and immunological properties of caeruloplasmin. *Int. J. Biochem.* 1984; 16, 1273-1278.
101. Youdim M. B. H., Ben-Shachar D., Riederer P. Is Parkinson's disease a progressive siderosis of substantia nigra resulting in iron and melanin induced neurodegeneration? *Acta Neurology Scandinavia* 1989; 126, 47-54.
102. Yu B. P., Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews* 1994; 74, 139-162.