

**T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ**

**PORTALHİPERTANSİYON OLUŞTURULMUŞ RATLARDA BÖBREK
FONKSİYONLARININ VE LİPİD PEROKSİDASYONUNUN
İNCELENMESİ**

Arş. Görv. HURİ ALDIRMAZ

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç.Dr. AHMET VAR**

Manisa 2006

T.C.YÜKSEKÖĞRETİM KURULU TEZ MERKEZİ
TEZ VERİ GİRİŞ FORMU

Tez No:

Yazar Adı/Soyadı:Huri ALDIRMAZ

T.C.Kimlik No:22585813790

E-Posta Adresi:huriald@yahoo.com

Tezin Özgün Dili:Türkçe

Tezin Adı: Portal Hipertansiyon Oluşturulmuş Ratlarda Böbrek Fonksiyonlarının ve Lipid Peroksidasyonunun incelenmesi

Tezin Yabancı Dildeki Adı: The Investigation Of Renal Functions And Lipid Peroxidation In Portal Hypertension Induced Rats.

Tezin Konu Başlığı: 1. Portal Hipertansiyon
2. Lipid Peroksidasyon
3. Böbrek Fonksiyonları

Tezin Yapıldığı Yer:

Üniversite: Celal Bayar Üniversitesi

Enstitü: Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Fakülte: Tıp Fakültesi

AD/Bölüm: Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Türü: Yüksek Lisans

Tez Yılı: 2006

Sayfa Sayıları:

Giriş Sayfaları: 10

Ana Bölüm: 63

Tez Danışmanı:

Türkçe Dizin Terimler:

Portal Hipertansiyon

Nitrik oksidaz

Malondialdehit

Myeloperoksidaz

İngilizce Dizin Terimler:

Portal Hypertension

Nitric Oxidase

Malondialdehyde

Myeloperoxidase

İmza:

TUTANAK

Huri ALDIRMAZ'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı 'Portal Hipertansiyon Oluşturulmuş Ratlarda Böbrek Fonksiyonlarının ve Lipid Peroksidasyonunun incelenmesi' başlıklı bu çalışmada jürimizce Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

....// 2006

Üye:

Üye:

Üye:

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
.....gün vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdür Vekili

T.C. YÜKSEK EĞİTİM KURULU
Yayın ve Dökümantasyon Daire Başkanlığı
Tez Merkezi

TEZLERİN ÇOĞALTILMASI VE YAYIMI İÇİN İZİN BELGESİ
(Telif Hakkı Tez Yazarına ait olan tezler için)

Tez yazarının:

Soyadı:ALDIRMAZ

Adı: Huri

Uyruğu: T.C.

T.C Kimlik No:22585813790

Sürekli Adresi: Tevfikiye mah. Esen sk. No:23/1 MANİSA

Telefon No:0505 5427629

E-Posta:huriald@yahoo.com

Üniversite Adı: Celal Bayar Üniversitesi

**Enstitü / Eğitim Hastanesi Adı : Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı**

Tez türü: Yüksek Lisans

Mezuniyet Tarihi:

**Tezin Başlığı: Portal Hipertansiyon Oluşturulmuş Ratlarda Böbrek Fonksiyonlarının ve Lipid
Peroksidasyonunun İncelenmesi**

Tez yazarı aşağıdaki seçeneklerden birini işaretleyerek imzalamalıdır.

Not:Yükseköğretim Kurulu'nun kabul ettiği ilke tüm tezlerin, makul gerekçeler dışında (patent başvurusu, yayınlama sürecinde oluşu vb.) hiçbir kısıtlama olmaksızın tüm araştırmacıların erişimine açık olmasıdır. (Tez kopyalanması endişesi, tezin erişime açılmasının engellenmesi için bir gerekçe olarak kabul edilemez.)

a) Yukarıda başlığı yazılı olan tezimin, ilgilenenlerin incelemesine sunulmak üzere Yükseköğretim Kurulu Tez Merkezi tarafından arşivlenmesi, kağıt, mikroform veya elektronik formatta, İnternet dahil olmak üzere her türlü ortamda tamamen veya kısmen çoğaltılması, ödümç verilmesi dağıtım ve yayımı için, temizle ilgili fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere hiçbir ücret (royalty) ve erteleme talep etmeksizin izin verdiğimi beyan ederim.

İmza

Tarih

.....

.....

b) Tezimin Yükseköğretim Kurulu Tez Merkezi tarafından çoğaltılması veya yayımının tarihine kadar ertelenmesini talep ediyorum.Bu tarihten sonra (a) maddesindeki koşulların geçerli olacağını kabul ve beyan ederim.(Erteleme süresi en fazla iki yıldır.)

İmza

Tarih

.....

.....

Erteleme gerekçesiyle Enstitümüz tarafından uygun bulunmuştur.

Enstitü Müdürü/Dekan/Başhekim

İmza

Tarih

ÖNSÖZ

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini aktararak, iyi niyet ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım;

Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr. Zeki ARI'ya

Her konuda bana destek olan, sabır gösteren tez danışmanım Sayın Doç.Dr. Ahmet VAR'a,

Eğitimim ve tez çalışmalarım süresince birlikte geçirdiğimiz zaman içinde sevgi ve dostlukları için değerli öğretim üyeleri,

Prof.Dr. Bekir Sami Uyanık, Doç.Dr. Ece Onur, Doç.Dr. Fatma Taneli ve Doç.Dr. Cevval Ulman'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum ve uyum ile çalıştığım değerli uzman ve asistan arkadaşlar;;

Uzm.Dr. Yeşim Güvenç, Uzm.Dr. Banu Özden, Uzm.Dr. Serdar Seven, Uzm.Dr. Mustafa Altaş, Dr. Özlem Günay, Dr. Derya Akşoy, Dr. Nesrin Özlen ve Dr. Metin Demir'e,

Hoşgörü içinde çalıştığımız yüksek lisans eğitimi alan arkadaşlarım,

Hüseyin Tuğrul Çelik ve Sedat Abuşoğlu'na,

Çalışmalarımızı sevgi, saygı içinde yürüttüğümüz teknisyen arkadaşlarıma ve hastane personeline,

Sevgi ve yardımları ile her zaman yanımda olan canım eşime ve ailelerime,

İyi ve kötü günlerimi paylaştığım değerli dost ve arkadaşlarıma,

En içten teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Huri ALDIRMAZ

ÖZET

PORTALHİPERTANSİYON OLUŞTURULMUŞ RATLARDA BÖBREK FONKSİYONLARININ VE LİPİD PEROKSİDASYONUNUN İNCELENMESİ

Portal hipertansiyon (PHT), portal ven basıncının 10 mmHg' nın üzerine çıkması ile karakterize olan ve siroz, ensefalopati, gastrointestinal kanama gibi ciddi komplikasyonlara yol açan hiperdinamik bir dolaşım bozukluğudur.

Bu çalışmada PHT' da, böbrek dokusunda lipid peroksidasyonunun ve böbrek fonksiyonlarının araştırılması amaçlandı. Çalışmada 25 adet erkek Sprague-Dawley ratlar kullanıldı. Ratlar 2 gruba ayrıldı: grup1 (n=13) kontrol grubu, grup 2' ye (n=12) parsiyel portal ven ligasyonu uygulanarak 8 hafta sonra portal hipertansiyon oluşturuldu. Süre sonunda ratlar dekapite edilerek böbrek dokusu çıkarıldı. Bu dokularda nitrik oksid (NO), myeloperoksidaz (MPO), malondialdehit (MDA) enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Serumlarında ise üre ve kreatinin düzeyleri çalışıldı. Her iki grup karşılaştırıldığında serum üre düzeyleri ve doku MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (sırası ile p=0.008, p=0.009). Serum kreatinin ve doku MPO, doku NO düzeyleri arasında herhangi bir fark saptanmadı.

Sonuç olarak PHT'da biriken üre, amonyak gibi toksik ksenobiyotikler sistemik dolaşıma karışarak böbrek dokusuna etki etmekte, serbest radikal hasarına neden olmaktadır. Böbrek endotel dokusunun artmış NO düzeyleri ile kompanse olduğu düşünülmüştür. Üre birikimi de böbrek fonksiyonlarının etkilendiğini göstermektedir.

Buna rağmen portal hipertansiyonun böbrek üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalar henüz yeterli düzeyde değildir. Bu konuda daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

SUMMARY

THE INVESTIGATION OF RENAL FUNCTIONS AND LIPID PEROXIDATION IN PORTAL HYPERTENSION INDUCED RATS.

Portal hypertension (PHT) is a hyperdynamic circulation disorder characterized by high portal venous pressure which is above 10 mmHg. Cirrhosis, encephalopathy and gastrointestinal bleedings are the major severe complications of PHT. The aim of our study was to evaluate the changes in oxidative stress markers such as nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO) in kidney tissues of rats with PH.

In this study, 25 male Sprague-Dawley rats had been used. These rats had been divided into two groups: group 1 (n=13) the control group, group 2 (n=12) which had been partial portal ven ligation applied and so portal hypertension had formed. At the end of the time these rats decapitated and kidney tissues had taken out. In this tissues NO, MPO, MDA enzymatic activities measured spectrophotometrically. Urea and creatine levels studied in these rats serums. When compared of two groups, there is an statistically meaningful differences between their serum urea levels and tissue MDA levels (respectively $p=0.008$, $p=0.009$). But there weren't any differences between serum creatine and tissue MPO, tissue NO levels.

Urea is synthesized in liver. In Portal hypertension (PHT) urea synthesis breaks down because of the developing of the liver disease and cirrhosis. And environmentally ammonia accumulates. And our results show this decision.

In spite of this; studies which research the effects of the portal hypertension on the kidney are not enough. Much study is necessary about this subject.

Key words: Portal Hypertension, Nitric Oxidase, Malonyldialdehyde, Myeloperoxidase

İÇİNDEKİLER

ÖZET

SUMMARY

I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	2
II.1. PORTAL HİPERTANSİYON	2
II.1.1 Portal hipertansiyonun tanımı	
II.1.2. Portal hipertansiyonun etyolojisi	
II.1.3. Portal hipertansiyonun fizyopatolojisi	
II. 2. SERBEST RADİKALER	3
II.2.1. Serbest radikallerin reaksiyonları	4
II.2.1.1. İki radikalın reaksiyonu	
II.2.1.2.Radikallerin nonradikallerle reaksiyonu	
II.2.2. Serbest radikallerin sınıflandırılması	5
II.2.3. Serbest radikallerin kaynakları	5
II.2.3.1. Enzimatik tepkimeler	
II.2.3.2. Nonenzimatik tepkimeler	
II.2.3.3. Patolojik olaylar	
II.2.3.4. Elektron transport zinciri	
II.2.3.5. Dış etkenler	
II.2.4. Serbest oksijen ürünlerinin oluşumu ve geçiş metalleri	9
II.2.5. Reaktif oksijen ürünleri	10
II.2.5.1. Süperoksit radikali (O_2^{\bullet})	
II.2.5.2. Hidroperoksit radikali (HO_2^{\bullet})	
II.2.5.3. Hidrojen peroksit (H_2O_2)	
II.2.5.4. Hidroksil radikali (OH^{\bullet})	
II.2.5.5.Singlet oksijen (1O_2)	
II.2.5.6. Ozon(O_3)	
II.2.5.7. Nitrojen oksitleri	
II.2.5.8. Hipokloröz asit (HOCl)	
II.2.6.Serbest radikallerin yararlı etkileri	14
II.2.6.1. Detoksifikasyon	
II.2.6.2. Vazodilatasyon	

II.2.6.3. Bakterisid etkisi	
II.2.7.Serbest radikallerin zararlı etkileri	16
II.2.7.1. Lipidler üzerine olan etkisi	
II.2.7.2. Aminoasit ve proteinler üzerine olan etkileri	
II.2.7.3. Nükleik asit ve DNA üzerine etkileri	
II.2.7.4. Karbonhidratlar üzerine olan etkileri	
II.2.7.5. Kofaktörler üzerine olan etkileri	
II.2.7.6. Nörotransmitterler üzerine olan etkileri	
II.2.7.7. Antioksidanlar üzerine olan etkileri	
II.3. MYELOPEROKSİDAZ	22
II. 4. NİTRİK OKSİD	23
II.4.1. Nitrik oksidin yapısı	25
II.4.2. Nitrik oksidin biyosentezi	26
II.4.3. Nitrik oksid sentaz izoenzimleri	27
II.4.4. Nitrik oksidin moleküler etkileri	28
II.4.5. Nitrik oksidin biyolojik etkileri	30
II.4.6. Endotel hücresi ve nitrik oksid	30
II.4.7. Lipid radikalleri ve nitrik oksid	32
II.4.8. Nitrik oksid ve süperoksid etkileşimleri	33
II.4.9. Nitrik oksidin düzeylerini etkileyen faktörler	34
II.4.10. Kardiyovasküler sistem ve nitrik oksid	34
II.4.10.1.Koroner arter spazmı	
II.4.10.2.Ateroskleroz	
II.4.11.Mikrosirkulasyon	
II.4.11.1.Kardiyovasküler sistem üzerindeki diğer etkiler	
II.4.12.Sindirim sistemi ve nitrik oksid	38
I.4.13. Diğer sistemler üzerine olan etkileri	38
II.4.14. Nitrik oksid ölçüm yöntemleri	39
II.5. ANTİOKSİDAN SAVUNMA	39
II.5.1. Doğal antioksidanlar	40
II.5.1.1. Enzimler	
II.5.1.2. Nonenzimatik antioksidanlar	
II.5.2. İlaçlar	41

III. MATERYAL VE METOD	42
III.1. ARAÇ VE GEREÇLER	42
III.2. ÇALIŞMA MATERYALLERİ	43
III. 3. DOKULARIN HOMOGENİZASYON İŞLEMLERİ	44
III.3.1. Homojenizasyonda kullanılan reaktifler	
III.3.2. Homojenizasyonda yapılan işlemler ve numunelerin hazırlanması	
III. 3. PROTEİN ÖLÇÜMÜ (LOWRY METODU)	44
III. 4. NİTRİK OKSİD ÖLÇÜMÜ	45
III.5. MYELOPEROKSİDAZ ÖLÇÜMÜ	47
III.6. MDA ÖLÇÜMÜ	48
III.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	49
IV. BULGULAR	49
V. TARTIŞMA	53
VI.KAYNAKLAR	56

**T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ**

**PORTALHİPERTANSİYON OLUŞTURULMUŞ RATLARDA BÖBREK
FONKSİYONLARININ VE LİPİD PEROKSİDASYONUNUN
İNCELENMESİ**

Arş. Görv. HURİ ALDIRMAZ

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç.Dr. AHMET VAR**

Manisa 2006

T.C.YÜKSEKÖĞRETİM KURULU TEZ MERKEZİ
TEZ VERİ GİRİŞ FORMU

Tez No:

Yazar Adı/Soyadı:Huri ALDIRMAZ

T.C.Kimlik No:22585813790

E-Posta Adresi:huriald@yahoo.com

Tezin Özgün Dili:Türkçe

Tezin Adı: Portal Hipertansiyon Oluşturulmuş Ratlarda Böbrek Fonksiyonlarının ve Lipid Peroksidasyonunun incelenmesi

Tezin Yabancı Dildeki Adı: The Investigation Of Renal Functions And Lipid Peroxidation In Portal Hypertension Induced Rats.

Tezin Konu Başlığı: 1. Portal Hipertansiyon
2. Lipid Peroksidasyon
3. Böbrek Fonksiyonları

Tezin Yapıldığı Yer:

Üniversite: Celal Bayar Üniversitesi

Enstitü: Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Fakülte: Tıp Fakültesi

AD/Bölüm: Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Türü: Yüksek Lisans

Tez Yılı: 2006

Sayfa Sayıları:

Giriş Sayfaları: 10

Ana Bölüm: 63

Tez Danışmanı:

Türkçe Dizin Terimler:

Portal Hipertansiyon

Nitrik oksidaz

Malondialdehit

Myeloperoksidaz

İngilizce Dizin Terimler:

Portal Hypertension

Nitric Oxidase

Malondialdehyde

Myeloperoxidase

İmza:

TUTANAK

Huri ALDIRMAZ'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı 'Portal Hipertansiyon Oluşturulmuş Ratlarda Böbrek Fonksiyonlarının ve Lipid Peroksidasyonunun incelenmesi' başlıklı bu çalışmada jürimizce Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

....// 2006

Üye:

Üye:

Üye:

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
.....gün vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdür Vekili

T.C. YÜKSEK EĞİTİM KURULU
Yayın ve Dökümantasyon Daire Başkanlığı
Tez Merkezi

TEZLERİN ÇOĞALTILMASI VE YAYIMI İÇİN İZİN BELGESİ
(Telif Hakkı Tez Yazarına ait olan tezler için)

Tez yazarının:

Soyadı:ALDIRMAZ

Adı: Huri

Uyruğu: T.C.

T.C Kimlik No:22585813790

Sürekli Adresi: Tefikiye mah. Esen sk. No:23/1 MANİSA

Telefon No:0505 5427629

E-Posta:huriald@yahoo.com

Üniversite Adı: Celal Bayar Üniversitesi

**Enstitü / Eğitim Hastanesi Adı : Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı**

Tez türü: Yüksek Lisans

Mezuniyet Tarihi:

**Tezin Başlığı: Portal Hipertansiyon Oluşturulmuş Ratlarda Böbrek Fonksiyonlarının ve Lipid
Peroxidasyonunun İncelenmesi**

Tez yazarı aşağıdaki seçeneklerden birini işaretleyerek imzalamalıdır.

Not:Yükseköğretim Kurulu'nun kabul ettiği ilke tüm tezlerin, makul gerekçeler dışında (patent başvurusu, yayınlama sürecinde oluşu vb.) hiçbir kısıtlama olmaksızın tüm araştırmacıların erişimine açık olmasıdır. (Tez kopyalanması endişesi, tezin erişime açılmasının engellenmesi için bir gerekçe olarak kabul edilemez.)

a) Yukarıda başlığı yazılı olan tezimin, ilgilenenlerin incelemesine sunulmak üzere Yükseköğretim Kurulu Tez Merkezi tarafından arşivlenmesi, kağıt, mikroform veya elektronik formatta, İnternet dahil olmak üzere her türlü ortamda tamamen veya kısmen çoğaltılması, ödümç verilmesi dağıtım ve yayımı için, temizle ilgili fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere hiçbir ücret (royalty) ve erteleme talep etmeksizin izin verdiğimi beyan ederim.

İmza

Tarih

.....

.....

b) Tezimin Yükseköğretim Kurulu Tez Merkezi tarafından çoğaltılması veya yayımının tarihine kadar ertelenmesini talep ediyorum.Bu tarihten sonra (a) maddesindeki koşulların geçerli olacağını kabul ve beyan ederim.(Erteleme süresi en fazla iki yıldır.)

İmza

Tarih

.....

.....

Erteleme gerekçesiyle Enstitümüz tarafından uygun bulunmuştur.

Enstitü Müdürü/Dekan/Başhekim

İmza

Tarih

ÖNSÖZ

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini aktararak, iyi niyet ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım;

Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr. Zeki ARI'ya

Her konuda bana destek olan, sabır gösteren tez danışmanım Sayın Doç.Dr. Ahmet VAR'a,

Eğitimim ve tez çalışmalarım süresince birlikte geçirdiğimiz zaman içinde sevgi ve dostlukları için değerli öğretim üyeleri,

Prof.Dr. Bekir Sami Uyanık, Doç.Dr. Ece Onur, Doç.Dr. Fatma Taneli ve Doç.Dr. Cevval Ulman'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum ve uyum ile çalıştığım değerli uzman ve asistan arkadaşlar;;

Uzm.Dr. Yeşim Güvenç, Uzm.Dr. Banu Özden, Uzm.Dr. Serdar Seven, Uzm.Dr. Mustafa Altaş, Dr. Özlem Günay, Dr. Derya Akşoy, Dr. Nesrin Özlen ve Dr. Metin Demir'e,

Hoşgörü içinde çalıştığımız yüksek lisans eğitimi alan arkadaşlarım,

Hüseyin Tuğrul Çelik ve Sedat Abuşoğlu'na,

Çalışmalarımızı sevgi, saygı içinde yürüttüğümüz teknisyen arkadaşlarıma ve hastane personeline,

Sevgi ve yardımları ile her zaman yanımda olan canım eşime ve ailelerime,

İyi ve kötü günlerimi paylaştığım değerli dost ve arkadaşlarıma,

En içten teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Huri ALDIRMAZ

ÖZET

PORTALHİPERTANSİYON OLUŞTURULMUŞ RATLARDA BÖBREK FONKSİYONLARININ VE LİPİD PEROKSİDASYONUNUN İNCELENMESİ

Portal hipertansiyon (PHT), portal ven basıncının 10 mmHg' nın üzerine çıkması ile karakterize olan ve siroz, ensefalopati, gastrointestinal kanama gibi ciddi komplikasyonlara yol açan hiperdinamik bir dolaşım bozukluğudur.

Bu çalışmada PHT' da, böbrek dokusunda lipid peroksidasyonunun ve böbrek fonksiyonlarının araştırılması amaçlandı. Çalışmada 25 adet erkek Sprague-Dawley ratlar kullanıldı. Ratlar 2 gruba ayrıldı: grup1 (n=13) kontrol grubu, grup 2' ye (n=12) parsiyel portal ven ligasyonu uygulanarak 8 hafta sonra portal hipertansiyon oluşturuldu. Süre sonunda ratlar dekapite edilerek böbrek dokusu çıkarıldı. Bu dokularda nitrik oksid (NO), myeloperoksidaz (MPO), malondialdehit (MDA) enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Serumlarında ise üre ve kreatinin düzeyleri çalışıldı. Her iki grup karşılaştırıldığında serum üre düzeyleri ve doku MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (sırası ile $p=0.008$, $p=0.009$). Serum kreatinin ve doku MPO, doku NO düzeyleri arasında herhangi bir fark saptanmadı.

Sonuç olarak PHT'da biriken üre, amonyak gibi toksik ksenobiyotikler sistemik dolaşıma karışarak böbrek dokusuna etki etmekte, serbest radikal hasarına neden olmaktadır. Böbrek endotel dokusunun artmış NO düzeyleri ile kompanse olduğu düşünülmüştür. Üre birikimi de böbrek fonksiyonlarının etkilendiğini göstermektedir.

Buna rağmen portal hipertansiyonun böbrek üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalar henüz yeterli düzeyde değildir. Bu konuda daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

SUMMARY

THE INVESTIGATION OF RENAL FUNCTIONS AND LIPID PEROXIDATION IN PORTAL HYPERTENSION INDUCED RATS.

Portal hypertension (PHT) is a hyperdynamic circulation disorder characterized by high portal venous pressure which is above 10 mmHg. Cirrhosis, encephalopathy and gastrointestinal bleedings are the major severe complications of PHT. The aim of our study was to evaluate the changes in oxidative stress markers such as nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO) in kidney tissues of rats with PH.

In this study, 25 male Sprague-Dawley rats had been used. These rats had been divided into two groups: group 1 (n=13) the control group, group 2 (n=12) which had been partial portal ven ligation applied and so portal hypertension had formed. At the end of the time these rats decapitated and kidney tissues had taken out. In this tissues NO, MPO, MDA enzymatic activities measured spectrophotometrically. Urea and creatine levels studied in these rats serums. When compared of two groups, there is an statistically meaningful differences between their serum urea levels and tissue MDA levels (respectively $p=0.008$, $p=0.009$). But there weren't any differences between serum creatine and tissue MPO, tissue NO levels.

Urea is synthesized in liver. In Portal hypertension (PHT) urea synthesis breaks down because of the developing of the liver disease and cirrhosis. And environmentally ammonia accumulates. And our results show this decision.

In spite of this; studies which research the effects of the portal hypertension on the kidney are not enough. Much study is necessary about this subject.

Key words: Portal Hypertension, Nitric Oxidase, Malonyldialdehyde, Myeloperoxidase

İÇİNDEKİLER

ÖZET

SUMMARY

I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	2
II.1. PORTAL HİPERTANSİYON	2
II.1.1 Portal hipertansiyonun tanımı	
II.1.2. Portal hipertansiyonun etyolojisi	
II.1.3. Portal hipertansiyonun fizyopatolojisi	
II. 2. SERBEST RADİKALER	3
II.2.1. Serbest radikallerin reaksiyonları	4
II.2.1.1. İki radikalın reaksiyonu	
II.2.1.2.Radikallerin nonradikallerle reaksiyonu	
II.2.2. Serbest radikallerin sınıflandırılması	5
II.2.3. Serbest radikallerin kaynakları	5
II.2.3.1. Enzimatik tepkimeler	
II.2.3.2. Nonenzimatik tepkimeler	
II.2.3.3. Patolojik olaylar	
II.2.3.4. Elektron transport zinciri	
II.2.3.5. Dış etkenler	
II.2.4. Serbest oksijen ürünlerinin oluşumu ve geçiş metalleri	9
II.2.5. Reaktif oksijen ürünleri	10
II.2.5.1. Süperoksit radikali (O_2^{\bullet})	
II.2.5.2. Hidroperoksit radikali (HO_2^{\bullet})	
II.2.5.3. Hidrojen peroksit (H_2O_2)	
II.2.5.4. Hidroksil radikali (OH^{\bullet})	
II.2.5.5.Singlet oksijen (1O_2)	
II.2.5.6. Ozon(O_3)	
II.2.5.7. Nitrojen oksitleri	
II.2.5.8. Hipokloröz asit (HOCl)	
II.2.6.Serbest radikallerin yararlı etkileri	14
II.2.6.1. Detoksifikasyon	
II.2.6.2. Vazodilatasyon	

II.2.6.3. Bakterisid etkisi	
II.2.7.Serbest radikallerin zararlı etkileri	16
II.2.7.1. Lipidler üzerine olan etkisi	
II.2.7.2. Aminoasit ve proteinler üzerine olan etkileri	
II.2.7.3. Nükleik asit ve DNA üzerine etkileri	
II.2.7.4. Karbonhidratlar üzerine olan etkileri	
II.2.7.5. Kofaktörler üzerine olan etkileri	
II.2.7.6. Nörotransmitterler üzerine olan etkileri	
II.2.7.7. Antioksidanlar üzerine olan etkileri	
II.3. MYELOPEROKSİDAZ	22
II. 4. NİTRİK OKSİD	23
II.4.1. Nitrik oksidin yapısı	25
II.4.2. Nitrik oksidin biyosentezi	26
II.4.3. Nitrik oksid sentaz izoenzimleri	27
II.4.4. Nitrik oksidin moleküler etkileri	28
II.4.5. Nitrik oksidin biyolojik etkileri	30
II.4.6. Endotel hücresi ve nitrik oksid	30
II.4.7. Lipid radikalleri ve nitrik oksid	32
II.4.8. Nitrik oksid ve süperoksid etkileşimleri	33
II.4.9. Nitrik oksidin düzeylerini etkileyen faktörler	34
II.4.10. Kardiyovasküler sistem ve nitrik oksid	34
II.4.10.1.Koroner arter spazmı	
II.4.10.2.Ateroskleroz	
II.4.11.Mikrosirkulasyon	
II.4.11.1.Kardiyovasküler sistem üzerindeki diğer etkiler	
II.4.12.Sindirim sistemi ve nitrik oksid	38
I.4.13. Diğer sistemler üzerine olan etkileri	38
II.4.14. Nitrik oksid ölçüm yöntemleri	39
II.5. ANTİOKSİDAN SAVUNMA	39
II.5.1. Doğal antioksidanlar	40
II.5.1.1. Enzimler	
II.5.1.2. Nonenzimatik antioksidanlar	
II.5.2. İlaçlar	41

III. MATERYAL VE METOD	42
III.1. ARAÇ VE GEREÇLER	42
III.2. ÇALIŞMA MATERYALLERİ	43
III. 3. DOKULARIN HOMOGENİZASYON İŞLEMLERİ	44
III.3.1. Homojenizasyonda kullanılan reaktifler	
III.3.2. Homojenizasyonda yapılan işlemler ve numunelerin hazırlanması	
III. 3. PROTEİN ÖLÇÜMÜ (LOWRY METODU)	44
III. 4. NİTRİK OKSİD ÖLÇÜMÜ	45
III.5. MYELOPEROKSİDAZ ÖLÇÜMÜ	47
III.6. MDA ÖLÇÜMÜ	48
III.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	49
IV. BULGULAR	49
V. TARTIŞMA	53
VI.KAYNAKLAR	56

I. GİRİŞ:

Portal Hipertansiyon (PHT), hemodinamik değişikliklerle karakterize olup, sirozun en önemli komplikasyonlarından biridir. Etyolojisinde birçok farklı etkenin yer aldığı portal hipertansiyonda temel sorun; portal basıncın 10 mm/Hg' nin üzerine çıkması, portal venöz sistemde direncin artması ve buna bağlı olarak splanknik kan akımında ortaya çıkan değişikliklerdir (1-4).

Portal hipertansiyonda prognoz; hepatosit kitlesinin rezervi ve varis kanaması gibi komplikasyonların varlığı ile belirlenmektedir (1). Bu yöndeki araştırmalar sonucunda portal hipertansif gastropati (2) ve portal hipertansif kolopati (3) gibi kavramlar ortaya çıkmıştır.

Portal hipertansiyon klinik olarak; portal hipertansif gastropati, gastroözefagial varis kanamaları, asit, spontan bakteriyel peritonit, ensefalopati, hipersplenizm, hepatorenal sendrom, hepatopulmoner sendrom, hiperdinamik dolaşım ve kardiyopati gibi bir çok sistemi etkileyen ve tedavi edilmesi gereken durumlara yol açmaktadır. (3-5).

Portal hipertansiyona nitrik oksidin (NO) aracılık ettiği hiperdinamik bir dolaşım bozukluğu eşlik etmektedir (6). Diğer yandan, süperoksitlerin oluşum kaynaklarından bir tanesi olan ksantin oksidaz sisteminin, ince barsak duvarında lipid peroksidasyonunun artışına neden olabileceğini araştıran çalışmalar da yapılmıştır. Bu çalışmalarda, portal venöz konjesyon sonucu ince barsaklarda oksidatif stresin varlığı gösterilmiştir. (7). Ancak splanknik vasküler yataktaki bu hiperdinamik akımın, portal venöz yatağın drene ettiği ince barsak, kolon ve pankreas gibi organlardaki etkileri henüz tam olarak ortaya konulmamıştır.

Aerobik hayat için zorunlu olan moleküler oksijenin reaktif metabolitleri, organizmada doku hasarına neden olmaktadır. Olayın etkisiyle tetiklenen biyokimyasal tepkimeler, bir yada birkaç basamakta antioksidan savunma sistemleri ile engellenebilmektedir. Antioksidan savunma sistemleri; oksidanları direk etki ile inaktif hale getiren enzimlerden (süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon-s-transferaz gibi), vitaminlerden (vitamin C, E gibi), bilirubin ve serüloplazmin gibi bazı moleküllerden oluşmaktadır (8).

II. GENEL BİLGİLER

II.1. PORTAL HİPERTANSİYON

II.1.1 Portal hipertansiyonun tanımı:

Portal ven sistemi özefagusun 1/3 distal parçasından canalis analis'in alt yarısına kadar olan gastrointestinal yoldan, dalak, pankreas ve safra kesesinden kan alan bir sistemdir. Portal dolaşım; drene ettiği organlardan kapiller bir pleksus olarak başlayan ve karaciğer sinuzoidlerine drene ettiği kanı boşaltarak sonlanan vasküler bir yataktır. Normalde 4-10 mmHg olan portal ven içerisindeki basıncın, portal venöz sistemin tümünde veya bir kısmında sürekli olarak bu değer üzerinde olmasına portal hipertansiyon denir (1-4).

II.1.2. Portal hipertansiyonun etyolojisi

Portal hipertansiyon etyolojisi iki ana grupta sınıflandırılabilir. 1. portal kan akımında artış, 2. portal kan akımına karşı vasküler direnç artışı (1,3). Direncin arttığı durumlarda, karaciğer sinuzoidlerinin temel alındığı bir sınıflandırılma yapılırsa; presinuzoidal, sinuzoidal ve postsinuzoidal PHT' dan söz edilir.

II.1.3. Portal hipertansiyonun fizyopatolojisi

Karaciğer kan akımının 2/3'ünü vena porta, 1/3'ünü arteria hepatica sağlar. Arteria hepatica içindeki kanın oksijenasyonu daha yüksek olduğundan karaciğer oksijen ihtiyacının yarısı arteria hepatica yoluyla karşılanır. Portal ven ve hepatic arterle gelen kan miktarları birbirini dengeler ve karaciğere gelen kan miktarı sabit tutulmaya çalışılır. Portal vendeki kanın bir diğer özelliği de; diğer venlere göre oksijen saturasyonunun daha yüksek olmasıdır.

Herhangi bir akışkan sisteminde basınç gradienti; akımın ürünüdür ve akıma karşı oluşan direnç anlamına gelir.

$$\text{Portal basınç} = \text{portal sistemdeki akım} \times \text{direnç}$$

Portal hipertansiyonda fizyopatolojik gelişim basamakları:

- Portal akıma karşı artmış vasküler direnç,
- Portosistemik kollateral dolaşımın gelişmesi,
- Splanchnik vazodilatasyon ve artmış splanchnik akım,
- Plazma volümünde artış,

-Periferik vazodilatasyon ve hiperkinetik sistemik dolaşımın gelişmesi olarak özetlenebilir. (9)

Son yıllarda portal hipertansiyonun patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması, karaciğer hastalıklarının daha ayrıntılı olarak değerlendirilmesi, tedavi olanaklarını oldukça genişletmiştir. Portal hipertansiyonun farmakolojik olarak düşürülebileceği gösterilmiştir.

II. 2. SERBEST RADİKALER

Atomlarda elektronlar yörünge adı verilen uzaysal bölgede çift olarak bulunmaktadır. Elektronların yer kapladıkları bölgelere orbital denir. Her orbitalde spini ters yönde olan, en çok iki elektron bulunabilir. Bir orbitalde tek başına bulunan orbitale çiftleşmemiş elektron denir. (25,26)

Moleküllerin çoğu çift elektronlu, az sayıdaki molekül ise tek elektronludur. Tek, yani eksik elektronlu olan bu moleküller, bulabilecekleri herhangi bir molekül ile etkileşime girerek bu molekülden elektron alır ya da ona bir elektron verirler. Başka moleküller ile kolayca elektron alışverişine girip onların yapısını bozan bu moleküllere “serbest radikaller”, “oksidan moleküller” ya da “reaktif oksijen partikülleri” denmektedir (8,38-40).

Serbest radikal en dış orbitalinde eşleşmemiş bir elektron içeren herhangi bir atom, atom grubu ya da moleküldür (örneğin nitroz oksid [NO] ya da nitrojen dioksit [NO₂]). Radikal iyon ise pozitif (örneğin [H₃ N⁺] ya da negatif (örneğin [O₂^{-•}]) bir yük taşıyan serbest radikaldir (8,25,30).

Anaerobik canlılar da dahil olmak üzere her canlıda toksik etkili olan moleküler oksijenin kendisi değil, oksijenin tam olmayan indirgenmesi ile oluşturulan radikalleridir. Atomik ya da moleküler yapıda eşleşmemiş tek elektron içeren bu bileşikler reaktif özellik taşırlar. Serbest radikaller, negatif yüklü elektron sayısının, nükleustaki pozitif yüklü proton sayısı ile eşit olmadığı moleküller oldukları için stabil değildirler ve elektron konfigürasyonlarını pozitif yükü dengelemeleri gerektiğinde çok reaktiftirler. Oksijen radikali serbest elektronu eşleştirmek için başka bir molekülden elektron aldığında diğer molekülü anstabil hale getirir, zira o molekülün de elektronik düzenini sağlaması için komşu bir molekülden elektron alması gerekir. Bu nedenle serbest radikaller

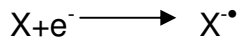
vücutta önemli moleküllere zarar veren bir seri tepkimeyi başlatabilirler (8,25,31).

Serbest radikaller üç şekilde oluşabilir (8,25,30).

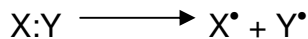
1. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı



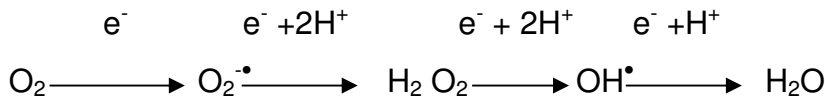
2. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi



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



Normal koşullar altında organizmada biyolojik sistemlerde varolan moleküler oksijenin çoğu sitokrom sisteminde yer alan aerobik glikolizis sırasında ATP üretmek için tetravalan bir redüksiyona uğrayarak suya redükte olur, ancak bu sistemden kaçan %1-2 miktarında moleküler oksijen univalan redüksiyona uğrar. Bu işlem sırasında moleküler oksijen elektronları sırasıyla alır ve böylelikle her bir elektron kazanımında reaktif ara ürünler oluşur; süperoksid radikali, hidrojen peroksid ve hidroksil radikali gibi (8,25,32-34).



Serbest radikalın çiftleşmemiş elektronu, baskın olarak bulunduğu atom veya grubun üzerinde ya da yanında bir nokta ile gösterilir.

Oksijen radikallerinin patolojik prosesleri, oksijen radikalleri fazla sayıda olmadıkça başlamaz. Oksijen radikallerinin hücumuna uğrayabilecek bölgeler arasında; proteinler, nörotransmitterler, nükleik asitler ve yağ asitleri bulunmaktadır (41).

II.2.1. Serbest radikallerin reaksiyonları

II.2.1.1. İki radikalın reaksiyonu

İki radikal karşılaştığında, çiftleşmemiş elektronlarını kombine edebilir ve kovalent bağ oluşturacak şekilde birleştirebilir.

II.2.1.2. Radikallerin nonradikallerle reaksiyonu

Bir radikal nonradikale elektron verebilir (redükten radikal), ondan elektron alabilir (oksidan radikal) veya onunla birleşebilir. Bu üç tip reaksiyonun

hangisi meydana gelirse gelsin, serbest radikallerin nonradikallerle reaksiyonlarının özelliği, nonradikal türün radikale dönüşmesiyle bir radikalden diğerinin meydana geldiği, zincirleme reaksiyonlar biçiminde ilerleme eğiliminde olmalarıdır (35).

II.2.2. Serbest radikallerin sınıflandırılması

Serbest radikaller, aşağıda gösterildiği gibi, çiftleşmemiş elektronun bulunduğu atoma göre sınıflandırılabilir.

<u>Sınıf</u>	<u>Örnekler</u>
1. Hidrojen merkezli serbest radikaller	Hidrojen atomu (H^{\bullet})
2. Karbon merkezli serbest radikaller	Triklormetil radikali (CCl_3)
3. Sülfür merkezli serbest radikaller	Till radikali ($R-S^{\bullet}$)
4. Nitrojen merkezli serbest radikaller	Fenildiazin radikali ($C_6H_5N=N$)
5. Oksijen merkezli serbest radikaller	
A. İnorganik	Süperoksid radikali (O_2^{\bullet})
B. Organik	Peroksil radikali (RO_2^{\bullet})

II.2.3. Serbest radikallerin kaynakları

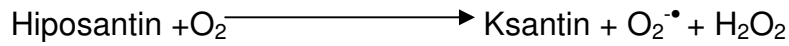
Bir dizi biyolojik işlevin normal yürütülebilmesi için serbest radikallerin yan ürün olarak oluştuğu reaksiyonlar gereklidir. Birçok hücrel enzim katalitik aktivitesi ve elektron transport işlemleri, ortama serbest radikal ürünleri üreten elektron transferlerini içerir. Aerobik organizmalarda elektronları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

Organizmada serbest radikallerin oluşmasına yol açan tepkimeler şunlardır (8,25).

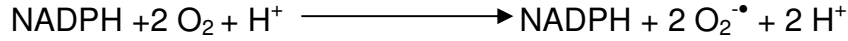
II.2.3.1. Enzimatik tepkimeler

Vücutta endojen olarak oluşabilen oksijen metabolitlerinin enzimatik kaynakları şunlardır: (8,42,47,48):

Ksantin oksidaz

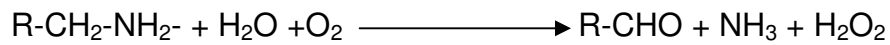


NADPH oksidaz

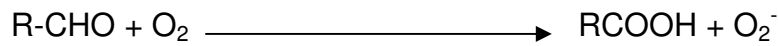


NADPH oksidaz polimorf nüveli lökositler, makrofajlar ve monositler gibi inflamatuvar hücrelerin yüzeyinde bulunur ve uygun uyaran (bakteri, mantar) ile karşılaştığında O_2 'yi O_2^{\bullet} 'e çevirir (solunum patlaması).

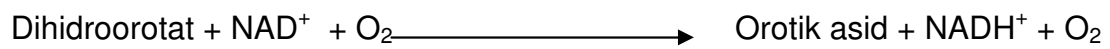
Amin oksidaz



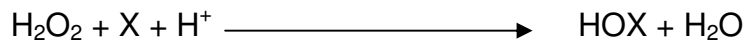
Aldehid oksidaz



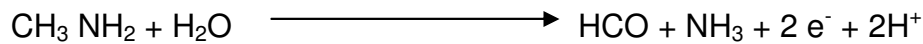
Dihidroorotat dehidrogenaz



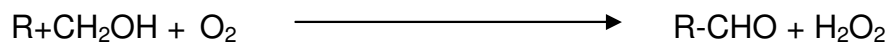
Oksijen peroksidazlar



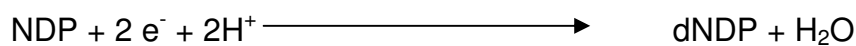
Metilamin dehidrogenaz



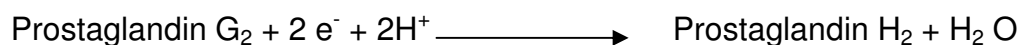
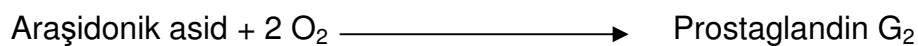
Galaktoz oksidaz

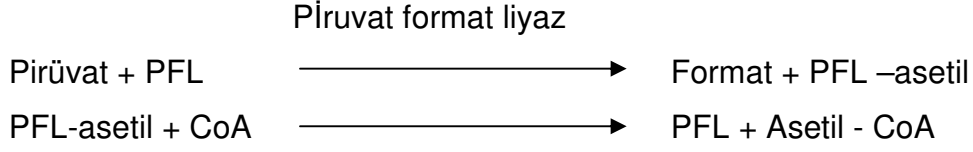


Ribonükleotid redüktoz



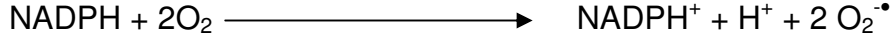
Prostaglandin H sentaz





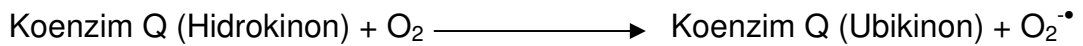
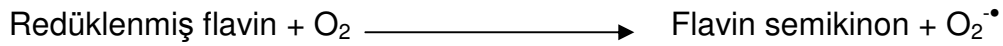
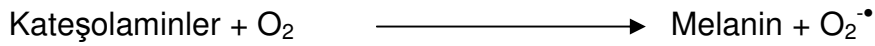
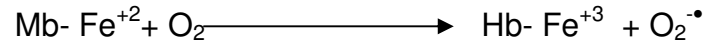
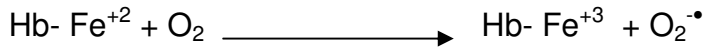
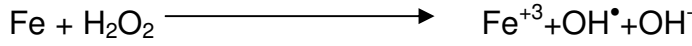
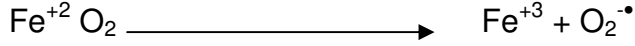
NADPH oksidaz:

Fagositlerin spesifik membran reseptörleri ile belirgin bağların etkileşimi büyük miktarlarda $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 ve muhtemelen de OH^{\cdot} oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Burada O_2 'nin redüksiyonundan sorumlu NADPH oksidaz enzimi, dinlenmekte olan hücrede inaktif bir enzim olarak bulunmaktadır. Nötrofil stimülasyonu olunca, oksidaz aktif forma dönmekte ve pentoz yolundan elde edilen NADPH 'lar O_2 ile redüce olarak $\text{O}_2^{\cdot-}$ üretilmektedir.



II.2.3.2. Nonenzimatik tepkimeler

Otooksidasyon tepkimeleri sonucu oluşan reaktif oksijen metabolitlerinin nonenzimatik kaynakları aşağıda özetlenmiştir (8,25).



II.2.3.3. Patolojik olaylar

- İskemi-reperfüzyon
- Uzun süreli metabolik hastalıklar
- Yangı (nötrofil, eozinofil ve makrofajlar fagositoz sırasında önemli ölçüde O_2^{\bullet} üretmektedirler.)

II.2.3.4. Elektron transport zinciri

Normal hücrelerde tüketilen oksijenin %95'inden fazlası, mitokondrial elektron transportu yoluyla iki molekül H_2O oluşturmak üzere dört elektronla indirgenmektedir. Normal oksijenlenme sırasında, elektron transportundaki bu O_2^{\bullet} akışı yaklaşık %1-2'dir. Sağlam mitokondride O_2^{\bullet} enzimatik veya enzimatik olmayan yollarla dismutasyona uğramaktadır.

Son çalışmalarda elektron transportundaki bu kaçakların iki noktada olduğu saptanmıştır. Bunlardan birincisi ve en önemlisi, elektron transportunda ubikinonun redüksiyonu ile oluşan kısmen indirgenmiş ubisemikinon serbest radikalidir. İkincisi ise, NADH dehidrogenazdır (38).

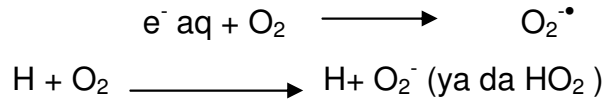
II.2.3.5. Dış etkenler

Radyasyon: Atmosferdeki veya tedavi sırasında karşılaşılan iyonize edici radyasyon, biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen ürünlerinin en önemli kaynaklarından birini oluşturmaktadır. Radyasyon, farklı bileşenlerden oluşan sistemlerde öncelikle elektronlarla etkileştiğinden, sistem mevcut elektron sayısına yapılan katkı oranında etkilenmektedir. Bu nedenle, proteinler ve diğer organik bileşiklerin dilue solüsyonlarını içeren biyolojik sistemler radyasyonun tümünü absorbe etmektedir.

Bütün yüksek enerjili elektromanyetik ışınlar her ortamda süperoksit anyon radikali oluştururlar. β, γ ve X ışınları sulu ortamdan geçince suyun radyolitik parçalanmasına neden olarak aşağıdaki ürünleri oluştururlar(8):



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



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

Ultraviyole ışınlarına bağlı oluşan SOR' lar; kollajen gibi proteinlerin çapraz bağlanmasına; sülfidril gruplarının oksidasyonu sonucu disülfid çapraz bağların oluşmasına; belli enzimlerin aktivitelerinin kaybına bağlı fibroblast, keratinositler; melanositler, langerhans hücreleri gibi hücrelerin fonksiyon bozukluklarına ve proteaz, kollajenaz ve elastazın serbest kalmasına neden olmaktadır (38).

Toksik kimyasal maddeler: CCl₄, kloroform, difenoller, kinonlar

Hava kirliliği: Azot dioksit, ozon, sülfür dioksit

Sitostatikler:

Pestisidler: Bipiridil herbisid ajanlar

Metaller: Titanyum, aliminyum, kurşun molibden, krom, kobalt, civa, nikel

Antibiyotikler: Tetrasiklin, kinon antibiyotikler, aminoglikozidler

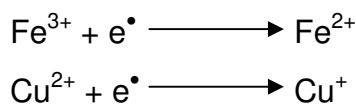
Sigara

Alkol

II.2.4. Serbest oksijen ürünlerinin oluşumu ve geçiş metalleri

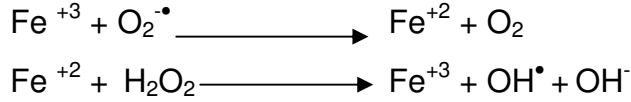
Biyolojik sistemlerde reaktif oksijen türlerinin oluşumunda redoks aktif metal iyonlarının merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir (59). Bu metaller in vitro Ti (III), Cu (I), Fe (II), veya Co (II) olabilir, ancak in vivo özellikle demir, daha az olarak da bakır uygun adaylardır (41).

Çoğu geçiş metali değişken oksidasyon sayısına sahiptir, örneğin demirin Fe²⁺ ve Fe³⁺ iyonları, bakırın Cu⁺ veya Cu²⁺ iyonları vardır. Oksidasyon durumları arasındaki değişme bir elektronun alınması veya verilmesini gerektirir (37,46).

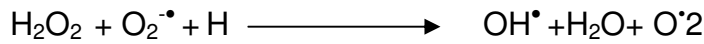


Fenton 1894'te, ferröz hidrojen peroksid karışımının (Fenton reaktifi) organik molekülleri okside ettiğini göstermiştir. Haber ve Weis 1932'de okside edici türün OH radikali olduğunu ortaya koymuşlardır (Haber-Weiss reaksiyonu).

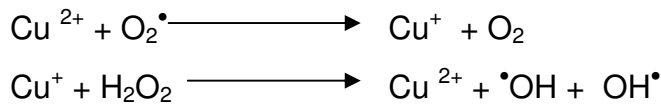
Metalo protein varlığında (FENTON TEPKİMESİ):



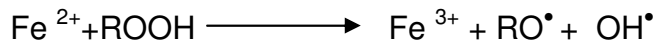
Metalo protein yokluğunda (HABER-WEISS TEPKİMESİ):



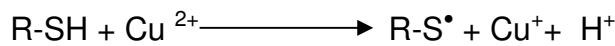
Demir gibi bakır da oksijen metabolizması sırasında oluşan O_2 ve H_2O_2 'nin çok reaktif OH radikaline çevrilmesine hizmet eder (39).



Hidroperoksidlerden alkoksi radikalının oluşumu Haber-Weiss reaksiyonuna benzer (101).



Bakır iyonları da tiollerin oksidasyonunu artırır (35).



II.2.5. Reaktif oksijen ürünleri:

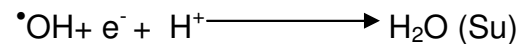
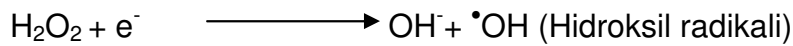
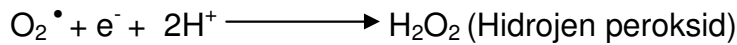
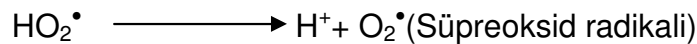
Oksijen serbest radikali teriminin $\text{O}_2^{\bullet-}$ ve OH^{\bullet} gibi radikallerin yanında H_2O_2 ve $^1\text{O}_2$ gibi reaktif, fakat radikal olmayan türleri ifade etmek için de kullanılması doğru değildir. Bunun yerine daha genel olan reaktif oksijen türleri teriminin kullanılması uygun olur. Oksidan terimi ise H_2O_2 , OH^{\bullet} ve HOCl gibi moleküller için geçerlidir, oysa $\text{O}_2^{\bullet-}$ hem oksidan hem de redüktandır (30,35).

Tablo-1. Serbest oksijen radikalleri ve nonradikal reaktif oksijen ürünleri

1.Oksijen serbest radikalleri	2. Nonradikal reaktif oksijen ürünleri
Süperoksid (O_2^{\bullet})	Hidrojenperoksid (H_2O_2)
Perhidroksil (HO_2^{\bullet})	Singlet oksijen (1O_2)
Hidroksil ($^{\bullet}OH$)	Hipokloröz asid ($HOCl$)
Nitrik oksid (NO^{\bullet})	Ozon (O_3)
Alkoksil (RO^{\bullet})	Lipid hidroperoksid ($ROOH$)
Peroksil (ROO^{\bullet})	N-Halojenli aminler ($R-NH-X$)

Moleküler oksijen (dioksijen) iki çiftleşmemiş elektron içeren bir diradikaldır, ancak kuantum mekaniği sınırlamalarına bağlı olarak aşırı reaktiviteye sahip değildir (26,39). Moleküler oksijenin, sitokrom c oksidazla olduğu gibi, 4 elektron birden alarak suya indirgenmesi serbest radikal ara ürünleri oluşturmaz (40). Oysa moleküler oksijenin spin kısıtlaması nedeniyle izleyeceği en kolay yol olan univalan redüksiyon reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olur (36,39) Bu yolda oksijen, elektronların basamaklı olarak eklenmesiyle indirgenirken HO_2^{\bullet} , $^{\bullet}OH$, ve H_2O_2 oluşur. PH 7'de HO_2^{\bullet} , O_2^{\bullet} vermek üzere dissosiyasyon olur (41,42).

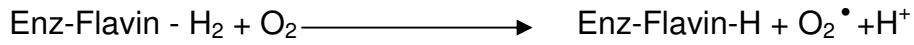
Oksijenin univalan redüksiyonu sırasında ara ürünlerin oluşumu şöyle formüle edilebilir (42,43):



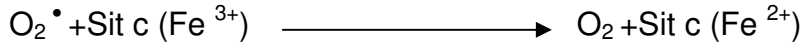
II.2.5.1. Süperoksid radikali (O_2^{\bullet})

Oksijenin $\pi 2p$ orbitaline bir elektron girmesiyle oluşur. Çözelti ortamına bağlı olarak askorbik asid ve tioller gibi molekülleri okside edebilen zayıf bir oksidan veya sitokrom c ve ferrik-EDTA gibi bazı demir komplekslerini indirgeyebilen güçlü bir redüktan gibi davranabilir (37). Hidrofobik ortamlarda yüksek, büyük sulu ortamlarda düşük reaktiviteye sahiptir (39).

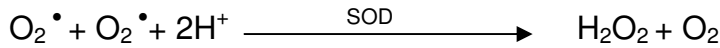
Redükte flavinler, örneğin ksantin oksidazla bulunanlar, moleküler oksijen tarafından univalan olarak yeniden okside edilirken süperoksid radikali oluşabilir (44).



Süperoksid, okside sitokrom-c'yi indirgeyebilir (50).



Süperoksid, spontan veya süperoksid dismutazla enzimatik dismutasyonu sonucu H_2O_2 oluşturur. O_2^\bullet bu reaksiyonda hem oksidan, hem de redüktandır (82).



Fagositik hücrelerin respiratuar patlaması sırasında süperoksid oluşumu bakterisidal etkiye katkıda bulunur (39,45).

II.2.5.2. Hidroperoksil radikali (HO_2^\bullet)

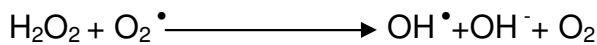
O_2^\bullet 'nin protane formudur (59). Daha lipid solubl, daha güçlü oksidan ve redüktandır (53).

II.2.5.3. Hidrojen peroksid (H_2O_2)

O_2^\bullet üreten herhangi bir sistem, dismutasyon reaksiyonunun sonucu olarak H_2O_2 de üretir. Ürat oksidaz, glukoz oksidaz ve D-amino asid oksidaz gibi birçok enzim oksijene iki elektronun transferiyle doğrudan H_2O_2 üretir. Zayıf oksidan ve redüktandır. Geçiş metallerinin yokluğunda nisbeten stabilse de, bunların varlığında serbest radikal oluşturma potansiyeli nedeniyle vücut tarafından (glutasyon peroksidaz ve katalaz gibi) savunma sistemleri geliştirilmiştir.

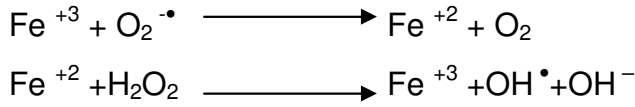
II.2.5.4. Hidroksil radikali (OH^\bullet)

1934 yılında Haber ve Weiss, hidrojen peroksidin süperoksid anyonu ile indirgenmesi ile hidroksil radikali oluşabileceğini göstermişlerdir (8,25).

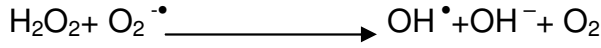


Ardından 1978 yılında redoks katalizör olarak fonksiyon gören bir metal, örneğin şelat yapmış demir (Demir-EDTA kompleksi) varlığında, Haber-Weiss tepkimesinin biyolojik sistemlerde de çalıştığı ve bu yolla önemli miktarlarda OH^\bullet üretildiği gösterilmiştir.

Metaloprotein varlığında (Fenton tepkimesi):



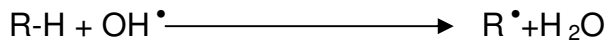
Metalo protein yokluğunda (Haber-Weiss tepkimesi):



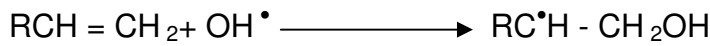
Oksijen radikalleri içinde en reaktif ve en toksik etkili olanı hidroksil radikalidir. Bu radikal membran yapısında yer alan ansatüre yağ asitlerini ve esterlerini peroksidasyona uğratarak lipid peroksidlerin ve endoperoksidlerin oluşumuna neden olmaktadır.

Hidroksil radikalinin katıldığı tepkimeler üç grupta toplanabilir (8,25).

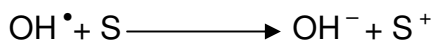
a- Hidroksil radikali hidrojen çıkarma tepkimeleri ile bir radikal ve su açığa çıkarır.



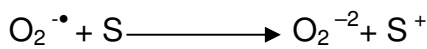
b- OH^{\cdot} katma tepkimeleri ile çift bağ içeren aromatik bileşiklere katılır, aromatik amino asitlerin hidroksilasyonuna ve toksik etkili aldehydlerin oluşumuna neden olur.



c- OH^{\cdot} , organik ve inorganik bileşiklerde elektron transfer tepkimelerine neden olur ki aynı etkiyi $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikali de göstermektedir.



Yada



II.2.5.5. Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)

Moleküler oksijenin en düşük eksite durumudur (39). Çiftleşmemiş elektron içermediği için serbest radikal değildir, ancak spin kısıtlaması olmadığı için oksidan özelliği çok artmış reaktif bir oksijen formudur (42). Tipik substratı H_2 'dir.

Tip II fotosentez reaksiyonları, endoperoksidler ve dioksetanların termal dekompozisyonu, biyolojik sistemlerde bazı enzimatik reaksiyonlar ve lipid

peroksidasyonu sırasında kimyasal eksitasyon aracılığıyla oluşabilir. Genotoksik, karsinojenik ve mutajenik etkileri indükleyebilir (39).

II.2.5.6. Ozon(O₃)

Ozon gazı radyasyona karşı önemli bir stratosferik koruma kalkanı sağlar (global antioksidan). Ancak yeryüzünde toksik ve oksidan etkili bir çevre kirleticidir. Kirlenmiş şehir havasında ve bilimsel ekipmanlar ve bazı fotokopi makinalarında kullanılan yoğun ışık kaynaklarıyla oluşur. Akciğer için hasar vericidir. Protein, DNA ve lipidleri kolayca okside eder (42).

II.2.5.7. Nitrojen oksidleri

Nitrik oksid (NO[•]) ve nitrojen dioksid (NO₂[•]) serbest radikaldir, ama anestezik olarak kullanılan nitroz oksid (N₂O) serbest radikal değildir. NO₂[•] güçlü bir oksidan, NO[•] ise zayıf bir redüktandır. NO[•] vasküler endotel ve diğer hücreler tarafından az miktarda üretilir. NO[•], O₂[•] ile reaksiyona girerek güçlü bir oksidan olan peroksi nitrit (ONOO⁻) oluşturur. ONOO⁻ birçok biyolojik molekülü hasara uğratabilir ve asid pH'da dekompozisyonu ile, metal iyonlarından bağımsız olarak, az miktarda OH[•] üretebilir (42).

II.2.5.8. Hipokloröz asid (HOCl)

HOCl güçlü bir oksidandır. Vücutta aktive nötrofiller tarafından oluşturulur. Fagosit sitoplazmasındaki myeloperoksidaz enzimi, H₂O₂ ve klorid iyonlarından HOCl oluşumunu katalize eder.

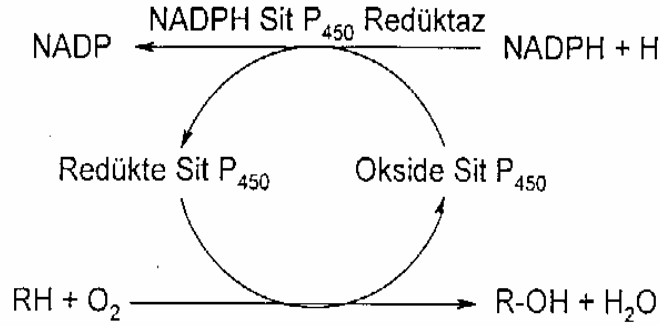
HOCl, düşük konsantrasyonlarında plazma membranında sülfidril gruplarını oksidler, glukoz ve aminoasid taşıyıcılarının inaktivasyonuna, potasyum pompalama kapasitesinin kaybına ve dış membranlardaki proteinlerin fonksiyonunun bozulmasına yol açar. Yüksek konsantrasyonlarda ise hücre lizisi ve protein karbonil oluşumuna neden olur (30,41).

II.2.6.Serbest radikallerin yararlı etkileri.

II.2.6.1. Detoksifikasyon

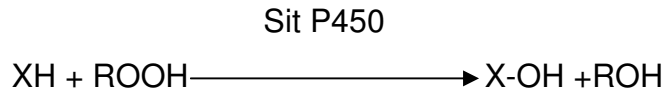
Xenobiotiklerin metabolize olurken, konjugasyon veya metilasyonla suda daha çözünür hale getirilmeden önce, sitokrom P-450'nin katalizlediği bir reaksiyonla hidrosilasyona uğrarlar (44). Bir hemoprotein olan sitokrom P-450, bu reaksiyonda, demir-oksijen kompleksinin reaktivitesinden yararlanır,

kofaktörleri NADPH/ O₂ veya peroksidlerdir. Reaktif oksijen türleri reaksiyon siklusunda merkezi bir yol oynarlar.(39)



Şekil-1. RH substratının NADPH / O₂ bağımlı oksidasyonu.

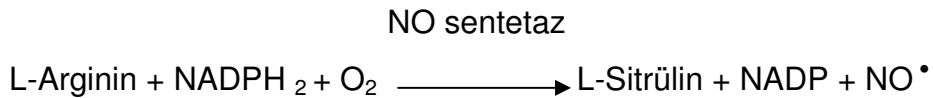
Sit P450 'nin peroksidaz fonksiyonunda peroksidler (ROOH) oksijen donörü olarak kullanılır.



II.2.6.2. Vazodilatasyon

Nitrik oksid'in (NO[•]), endotelden salgılanan bir düz kas gevşetici faktör olan endotelden türeyen gevşetici faktör (EDRF) ile identik olduğu düşünülmektedir (39,45).

NO[•], arginin'den NO sentetaz katalizörlüğünde meydana gelir.



NO sentetazın endotel, sinir dokusu ve trombositlerde Ca²⁺ kalmodulin bağımlı tipi; hepatosit, makrofaj ve nötrofillerde Ca²⁺ bağımsız tipi bulunmuştur. Değişik hücre tiplerinde TNF ve IL-1, enzimi indükler. NO[•], guanilat siklazı aktive ederek, GTP'den c GMP oluşturur. CGMP vazodilatasyon yapar ve trombosit agregasyonunu inhibe eder (59). Nitrogliserin ve nitroprussid gibi vazodilatatör nitratlar, NO[•] 'e metabolize olarak etki gösterirler. NO[•] ayrıca beyinde nörotransmitter olarak fonksiyon görür ve makrofajların bakterisidal ve

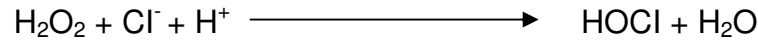
tümörisidal etkilerine aracılık eder (45). $O_2 \cdot$ (39), okside LDL (46) ve muhtemelen okside Lp(a), $NO \cdot$ 'in aktivitesini inhibe eder.

II.2.6.3. Bakterisid etkisi

Nötrofiller ve monositler bakterisidal etki için oksijen bağımlı ve bağımsız mekanizmalarla donatılmışlardır. Oksijen bağımsız mekanizma, pH değişikliği ve lizozomları kullanırken, oksijen bağımlı mekanizma myeloperoksidazı içerir.

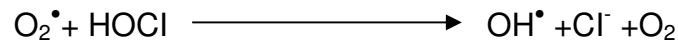
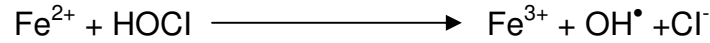
Fagositozdan sonra lökosit membranındaki NADPH oksidaz moleküler oksijeni $O_2 \cdot$ 'a çevirir (respiratuar patlama). Hormonal olarak düzenlenen bu enzimin genetik eksikliğinde kronik granülomatöz hastalık görülür. Daha sonra $O_2 \cdot$, SOD ile H_2O_2 'e çevrilir (45). H_2O_2 , Cl^- iyonları ile myeloperoksidaz katalizörlüğünde, bakterileri öldürüren, hipokoröz asid oluşturur (39,42,45).

Myeloperoksidaz



Hidrojen peroksidin fazlası glutatyon peroksidaz ve katalaz tarafından nötröle edilir.

HOCl demir bağımlı ve bağımsız reaksiyonlarla $OH \cdot$ verebilir (48):



Oluşan $OH \cdot$ da bakterisidal etki gösterir (14).

$NO \cdot$ sentetaz sistemi makrofajlarda da bulunur (39,45). Bakteriyel lipopolisakkaridler ve enfeksiyona cevap olarak açığa çıkan γ - interferon, enzimin sentezini belirgin olarak stimüle eder (46). Aktive makrofajların oluşturduğu reaktif oksijen türleri $NO \cdot$ ile birleşerek, $OH \cdot$ gibi, $NO \cdot$ 'dan daha güçlü bakterisid etkisi olan bileşikler oluşturabilir.

II.2.7. Serbest radikallerin zararlı etkileri

II.2.7.1. Lipidler üzerine olan etkisi

Organik dünyanın belki de en stabil molekülleri olan fosfolipidlerin içerdikleri ansatüre yağ asidi zincirleri, sitoplazmik yapının ve biyolojik membranların temel elemanıdır. Biyolojik yapılar özellikle membranlar yüksek oranda doymamış lipid içermektedirler. Bu lipidler bir radikal başlatıcısının ya da

oksijenin varlığında oksidasyona uğrarlar. Biyolojik sistemlerde lipid peroksidasyonu büyük önem taşır; zira lipid peroksidler selüler hasara yol açan, metabolizmayı değiştiren ve dokulardaki kan akımını azaltan potent kimyasal maddelerdir (47).

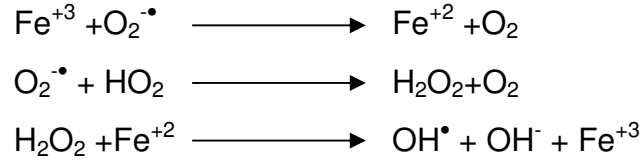
Radikallerin yol açtığı bu olay patolojik ya da fizyolojik işlemlere (prostaglandin sentezi yada yaşlanma gibi) eşlik edebilir.

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

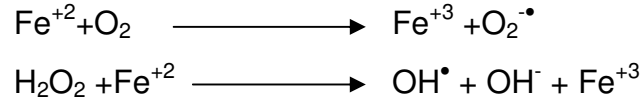
Singlet oksijen ve hidroksil radikalının her ikisi de lipid peroksidasyonunu başlatabilir, ancak peroksidasyon mekanizmaları farklıdır. Lipid radikal (lipid peroksid) zincir tepkimesinin uzunluğu ve böylece lipid peroksidasyonunun şiddeti lipid ansatürasyonunun derecesine göre artmaktadır. Hidroksil radikali ile oluşan lipid peroksidasyonunda ansatüre yağ asidinin iki allik karbonundan hidrojen atomu çıkarken, singlet oksijen ile olan lipid peroksidasyon ürünlerinde bu durum kendini gösterir. Buna örnek olarak oleik asitten hidrojen atomu çıkması ile 8, 11 hidroperoksid izomerleri ve 9, 11 izomerlerinin oluşması, singlet oksijen etkisi ile de 9 ve 10 hidroperoksidlerin oluşması verilebilir. Lipid peroksidasyonunu başlatan diğer bir ajan NO_2 'dir. Bu ajan etkisi ile hidrojen atomunun çıkması ya da oleine NO_2 ilavesi ile peroksidasyon oluşmaktadır (26,46).

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

radikali redükleyici etki göstermektedir. Benzer şekilde askorbat da bağımsız bir mekanizma ile Fe^{+3} 'ü indirgemektedir.

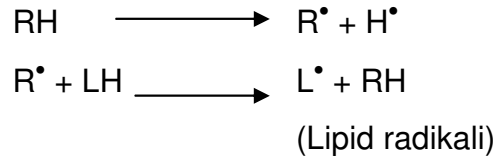


Fe^{+2} 'i bir oksidanın Fe^{+3} 'e oksidlemesiyle de lipid peroksidasyonu başlayabilir. Çoğu kez oksidan moleküler oksijen ve hidrojen peroksiddir.

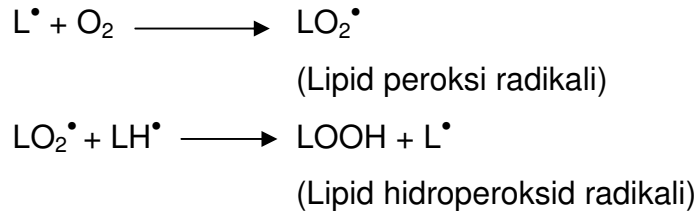


Lipid peroksidasyonu yağların özellikle poliansatüre yağ asidlerinin oksidatif oksijen bağımlı yıkılımı olarak tarif edilir ve dallanan bir zincir reaksiyonudur. Olayda genelde bir enzimin varlığı gerekli olmamasına rağmen belirtildiği gibi demir ve bakır gibi iz metaller, ultraviyole ya da radyasyon olayı katalizleyebilmektedir. Bu zincir reaksiyonu 4 ana aşamada inelenebilir (8,25):

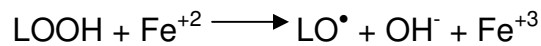
A-Zincir başlangıcı:



B- Zincir ilerlemesi:

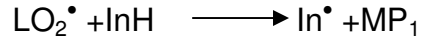
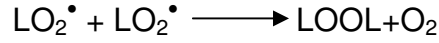
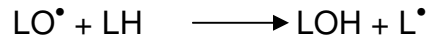


C- Zincir dallanması:

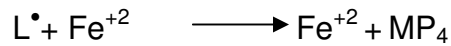
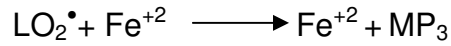
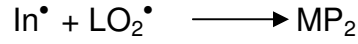


(Lipid oksi radikali)

D- Zincir sonlanması:



(antioksidan)

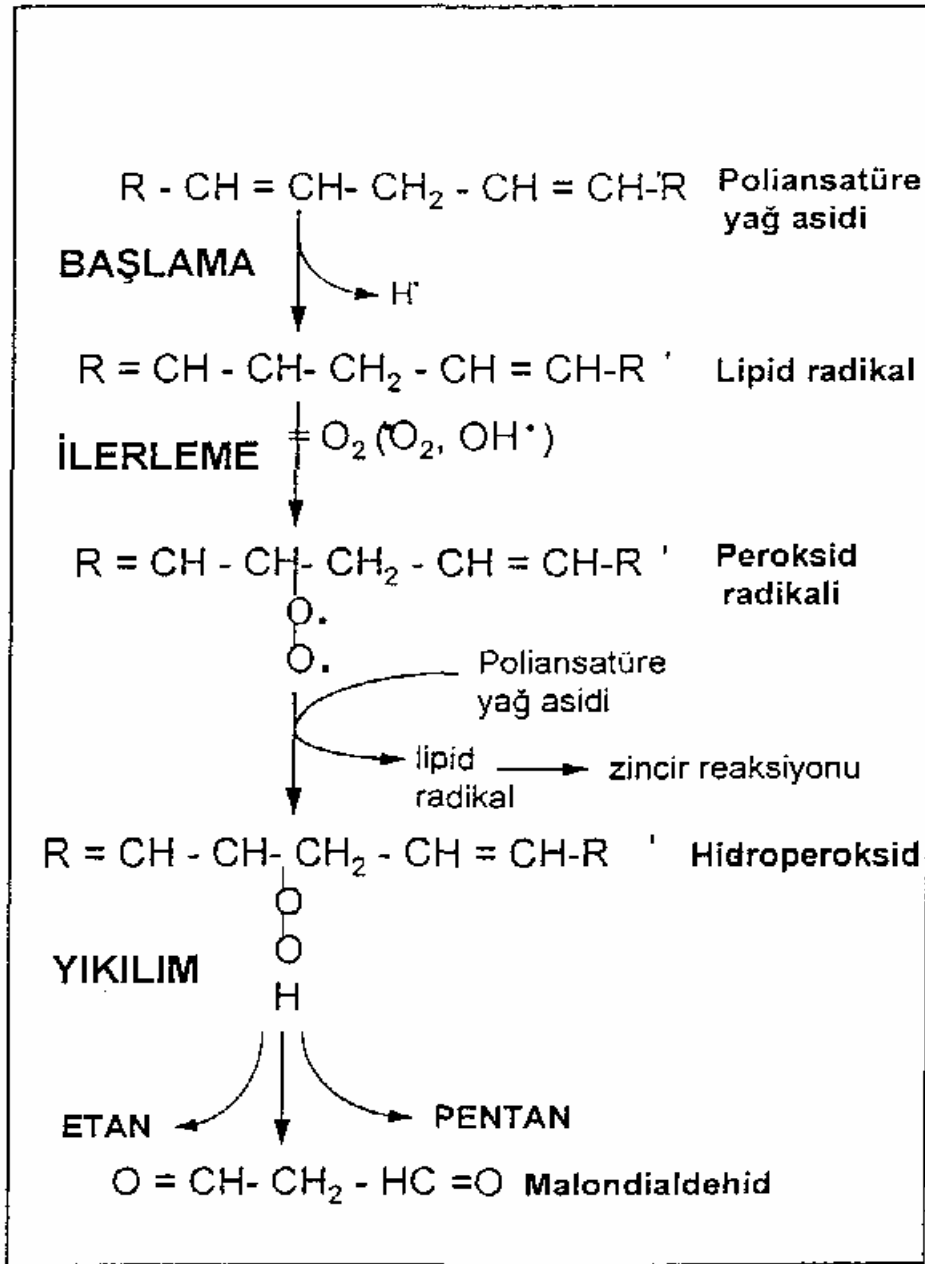


*(MP₁₋₄: Sonraki zincir tepkimelerine katılmayan identifiye edilmemiş çeşitli moleküler)

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

Lipid peroksidasyonu bir ansatüre yağ asidinin cis iki çift bağı arasındaki metilenden hidrojen atomu çıkması ile başlamaktadır. Ansatüre yağ asidi cis-cis pentadien merkezinden hidrojen ayrılması otooksidasyonda hız kısıtlayıcı basamak olarak kabul edilmektedir. Bu tepkimeler yalnızca lipid radikalleri ve oksijen içerdiğinden otooksidasyon terimi kullanılmaktadır.

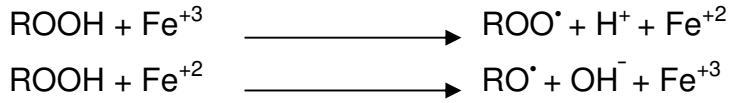
Ansatüre yağ asidlerinin termodinamik olarak en stabil ürünü allik radikallerdir. Poliansatüre yağ asidlerinde ayrılmaya uygun birçok metilenik hidrojen vardır. Örneğin araşidonik asid 7, 10 ve 13. karbonlarda bulunan üç adet ikili allik kısma sahiptir. Lipooksijenaz gibi enzim katalizi etkisi ile ise selektif olarak spesifik metilenik karbondan aktive olmuş hidrojen çıkarılır

Şekil 2. Lipid peroksidasyonu**Şekil-2.** Lipid peroksidasyonu

Oluşan lipid pentadienil radikali araşidonik asitte olduğu gibi 5, 8, 9, 12 ve 15. karbonlardaki oksijen ile reaksiyona girmektedir.

Linoleik asidin ya da linoleat esterlerinin primer oksidasyon ürünleri incelendiğinde dört ana konjuge dien hidroperoksidin olduğu saptanmıştır. Bu dört üründen (karışımın % 97'si) başka eser miktarlarda nonkonjuge hidroperoksidler de identifiye edilmiştir. Dien hidroperoksidler anstabilidir (8,25).

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



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

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

Hidroperoksidlerin termolitik yıkımı ile de uçucu hidrokarbonları ve aldehidleri içeren kısa zincirli ürünler meydana gelmektedir. ω-6 ve ω-3 peroksidlerden oluşan pentan ve etan bu yıkılım yolunun iyi bilinen örnekleridir. Hidroperoksidler ayrıca homolitik yıkılıma da uğramaktadırlar. Bunun örneği de epoksi alkoller ve epoksidlerin oluşmasıdır (47).

II.2.7.2. Aminoasit ve proteinler üzerine olan etkileri

Doymamış ve sülfür içeren amino asitler (triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin ve sistein) ve bunların bulunduğu proteinler serbest radikal aracılı modifikasyona uğrayabilirler. Prolin ve lizin gibi, modifikasyona dirençli amino asitler de OH[•] gibi aşırı reaktif serbest radikaller tarafından nonenzimatik hidroksilasyona uğratılabilir (39).

Sitoplazma ve membran proteinlerinde dimerler veya daha büyük agregatlar halinde çapraz bağlanmalar olabilir. Sonuçta oksihemoglobinden methemoglobin oluşumu, katalazın inaktivasyonu, glikolizde gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenazın ve oksidatif fosforilasyonda ATP sentetazın azalması gibi etkiler ortaya çıkar (41).

II.2.7.3. Nükleik asit ve DNA üzerine etkileri

Nükleik asitlerde baz modifikasyonu veya DNA'da iplikçik kopması nedeniyle mutasyonlara ve hücre ölümüne neden olurlar.

II.2.7.4. Karbonhidratlar üzerine olan etkileri

Hücre yüzeyindeki reseptörlerde ve hyalüronik asidin eklenmesi sonucu sinoviyal sıvı viskozitesinde değişiklikler olabilir.

II.2.7.5. Kofaktörler üzerine olan etkileri

Nikotinamid ve flavin içeren kofaktörlerin miktarında ve aktivitesinde azalma olur.

II.2.7.6. Nörotransmitterler üzerine olan etkileri

Serotonin ve epinefrin gibi nörotransmitterlerin miktarında ve aktivitesinde azalma olur

II.2.7.7. Antioksidanlar üzerine olan etkileri

E vitamini ve β karoten ile katalaz ve SOD enzimlerinde inhibisyon olur, GSH-Px aktivitesi değişmez (50).

II.3. MYELOPEROKSİDAZ

Myeloperoksidaz (MPO), nötrofillerin azurofil granüllerinde yerleşmiş olan bir enzimdir. Normal nötrofil fonksiyonu için gerekli olduğu gibi bakterilerin fagositozunda önemli rol oynamaktadır. Nötrofiller myeloperoksidazla birlikte hem içermekte ve fagositoz sonucunda fagolizozomlara salınmaktadır Nötrofiller inflamasyon alanında süperoksit ve hidrojen peroksit üretmektedirler (48,49). Myeloperoksidaz pek çok farmakolojik ajanın ve ksenobiyotiklerin de dahil olduğu çok çeşitli substratları radikal ara ürünlere okside etmek için hidrojen peroksiti kullanmaktadır (49,50).

Makrofajlar ve nötrofiller aktivasyon seviyeleri yönünden istirahatten tamamen aktive olmuş duruma kadar çok değişken durumlarda bulunabilirler. Aktivasyon membran reseptörleri, solubl antijenler ve enzimler gibi çeşitli proteinlerin ekspresyonunu kapsar. Reaktif oksijen ara ürünleri özellikle de myeloperoksidazın fagosit aktivasyonunda yer alan bazı uyarı yolaklarında önemli rolü olduğu görünmektedir (51).

Myeloperoksidaz, fagositlerde mevcut reaktif oksijen türleri kullanan yada üreten enzimlerden biridir. Myeloperoksidaz ile hidrojen peroksit arasındaki

reaksiyon tarafından oluşan MPO-Bileşik 1, klor iyonları varlığında oldukça reaktif bir bileşik olan HOCl'i (hipokloröz asit) oluşturur. HOCl hem oksidasyon hem klorinasyon reaksiyonlarına uğrayan hatta çoğu durumda nötrofillerce üretilen neredeyse en güçlü oksidan maddedir (49-52). Diğer yandan myeloperoksidaz süperoksit anyonu ile de reaksiyon vererek MPO-Bileşik 3'ü oluşturur. Bu bileşik aktive nötrofillerden salınan baskın formdur.

Doku makrofajları, myeloperoksidazın bilinen bir kaynağı değildir. Ancak makrofajlar MPO veya diğer peroksidazlara maruz kaldığında oksidatif patlamanın oluşması nedeniyle myeloperoksidazın makrofajlar üzerine de etki ettiği söylenmektedir (51).

Myeloperoksidazın, LDL' nin oksidasyonu ile ilgili olduğu ve dolayısıyla aterogeneze rolü olduğu düşünülmektedir. Myeloperoksidazın LDL üzerine olan prooksidan etkisinin aslında hipokloröz asit oluşturmasından kaynaklandığına inanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda MPO' nun NO metabolizması ile sıkı şekilde bağlantılı olduğu kanıtlanmıştır. NO' nun oksidasyon ürünü olan nitrit, MPO' nun oluşturduğu reaktif oksijen türlerinin substratı olarak görev yapmaktadır.(53-55).

Barsakların kan akımındaki yetersizlik organın önemli ölçüde hasarı ile sonuçlanır. Kan akımının düzeltilmesi her zaman fonksiyonun düzelmesi ile sonuçlanmaz. Hasarlanmış vasküler endotelden kaynaklanan kemotaktik maddeler inflamatuvar bir yanıtı neden olabilir. MPO aktivitesi bu durumla da yakından ilgilidir (49).

II. 4. NİTRİK OKSİD

Atmosferik bir gaz olarak bilinen NO, ortam havasında bulunmakla birlikte, aynı zamanda kirli havada, ekzos gazında, sigara dumanında bulunmaktadır. Nitrik oksid, reaktif nitrojen oksidleri üreterek çevre kirlenmesine neden olabilmektedir. Bu reaktif nitrojen oksidleri aynı zamanda karsinojenik etkiye sahiptir. Önceleri yalnızca atmosferde kirlenici bir gaz olarak bilinen nitrik oksidin , memeli hücreleri tarafından sentez edildiğinin keşfedilmesiyle çoğu biyolojik süreç hakkında önemli bilgiler sağlamıştır.

Nitratların etki mekanizmaları ile ilgili çalışmalar 1970'lerden sonra yoğunlaşmış ve daha sonraki yıllarda NO konusunda edinilen yeni bilgiler, bu mekanizmaya daha da açıklık getirmiştir. 1980'lerde ABD'de Furchgott ve Zawadzki (56) arter preparatlarında yaptıkları deneysel çalışmada asetilkolinin oluşturduğu relaksasyonun kesinlikle endotele bağımlı olduğunu ve bu etkinin labil hormonal bir faktörle sağlandığını göstermişlerdir. Bu faktörün yalnız arterlerde değil, bazı venlerde ve küçük damarlarda da aynı etkiyi oluşturması nedeniyle "endothelium-derived relaxing factor (EDRF); endotel kaynaklı gevşetici faktör" olarak adlandırılmıştı

Sağlam damar endoteli, bazal bir hız ile NO oluşturur. Bu arada fizyolojik bir stimulus agonist olarak yanıtı artırabilir. Agonist etkisi ile intrasellüler Ca^{+2} artışı nitrik oksid sentazı (NOS) aktive eder ve L-Arginin aminoasidinden sitrüllin ile birlikte sentezlenen NO, endotel hücresinden düz kas hücresine difüze olur. Düz kaslarda NO solubl guanilat siklazı aktive ederek cGMP' yi artırır. EDRF ile yapılan çalışmalarda, bu maddenin cGMP üzerindeki etkisinin, NO' e benzer şekilde ortaya çıktığını vurgulamaktadır. Bu benzerlikler arasında EDRF'nin farmakolojik davranışı ve asidifiye NO₂' den NO üretilmesi 1987'lerde Furchott'a EDRF'nin NO olabileceğini düşündürmüştür (57). Aynı tarihlerde Ignarro ve arkadaşları (58), Palmer ve Moncado (70) da EDRF'nin NO veya ona çok yakın bir türevi olduğunu ve damar endotel hücrelerinde L Argininden NO sentezlendiğini göstermişlerdir. EDRF'yi ister NO olarak isterse de NO'nun çok kısa yarı ömürlü bir ön maddesi olarak kabul edelim sonuç olarak birbirlerine çok yakın maddelerdir. göstermiştir (59). Nitrik oksid oldukça toksik bir madde olup sitotoksik özelliği de vardır. Hücreler için toksik olan bu maddenin hücre tarafından üretildiği, dokularda NO tayinleri yapılarak kanıtlanmıştır.

Nitrik oksid endotel yüzeyinde antitrombotik etkinliğe sahiptir. Nitrik oksid sentaz aktivitesinin inhibisyonu, mikrovasküler permeabiliteyi artırarak lökositlerin migrasyonunu ve adezyonunu artırmaktadır (60).

Garg ve Hassid (61) in vitro olarak NO'nun damar düz kas hücresinin büyümesi ve gelişmesini inhibe ettiğini, böylece damar hücre proliferasyonunu düzenlediğini göstermişlerdir. Yapılan in vivo çalışmalar da bu bulguları doğrulamıştır. Damarların hasarlanmış bölgesindeki endotel NOS'u, intimanın

proliferatif yanıtını azaltmıştır. Bu etkiler, olasılıkla yüksek konsantrasyondaki NO'nun düz kas hücrelerine direk toksik etkisine bağlı olmaktadır.

Sonuç olarak kaynak bilgiler, NO'nun, biyolojik medyatör olarak tanımlanabilmesi için yeterli kriterin bulunduğunu göstermektedir. Böylece NO, potent bir vasodilatör olmakla birlikte nörotransmitter, immunmodilatör, sitotoksik etkili ancak doku hasarı oluşturmayan bir otokoid olarak da görülmektedir.

II.4.1. Nitrik oksidin yapısı

NO(N=O), monoksit veya nitrik oksit olarak tanımlanmaktadır. Nitrik oksit; tek sayıda elektron içeren, renksiz, gaz şeklinde bulunan inorganik serbest bir radikaldir (38,62). Eşlenmemiş elektron nitrojen ve oksijen atomu üzerinde yer değiştirerek rezonans stabilitesini sağlamaktadır (63).

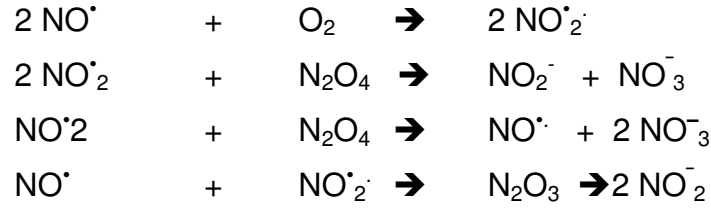


Nitrik oksit lipofilik, kimyasal olarak stabil olmayan, reseptöre bağımlı olmadan kolayca difüze olabilen ve bilinen en düşük moleküler ağırlıklı memeli hücresinin biyoaktif sekresyon ürünüdür (64). NO ile ilişkili nitrojenin okside metabolitleri Tablo-2' de özetlenmiştir:

Tablo 2. Nitrik oksit ile ilişkili nitrojen metabolitleri

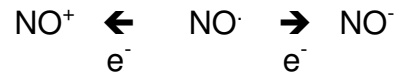
Sembol	İsim	Etki
NO [•]	Nitrik oksit	Serbest radikal (S – R)
NO ₂ [•]	Nitrojen dioksit	S-R, nitronize edici etken ajan
N ₂ O	Nitröz oksit	Anestetik
N ₂ O ₃	Dinitrojen trioksit	Nitronize edici etken ajan
N ₂ O ₄	Dinitrojen tetraoksit	Nitronize edici ajan
NO ₂ ⁻	Nitrit	Asidik ortamda NO' oluşturur
NO ₃	Nitrat	Stabil anyon

Nitrik oksit, 3 ile 5 saniye gibi çok kısa bir yarı ömüre sahiptir. Su ve oksijen varlığında bir dizi nitrojen oksitleri oluşturur.



NO_2^\cdot , N_2O_3 , N_2O_4 gibi NO_x güçlü nitrotize edici ajanlardır (50).

Nitrik oksid elektron vermekle NO^+ (nitrozonyum katyonu) ve elektron almakla NO^- (nitroksil anyonu) oluşturabilir.



II.4.2. Nitrik oksidin biyosentezi

Nitrik oksid, sitokrom P-450 redüktaz homoloğu ve nitrik oksid sentaz olarak adlandırılan enzimlerce enzimatik olarak meydana gelir. Sitokrom P-450 benzeri enzim, muhtemelen sisteinin aksiyel ferrik ligandı olduğu demir protoporfirin 9 içerir.

Arginin terminal guanido nitrojenin beş elektronunun oksidasyonu; redükte NADPH ve flavinler tarafından desteklenir ve tetrahidrobiopterin de (BH_4) kofaktör olarak rol oynar. Sitokrom P-450'dekine benzer şekilde moleküler oksijen bağlanmadan önce $\text{Fe}(3)$ 'ün redüksiyonunun gerektiği düşünülmektedir. Son görüşler, iki oksijen molekülünün aktivasyonu ile bir çift oksijen atomunun orjinin substratına girerek NO ve sitrüllini oluşturduğu şeklindedir. N^\cdot hidroksi arginin NO biyosentezinde erken ara üründür (65).

L-argininden NO oluşturan enzimler NOS'lar olarak bilinmektedir. Bu enzimler klonlanıp karakterize edilebilmişlerdir. Nitrik oksid sentaz'lar memeliler dışında sümüklü böcekler, deniz yıldızı, yengeçler ve yapışkan mantarlarda da saptanmıştır. L-argininden NO sentezinde NADPH, NOS, kalmodulin, oksijen ve dört kofaktöre (hem, FMN, FAD, BH_4) gereksinim duyduğu anlaşılmıştır. NOS'lardaki hem merkezi sitokrom P-450'nin spektral özelliklerine sahiptir ve sonuçta bunlar sitokrom P-450 / P-450 redüktazların bazı tepkilerini verebilirler.

L-Arginin ve oksijenden NO ve sitrülin sentezi, hidroksi arginin yolu ile oksijenin her iki ürünüde bağlı olduğu iki basamaklı ve oldukça karmaşık bir

tepkimedir, arginin guanido nitrojeninde beş elektron oksidasyonu oluşmaktadır (65).

II.4.3. Nitrik oksid sentaz izoenzimleri:

Nitrik oksid sentazın üç farklı izoenzimi bulunmaktadır:

n.NOS → İlk olarak sinir dokusunda bulunmuştur. Yapısal olarak tanımlanabilmiştir ve kalsiyuma bağımlıdır

.e.NOS → İlk olarak vasküler endotel hücrelerinde tanımlanmıştır yapısal olarak kalsiyuma bağımlıdır.

. i.NOS → İlk olarak endotoksinler ve sitoksinler aracılığıyla karaciğer hücreleri ve makrofajlarda uyarılan bir enzim olarak tanımlanmıştır. Bu izoform fizyolojik şartlarda kalsiyuma bağlı değildir. Nedeni ise kalmoduline çok sıkı bağlanmış olmasıdır. Son zamanlarda her üç izoenzimin değişik hücrelerde bulunabildiği ve uyarılabildiği gösterilmiştir. Örneğin; e.NOS endotel hücreleri, nöronlar, barsak interstisyel hücrelerinde bulunabilir

i.NOS genel yapıda mevcut değildir ancak bakteriyel ürünler ve sitokinler ile teması takiben birçok doku ve hücre tipinde uyarılmaktadır.

e.NOS, östrojen ve “shear stress” ile n.NOS ise östrojen, testosteron veya lityum ekli takrin ile uyarılabilir.

Her üç izoenzimin içerdiği aminoasid dizilerinde NADPH, FAD, FMN ve kalmodulin ve protein kinaz A fosforilasyonu için ortak dizilere sahiptirler. İzoenzimler tamamen farklıdır. Sadece %51 ila 57 oranında bir dizilim özdeşliği gösterirler, bu NO'lara en yakın olarak bilinen sitokromP-450 redüktaz ile %36'lık bir özdeşlik ile kıyaslanabilir. Memeli türleri arasındaki izoenzimlerde de %81 ila 93'lük bir dizilim özdeşliğini gösteren benzerlikler sözkonusudur.

4.1.2. Nitrik oksid sentazın özellikleri

Tablo-3 de yapısal ve uyarılabilen NOS' un özellikleri karşılaştırılmış, Tablo-4 de ise nitrik oksid sentazların hücresel dağılımları gösterilmiştir

Tablo-3. Yapısal NOS ve uyarılabilen NOS

	Yapısal NOS (cNOS)	Uyarılabilen (i.NOS)
Ca⁺² bağımlılık	+	-
NO[•] oluşum düzeyi	pmol	nmol
Yanıt	ani	gecikmiş
Üretim süresi	kısa	uzun
Glikokortikoidle etkileşim	-	uyarılması inhibe edilir

e.NOS ve n.NOS aktivasyonu Ca⁺² / kalmodulin bağımlıdır, i.NOS aktivasyonu ise transkripsiyonel indüksiyon yolu ile etkilidir (64).

Tablo-4. Nitrik oksid sentazların hücresel dağılımı

c.NOS	i.NOS
Endotel hücresi	Makrofaj, hepatosit
Santral nöron	Kupffer hücresi
NANC nöron*	Vasküler düz kas hücresi
Nötrofil, trombosit mast hücresi	Fibroblast, mezenşial hücre
astrofit	Astrosit, kondrosit
B-hücresi,	İnflamatuar nötrofil
Adrenal medulla ve korteks hücresi	Karsinoma hücresi
renal makula	Sinoviyal hücre
Fare nöroblastoma	

*Nonadrenerjik nonkolinerjik nöron

II.4.4. Nitrik oksidin moleküler etkileri

NO'nun aktiflediği enzimler arasında solubl guanilat siklaz (sGC) ve ADP-ribozil transferaz yer alır (Tablo-5). Makrofajlardaki NO tümör hücresi ve mikroorganizmalardaki Fe-S taşıyan enzimleri nitrolayarak antimikrobiyal, antitümoral ve sitotoksik etki gösterir. NO ferritin ile reaksiyona girerek serbest demir salınımına yol açar. Bu serbest demir de lipid peroksidasyonuna neden olabilir. Makrofaj kökenli NO ise tümör hücresinin DNA sentezini engeller. Bunu ribonükleotid redüktazı inhibe ederek yapar. NO'nun diğer bir hedefi de süper

oksid anyon radikalidir ($O_2^{\cdot-}$), bu iki bileşimin tepkimesinden oluşan peroksinitritten nitrojen dioksit ve hidroksil radikali oluşur. NO'nun sülfidril ile reaksiyonu ve S-nitrozilasyon, plazminojen aktivatör gibi bazı enzimlerin katalitik fonksiyonlarını artırabilir.

NO eritrositlerdeki oksihemoglobin ve redükte hemoglobin ile nitrozohemoglobin (HbNO) üzerinden methemoglobin ve NO_3^- 'e dönüşerek metabolize edilir. Methemoglobin redüktaz ile tekrar hemoglobine dönüşür, NO_3^- ise idrarla atılıma uğrar (65,66).

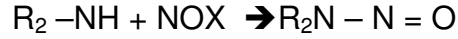
Tablo-5. Nitrik oksidin moleküler etkileri

Moleküler sınıf	Aktivite artışı	Aktivite azalışı
Hem proteinler Fe-S proteinler Diğer nonHem	sGC	Hemoglobin,myoglobin ETZ* enzimleri, akonitaz Ferritin, ribonükleotid redüktaz
Fe proteinleri Tirozil radikal protein Protein tiyoller DNA Superoksit anyon radikali	EDRF, tPA** Mutasyon oluşumu Hidroksil radikali oluşumu	Ribonükleotid redüktaz Dehidrogenaz Mutasyon kaybı Superoksit anyon radikali azalışı

* Elektron transport zinciri

**Doku plazminojen aktivatörü

NO^{\cdot} ve NO_2^{\cdot} oluşturan bileşikler (NO_2^{\cdot} , N_2O_3 , $N_2O_4 \rightarrow NOX$) güçlü nitroze edici ajanlardır. Bunlar primer ve sekonder aminlerin nitrolizasyonuna öncülük ederek karsinojenik etki gösterirler.



(nitrozamini simgeler ve potansiyel olarak karsinojeniktir)

Bu bileşikler DNA'da nitrozilasyon ile deaminasyona ve alkil nükleofillerin oluşumuna neden olurlar ve böylece oluşan mutasyonlar onkojenleri aktifleyerek malign hücre dönüşümüne yol açarlar (67).

II.4.5. Nitrik oksidin biyolojik etkileri

Biyolojik yarı ömrü saniyeler düzeyinde olan NO, insan fizyolojisi ve fizyopatolojisinde önemli bir yere sahiptir ve rol oynadığı olaylar aşağıda verilmiştir:

- Vasküler düz kas relaksasyonu ile vasodilatasyon
- Santral sinir sistemi ve periferik sinir sisteminde nörotransmitter
- Endotel hücresi ve vasküler düz kas hücresinde antiproliferatif etki
- Trombosit adezyon ve agregasyonunda inhibisyon
- tPA artışı ve fibrinolizis
- Düşük konsantrasyonda eritrosit deformasyonunda artış
- İmmunomodilatör
- NADPH oksidaz inhibisyonu ile lökosit adezyon inhibisyonu
- Makrofaj aracılı nonspesifik immun yanıt
Antimikrobiyal (sitotoksik)
Antitümör (sitotoksik)

II.4.6. Endotel hücresi ve nitrik oksid

NO'nun sağlam, izole kan damarlarında fiziksel, kimyasal ve hormonal uyarıcılara karşı EDRF (veya EDNO: endotel kaynaklı NO) aracılıklı vazodilatasyon oluşturarak vasküler tonus regülatörü olduğu çeşitli kaynaklarda gösterilmiştir (68).

“Shearstress” gibi fiziksel etkenler, asetilkolin, bradikinin, 5-hidroksitriptamin ve ayrıca hipoksi gibi etkenler, Ca^{+2} / kalmodulin sistemi aracılığı ile endoteldeki NOS'u uyararak NO oluştururlar. Endotelde oluşan NO, diffüzyon yolu ile düz kas hücresine geçer ve sGC enzimini uyararak GTP'den

cGMP oluşturur. Oluşan cGMP kalsiyum düzeylerini azaltarak düz kaslarda relaksasyon ile vazodilatasyona neden olur (67).

NO; trombositler, makrofajlar ve düz kas hücrelerinde de üretilebilirse de lokal olarak başlıca endotelyumda ve sinir hücrelerinde üretilmektedir. NO'nun hastalıklardaki rolünü tam olarak kavrayabilmek için endotelyumu iyi tanımak gerekir.

Endotelyum; özellikle kapillerde, vasküler permeabilite düzenleyicisi olarak önemli bir rol oynamaktadır. Endotel hücreleri ayrıca, dolaşımdaki hormonları da aktive ve inhibe ederler. Angiotensin dönüştürücü enzim, endotel hücre membranının bir enzimidir ve Angiotensin I'i Angiotensin II'e dönüştürür, bradikinin ise inaktif ürünlere parçalar. Öte yandan monoaminooksidaz (MAO) enzimi norepinefrin ve serotonin gibi monoaminleri inaktive eder. Endotel hücreleri doku trombosit aktivatör (tPA) ve plazminojen inhibitörü gibi koagülasyon faktörleri ve inhibitörlerinin de kaynağıdır ve NO, prostoglandinler ve endotelin I gibi vazodilatör maddeler salgırlar. Daha ötesi, endotel hücreleri, heparin, heparin sülfat, TGF- B gibi büyüme inhibitörleri ve FGF ve PDGF gibi büyüme faktörlerinin de kaynağıdır.

Endotelyumun biyolojik fonksiyonu, vasküler düz kas hücrelerinin migrasyon ve proliferasyonunun regülasyonu olduğu kadar vasküler tonus, trombosit fonksiyonu ve koagülasyonun regülasyonunu da kapsamaktadır (69). Normal koşullar altında vasküler tonus, trombosit fonksiyonu, koagülasyon ve proliferatif yanıtlar üzerindeki inhibe edici etkileri ağır basmakta, bu da anatomik yapının fizyolojik koşullardaki koruyucu doğasını yansıtmaktadır.

Damar duvarındaki düz kasın güçlü bir gevşeticisi olan EDRF, solubl guanilat siklazı aktive ederek cGMP düzeyini artırır. EDRF'nin yapısı basitçe NO veya onu içeren bir kompleks olabilir. Prostasiklin (PGI_2) endotelden salgılanan diğer bir vazodilatördür ve etkisi adenilat siklaz aracılığıyla cAMP'nin artışına bağlıdır. EDRF ve PGI_2 vasküler düz kası gevşetmek ve trombosit agregasyonunu inhibe etmek bakımından sinerjik olarak etki edebilirler. Endotel hücreleri hiperpolarize edici bir faktör (EDHF) de salgırlar. Bunun ise kesin doğası bilinmemektedir ama araşidonik asidin metaboliti olasılıkla da epoksit veya lipoksittir.

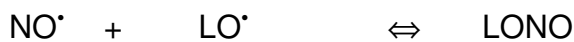
Endotelden kaynaklanan en az iki vazokonstriktör faktör (EDCF) bulunmaktadır. Bunlardan EDCF₁ indometazine duyarsız olup “endotelin” adlı peptid olabileceği düşünülmektedir. EDCF₂ ise indometazine duyarlıdır ve superoksit anyonları olabileceği düşünülmektedir (67).

Agrege olan trombositlere karşı endotelyuma bağlı relaksasyonlar esas olarak adenin nükleotidler (ADP, ATP) ve serotonin aracılığıyla gerçekleşir. Endotelyuma bağımsız olan kontraksiyonlar serotonin ve tromboksanlar tarafından gerçekleşir. Normal koşullarda sağlam bir endotelde relaksasyon ve kontraksiyonlar dengededir. Buna karşılık rejenerasyon durumunda iken hiperkolesterolemi ve aterosklerozda fonksiyon bozukluğu gösterir, daha az EDRF salgılar, oysa düz kas hücrelerinin kontraksiyon yeteneği değişmemiştir. Aterosklerozda hem EDRF hem de PGI₂ ‘nin üretimi azalır ve bunların agrege olan trombositlere karşı gösterdikleri sinerjik etkiler ortaya çıkmayabilir (70).

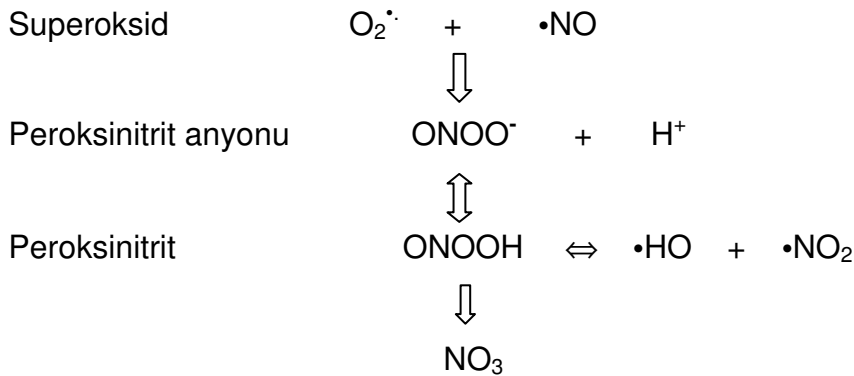
Sonuç olarak; endotelyumun yalnızca kan ile dokular arasında madde alışverişinin yapıldığı nontrombojenik bir bariyer olmayıp aynı zamanda güçlü vazoaaktif, antikoagülan ve fibrinolitik maddeler üreten, vücudun en büyük ve en aktif parakrin organı olduğu anlaşılmıştır. Bugün endotelyumun yapısal ve işlevsel bozukluklarının koroner damar hastalıklarını da kapsamak üzere birçok vasküler hastalığın patogenezinde önemli roller oynadığına inanılmaktadır.

II.4.7. Lipid radikalleri ve nitrik oksid

NO[•] lipid radikali (L[•]), lipid alkoksil radikali (LO[•]) ve lipid peroksil radikali (LOO[•]) lipidperoksil NO ürünlerini oluşturarak antioksidan etki sağlayabilmektedir (kaynak). Bu reaksiyonlar;



II.4.8. Nitrik oksid ve süperoksid etkileşimleri:



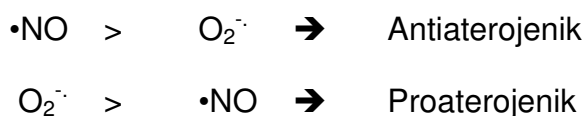
NO^{\cdot} süperoksid anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) ile peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$) peroksinitröz asidini ($ONOOH$) oluşturur. Bu oluşan maddenin %20 ile 30'u hidroksil radikali (OH^{\cdot}) ve NO_2^{\cdot} 'e dönüşebilir (71).

Oluşan peroksinitritin bazı bileşikler üzerinde oluşturduğu etkiler bulunmaktadır. Bunlar:

- Lipidler üzerine etki göstererek lipid peroksidlerinin oluşumu
- Metalloproteinlerden bakır salınımı ile methemoglobin oluşumu, seruloplazmin elektron transport zincir enzimleri ve ATP sentaz inhibisyonu
- Sülfürlü aminoasitlerde tiyol içeren aminoasitlerin ve GSH gibi peptidlerin nitrozotiyollere dönüşümü
- Aromatik aminoasitlerde demir varlığında tirozin kalıntılarının nitrasyonu
- Antioksidanlar üzerine olan etkiyle plazma antioksidanlarının oksidasyonu
- Peroksinitritin Fe^{+3} ile $2 e^-$ alıp, demir nitrozonyum katyonunu oluşturarak proteinlerde 3 nitro tirozin meydana getirip sinyal ileti için gereken fosforilasyonu önlemesidir

Damarlarda NO ve süperoksid arasında bir denge bulunmaktadır. NO fazlalığında $ONOO^-$ (peroksinitritin) prooksidan etkisi NO^{\cdot} 'nun antioksidan etkisi ile baskılanır ve bu yolla antiaterojenik etkisi sağlanır. Süperoksid ($O_2^{\cdot-}$) fazlalığında ise peroksinitrite bağlı olarak proaterojenik etki oluşur (67).

Damarlarda NO ve süperoksid dengesi:



II.4.9. Nitrik oksidin düzeylerini etkileyen faktörler

Nitrik oksid birçok hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır. Bununla birlikte NO'nun hem yararlı hem de zararlı olabileceğine ilişkin in vivo örnekler vermek mümkündür;

Bir transmitter olarak kendi rolü içinde NO, sinir uyarılarının düzenli transmisyonundan sorumludur. Bununla birlikte NO ile aşırı stimülasyon sinir hücrelerinin tahribine yol açabilir.

Nitrik oksidin paradoksik doğasına başka bir örnek de kan basıncının kontrolüdür. Kan basıncı sabit bir biçimde NO konsantrasyonundaki fizyolojik yükselme ve açıklamalarla ayarlanmaktadır. Bununla birlikte, örneğin endotoksik şokta görülebildiği gibi çok büyük miktarda bir NO salgısı fatal dolaşımda yetmezliğe yol açabilmektedir. Bu olay tedavi stratejisinin hastanın bazal NO durumuna dayanması gerektiğini göstermektedir. Eğer hastada NO yetmezliği varsa hastaya nitratların verilmesi veya doğal substrat olan L-arginin uygulanarak vücut NO üretimi için stimülasyon sağlanmalıdır.

Nitrik oksidin masif üretimi halinde ise L-NMMA veya aminoguanidin gibi NOS enzim inhibitörleri verilebilir. Bu bakımdan NO düzeyinin kontrol edilmesi, spesifik farmakolojik girişimle hastanın NO dengesinin normal durumuna döndürülmesi demektir.

Koroner kalp hastalığının tedavisinde nitrat kullanımı klasik bir uygulamadır. Koroner hastasında hasar uğramış endotelyum yeterince EDRF (bir deyişle NO) üretmez ve ortaya çıkan EDRF açığı sıklıkla koroner spazmlarına yol açar. Ekzojen olarak uygulanan nitratlar, damarların hastalıktan etkilenmiş segmentlerinde endojen NO yokluğunu giderebilir. Bu şekilde NO'nun düz kas hücreleri üzerindeki direkt etkisiyle koroner damarların kasılma / gevşeme dengesi eski normal durumuna dönmüş olur (72).

II.4.10. Kardiyovasküler sistem ve nitrik oksid

Nitrik oksid, sGC enzimini aktive ederek cGMP düzeylerini artırır;

- Vasküler düz kas hücrelerinde relaksasyona ve trombositlerde de adezyon ve agregasyonun inhibisyonuna neden olur.
- Lökositlerde NADPH oksidaz inhibisyonu ve endotele lökosit adezyonunu engelleyerek antiinflamatuvar etki sağlar.

- Eritrositlerdeki Hb ile inaktive edilebilir.
- Lipid peroksidaz radikali ile birleşip antioksidan ve antiaterosklerotik etki oluşturabilir.
- Süperoksid radikalleri ile etkileşip onları temizler veya toksik peroksinitrit oluşumuna neden olur (67,72).

NO' nun kardiyovasküler sistem ilişkili olduğu konulara kısaca değinirsek,

II.4.10.1.Koroner arter spazmı:

Hasarlı endotel hücrelerinin bulunduğu alanda koroner damarların düz kas hücreleriyle güçlü vazokonstriktör maddeler direkt temasa geçer ve bu maddelerin bu alanlardan üretimi ve salınması artabilir. Bunlardan dolaşımdaki vazokonstriktörler (noradrenalin ve angiotensin II), trombositlerden kaynaklanan serotonin ve tromboksan A₂ gibi vazokonstriktörler kadar özel bir önem taşırlar. Bunların tamamı vazokonstriktör yanıtların artmasında ve sonuçta koroner arterlerin spazmında pay sahibi olabilirler (73).

Koroner spazm ya spontan olarak (özellikle varyant anjinalı hastalarda) ya da aterosklerotik koroner arter hastalıklarının seyri sırasında ortaya çıkabilir. Gerçekten anstabil anginada, gelişmekte olan miyokard infarktüsünde koroner arterlerin durumu iskemi ve infarktüsün oluşmasında önemli bir paya sahiptir. Koroner vazokonstriksiyon, stabil koroner arter hastalığı olan hastaların anjina eşliğini de değiştirebilir. Bu klinik olaylara NO yetmezliğinin önemli bir katkısının olması olasıdır.

Koroner anjiyografi, bilerek yapılan endotel hasarının bir modelidir. Bundan dolayı girişim sırasında veya sonrasında tehlikeli bir koroner spazmın görülebilmesi şaşırtıcı değildir. Spazma karşı eğilim balon kateterin manuplasyonunun neden olduğu, endotel hücrelerinin fonksiyonel bozukluklarının eşlik ettiği endotel hasarı kaybı ile açıklanabilir. Aynı zamanda bu koşullar altında trombosit aktivasyonu da güçlenmiştir.

II.4.10.2.Ateroskleroz:

Ateroskleroz varlığında endotele bağımlı relaksasyon hem deney hayvanlarında hem de hastalarda belirgin biçimde azalır. Her ne kadar gerçek endotel soyulması görülebilirse de (özellikle plak yırtık alanlarında) normal

olarak endotel tabakası morfolojik olarak varlığını sürdürür fakat endotel hücrelerinin biçim ve büyüklüğünde belirgin değişiklikler görülür.

Hiperlipidemide olduğu gibi endotel disfonksiyonunun mekanizmaları arasında NO'nun süperoksid anyonları tarafından yıkımının artması kadar reseptör fonksiyonunun bozulması, endotel hücrelerinin NO prekürsörü olan L Arginini alma veya metabolize etme kapasitesinde azalma sayılabilir. Gerçekten hiperkolestrolemik tavşanlarda endotel hücrelerinin süperoksid üretimi artmıştır.

Aterosklerotik koroner arterlerde bozulmuş olan endotelyuma bağımlı yanıtlar vazokonstriktör yanıtları arttırabilir, lokal kan akımını azaltabilir ve dolaşımdaki trombositlerin preaktivasyonuna yol açabilir (67,72).

Nitrik oksid yıkımının azalması veya durması vasküler düz kas hücrelerinin mediadan intimaya migrasyonunun artışı ve aterosklerotik plakların gelişmesinde pay sahibi olabilir (NO'nun antiproliferatif etkisi nedeniyle). Nitrik oksid dolaylı olarak aterosklerozun ilerlemesini de etkileyebilir. Gerçekten NO'nun fonksiyonunu inhibe edici kapasitesi aynı zamanda trombositlerden PDGF ve TGF β_1 gibi büyüme faktörlerinin salgılanmasını inhibe eder.

Bozulmuş kan akımına bağlı vazodilatasyon egzersiz sırasında hastaların angina eşliğini daha da düşürebilir ve kan damarı duvarını sempatik aktivasyon sırasındaki vazokonstriktör uyarılara karşı duyarlı kılabılır. Bu fenomenlerin sonucunda daha büyük bir iskemi ve angina pectoris ortaya çıkar. Koroner damar tonusunun akut olarak artmasıyla angina pectorise neden olan kritik damar daralması oluşur. %60'lık bir lümenin varlığını sürdürebilmesi halinde (%40 stenoz) vasküler tonustaki bir artış ılımlı lümen darlığını, %90'ı aşan ileri derecede stenoza dönüştürebilir. Budan dolayı vazokonstriktör yanıtlardaki lokal değişimler dinamik stenozu önemli ölçüde etkileyebilir (69).

II.4.11.Mikrosirkulasyon:

Her ne kadar EDHF bu düzeyde önemli ölçüde katkıda bulunabilirse de deneysel bulgular, NO'nun mikrosirkulasyondaki vazodilatasyondan da sorumlu olduğunu göstermiştir. Daha da önemlisi NO ve olasılıkla diğer endotel kaynaklı mediyatörler, mikrovasküler yatağın her yanında kan damarlarının davranışını koordine edici bir etki gösterirler. Ayrıca mikrosirkulasyondaki endotelyuma

bağımlı vazodilatasyon hipertansiyon, diyabet ve özellikle de hiperlipidemi de bozulmuştur (70,74).

II.4.11.1.Kardiyovasküler sistem üzerindeki diğer etkiler

Özellikle koroner dolaşımında, büyük epikardiyal koroner arterlerin önemli özelliği kan iletme yeteneğini artırmak ve miyokarda ulaşan kan volümünü yükseltmek için, egzersiz sırasında dilate olma kapasitesine sahip olmalarıdır. Bu akıma bağımlı vazodilatasyon, endotelyuma bağımlı olup NO'nun aracılık ettiği bir olaydır. "Shear stress" endotel hücrelerindeki iyon kanallarını aktive edebilir ve böylece NO salgısını tetikleyebilir. Bu sayede endotel hücrelerinin fizik faktörlere karşı gösterdiği lokal yanıtlarla yeterli koroner kan akımı önemli ölçüde düzenlenmiş olur (74).

Nitrik oksid salgılanmasının diğer fakat daha az etkili tetikleyicisi de oksijen eksikliğidir. Böylece miyokardial oksijen açığı yalnızca ikaz edici bir klinik sinyal olarak anginal ağrıya yol açmakla kalmaz, aynı zamanda koroner arterlerde NO salgılanmasını da indükler.

Son çalışmalar, NO'nun vasküler düz kas ve trombositler üzerindeki etkilerine ek olarak endokardiyum ve belki koroner vasküler endotelyum aracılığıyla kalp boşluklarının modüle edilmesi üzerinde de bir etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir (72).

Nitrik oksidin egemen olarak damar duvarındaki düz kas tabakasına doğru salgılanması ve daha az oranda da damar lümenine doğru salgılanması daha olası görülmektedir. Damar lümenindeki NO, dolaşımdaki trombositlerle etkileşir aksi halde çözülmüş oksijen ve süperoksit anyonları tarafından hızla inaktive edilecektir.

Nitrik oksid bir defa eritrositlere ulaşip onların içine girdiğinde hemoglobin tarafından inaktive edilir. Gerçekten hemoglobin güçlü bir NO inhibitörüdür. Çünkü kendi molekülünün "hem" bölümünde serbest radikali bağlamaktadır. Bu etkiler salgıladığı alandan uzakta etki yapmaktan alıkoyar ve onun primer olarak neden trombosit fonksiyonu ve damar tonusunun önemli bir medyatörü olduğunu açıklar. Bundan dolayı endotel fonksiyonuna bağlı olarak NO üretiminin bozulması veya durması komşu sağlıklı endotel hücreleri tarafından salgılanan NO ile kompanze edilemez.

Hayvan çalışmalarından, NOS inhibitörlerinin kortizon ve/veya testesteron düzeylerini artırdığına dair kanıtlar elde edilmiştir. Uterusun kasılma ve gevşemesinde NO aracılığıyla kontrol edilmektedir. Dolayısıyla NO modulatorleri jinekolojide de kullanım alanı bulabilir.

II.4.12.Sindirim sistemi ve nitrik oksid

Sağlıklı bir mide mukozasının irritasyona karşı yanıtı, kan akımında artış ve bir mukoza bariyerinin oluşmasıdır. Bu koruyucu mekanizma NO' ya bağımlı olarak çalışır. Bu nedenle NO' nun mukoza ülserlerini önlemede sorumlu olduğu düşünülür (75).

Nitrik oksid, gastrointestinal traktüsün nöronal kontrolüne de karışır. Bilinen nörotransmitterlere ek olarak, gastrointestinal sinir merkezi Auerbach pleksusunda bilginin yayılmasından, kimliği belirlenmemiş bir fantom' un sorumlu olduğu düşünülürdü. "Nonadrenerjik-nonkolinerjik" (NANC) adı verilen sinir sisteminin nörotransmitterlerinden en az birinin NO olduğu artık bilinmektedir (76). Bu, örneğin; besin yutulduğunda, normalde kasılmış bulunan mide duvarı ve pilorun, NO' ya bağımlı bir dilatasyona uğramasını açıklar.

Barsak peristaltizmi, medulla spinalis karışmaksızın, otonomik olarak kontrol edilir. Barsak duvarının NO' ya bağımlı, refleks, proksimal kontraksiyonu ve distal dilatasyonu barsak kapsamının barsak boyunca taşınmasından sorumludur (77).

II.4.13. Diğer sistemler üzerine olan etkileri

- Hipertansiyonun belli formlarında vazokonstrüktör maddelerin arttığı bilinmektedir. Endojen vazodilatatör olan NO' nun boşalmasına bağlı olarak hipertansiyon meydana gelmektedir. Ayrıca anjiotensin II' nin fizyolojik antagonisti olması ve renin salınımını düzenlemesi nedeniyle NO hipertansiyon üzerinde etkilidir (78).
- NO trombosit agregasyonunu inhibe etmektedir
- İskemi dönemlerinden sonra kan damarlarına gerekli olan kan akımı yeniden sağlandığında bir oksijen paradoksu oluşmaktadır. Beklenen bir iyileşme yerine tutulan dokuda nekroz meydana gelmektedir. Bu hasara oksijen

radikallerinin neden olduğu düşünülmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda nitrik oksid derivelerinin bu hasarı azalttığı gösterilmiştir (78).

- Diyabetin her formunda, gecikmiş vasküler lezyonların gelişmesinde kısmen de olsa NO yetersizliğinin sorumlu olduğu bilinmektedir (79).
- Nitrik oksidin ayrıca bronkospazmın giderilmesinde, vücudun kansere karşı savunmasında, otoimmün reaksiyonlarda, nörotransmitter olarak beyin fonksiyonlarında ve ağrı oluşumunda önemli rol aldığı gösterilmiştir (78,79).

II.4.14. Nitrik oksid ölçüm yöntemleri:

NO in vivo olarak az miktarda sentezlendiğinden ve oksijen ile hızla reaksiyona girdiğinden ölçümü zordur (68).

- Kemilüminesans (NO, nitrit, nitrat)
- UV – Vis spektrofotometrik yöntem (Griess, MetHb)
- ESR (EPR) – spektroskopisi
- Flow sitometri
- Gaz kromatografisi
- İnfrared spektroskopisi

II.5. ANTİOKSİDAN SAVUNMA

Hücreler oksidatif hasarı önleyen, yok eden ya da kısmen azaltan bazı mekanizmalara sahiptir. Oksidanlarla mücadelede birinci aşama risk faktörlerinin belirlenmesi ve bunlardan uzak durulmasıdır. İkinci yol ise doku hasarına yol açan olayın etkisi ile tetiklenen biyokimyasal tepkimeleri bir ya da birkaç basamakta engellemektir. Bu amaçla yapılabilecek girişimler şunlar olabilir: Na⁺ aktif girişinin engellenmesi, K⁺ girişinin aktive edilmesi, hücre içi laktik asidozun inhibisyonu, sitotoksik ve vazojenik antiödem girişimler, yeniden fosfolipid sentezi hızlandırıcıları, kalsiyum kanal blokerleri, lipid peroksidasyonu ve siklooksijenaz inhibitörleri, lökotrienlerin inhibisyonu, opiat antagonistleri, PAF inhibitörleri, H₂ reseptör antagonistleri, atrial natriüretik peptid, hipotermi (8,80). Üçüncü aşama aktive olmuş nötrofillerin lezyon bölgesine hücumunu ve birikimini inhibe etmek için antiinflamatuvar ilaçların kullanılmasıdır. Dördüncü ve en etkin yol artmış oksidanlara doğrudan etki ederek onları ortamdaki kaldırmaktır. Direkt etki ile oksidanları inaktif hale getiren maddelere

“antioksidanlar” denir. Tüm antioksidanlar başlıca dört yol ile etkilerini gerçekleştirmektedirler. Bu etkiler;

a- Scavenging etki

Oksidanları tutma ve zayıf bir moleküle dönüştürme etkisidir. Enzimler bu şekilde etki eder.

b- Quencher etki

Oksidanalara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme tepkimesidir. Vitaminler, flavanoidler bu şekilde etki eder.

c- Onarma etkisi

d- Zincir koparma etkisi

Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarının önlenmesi etkisidir. Ağır minareller, hemoglobin, seruloplazmin bu yolla etki eder.

Halliwell ve Gutteridge' ın (81) belirttiğine göre antioksidanlar okside edilebilen substrata göre göreceli olarak daha düşük düzeylerde bulunan ve o substratın oksidasyonunu anlamlı derecede geciktiren ya da inhibe eden maddelerdir.

II.5.1. Doğal antioksidanlar

II.5.1.1. Enzimler

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

II.5.1.2. Nonenzimatik antioksidanlar

- Seruloplazmin; demiri okside eder.
- Transferrin; dolaşımdaki demiri bağlar.
- Hemoglobin; oksidanları bağlar.
- E vitamini ve analogları; lipid peroksidasyon zincirini kırarlar.
- C vitamini $O_2 \bullet$ ve $OH \bullet$ 'i direkt olarak tutar, E vitaminini rejenere eder.

- Tiyol içerenler (glutasyon, N asetil sistein, metiyonin); serbest radikal ve HOCl tutucusudur.
- A vitamini; direkt olarak peroksillere etki eder.
- Ürik asid; $O_2 \bullet$, $OH\bullet$ ve peroksil tutucusudur.
- Sistein; $O_2 \bullet$ $OH \bullet$ tutucusudur.
- Ubikinon; serbest radikal tutucusudur.
- Glikoz; hidroksil radikal tutucusudur.
- Bilirubin; $O_2 \bullet$ ve $OH \bullet$ tutucusudur.
- Albümin; bakırı bağlar, LOOH ve HOCl tutucusudur.
- Pirüvat; hidrojen peroksid tutucusudur.
- Haptoglobülin; hemoglobini bağlar.
- Hemopeksin; serbest hemi bağlar.

Ayrıca hücre içi bölükleri, en etkin endojen antioksidan mekanizmayı sağlarlar. Mitokondri, lizozom, peroksizom ve sitoplazma serbest radikal üreten sistemlere karşı savaşan antioksidan savunma mekanizmaları ile eşleşmiştir (82).

II.5.2. İlaçlar

- Ebselen; endojen glutasyon peroksidaz aktivitesini artırır.
- Demir şelatörleri; desferroksamin, dimetil tioüre, serüloplazmin; serbest Fe^{+3} ü bağlarlar.
- Sitokinler (TNF ve interlökin-1).
- Ksatın oksidaz inhibitörleri (allopurinol, oksipürinol); ksatın oksidaz tarafından süperoksid anyon üretimini inhibe ederler.
- Proteaz inhibitörleri; serin proteaz inhibitörleri, fenilmetilsülfonil florid; ksantin oksidazın ksantin dehidrogenaza dönüşümünü bloke ederler.
- NADPH oksidaz inhibitörleri; adenzin, lokal anestezikler, Ca^{+2} kanal blokerleri, nonsteroidal antiinflamatuvar ajanlar; nötrofil ve makrofajlardaki NADPH oksidaz üretimini inhibe ederler.
- Mannitol; $OH\bullet$ radikalini tutar.
- Barbitüratlar
- Flavonoidler
- Trimetazidin

III. MATERYAL VE METOD

III.1. ARAÇ VE GEREÇLER

1. **Benmari:** Medingen W 22
(0-99 °C) (Germany)
2. **Homojenizatör:** IKA Labortecnic T 25 basic
(8000-24000 devir/dakika) (Germany)
3. **Elektronik terazi:** Sartorius/ Basic (USA)
4. **Otomatik pipetler:** Biohit-Proline-Isolab
5. **pH metre:** Sartorius PP-15.(USA))
6. **Santrifüj:** Hettich Rotina 35 R / Soğutmalı(Germany)
7. **Spektrofotometre:** Shimadzu UV 1601 (Japan)
8. **Manyetik karıştırıcı:** Ikamag RH / Isıtmalı (Germany)
9. **Derin dondurucu:** Nuaire Ultralow Freezer (-85 °C)
10. **Cam pipetler:** Precicolor HBG (Germany)
11. **Vorteks:** Yellowline (USA)

III.2. ÇALIŞMA MATERYALLERİ

200-250 gram ağırlığında 25 adet Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Tüm sıçanlara daha önce Chojkier ve Grozsmann tarafından rapor edilen parsiyel portal ven ligasyonu modeli ile portal hipertansiyon oluşturuldu (11).

Parsiyel portal ven ligasyonu farklı hayvanlarda, özellikle ratlarda portal hipertansiyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (10,12-14). Parsiyel portal ven ligasyonu 20 gauge kanül üzerinden yapılmakta ve kaldırıldığında portal ven eski çapına dönmektedir. Kolay uygulanabilir ve tekrarlanabilir olması bu metodun tercih edilir bir yöntem olmasını sağlamaktadır (15).

Sıçanlar 2 gruba ayrıldı.

I.Grup (13 adet) :Kontrol grubu

II.Grup (12 adet) :Portal hipertansiyon oluşturulmuş grup

Sekiz haftalık prehepatik portal hipertansiyon indüklenmesi yapıldı. Bütün denekler geçen bu süre boyunca standart yem ve su ile beslenerek 12 saat sürekli aydınlık, 12 saat sürekli karanlık ortamda tutuldular. Parsiyel portal ven ligasyonu için ketamin anestezisi sonrası kanlar, kardiyak ponksiyon ile alındı. Daha sonra da böbrek dokuları çıkarıldı. Dokular hemen soğuk izotonik su ile yıkandı. Kan ve diğer dokulardan temizlenip alüminyum folyeye sarılarak elde edilen serumlarla beraber -80 °C derin dondurucuda MDA, NO, MPO, Üre ve Kreatinin tetkiklerinin yapılacağı zamana kadar saklandı. MDA, NO ve MPO düzeylerini çalışmak için böbrek dokuları tris-HCl tamponu ile (pH:7,5) homojenize edildi. Elde edilen homojenat MDA, MPO ve protein tayininde kullanıldı, homojenat deproteinize edildikten sonra NO düzeyleri saptandı. Tüm yöntemler böbrek dokusunda spektrofotometrik olarak tayin edildi. Üre ve kreatinin düzeyleri ise serumda ticari kit kullanılarak geleneksel yöntemlerle fotometrik olarak tayin edildi.

III. 3. DOKULARIN HOMOGENİZASYON İŞLEMLERİ

III.3.1. Homojenizasyonda kullanılan reaktifler:

PH 7.5, 0.2 mM Tris-HCl tamponu hazırlandı (83). MDA ve NO çalışmalarında bu tampon kullanıldı. Myeloperoksidaz çalışmasında ise tampon olarak % 0.5' lik hexadecyltrimethyl ammonium bromid kullanıldı.

III.3.2 Homojenizasyonda yapılan işlemler ve numunelerin hazırlanması:

Yaş ağırlıkları 1 gr. olarak ayarlanan dokular, soğukluğu muhafaza edilerek temiz cerrahi makasla parçalara ayrıldı. Cam tüpe aktarılan doku üzerine 2 ml. Tris-HCl tamponu eklendi. Buz doldurulmuş plastik kap içerisine yerleştirilen cam tüpteki doku 16.000 devir/dakika hızda homojenize edildi. Son hacim doku ağırlığının 10 katı olacak şekilde tampon ilave edildi. Tekrar homojenize edilerek süre 3 dakikaya tamamlandı. Homojenatın ısı artırılmadan tüplere aktarıldı ve tüpler numaralandı. Elde edilen homojenatlardan NO ve protein tayinleri yapıldı.

Cam tüplere doku ağırlığının 5 katı olacak şekilde % 0,5' lik heksadecyltrimethyl ammonium bromid ilave edilerek 16.000 devir/dakika hızda homojenize edildi. Elde edilen homojenat 3220 rpm/dakika +4 °C' de 45 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatandan myeloperoksidaz ve protein tayinleri yapıldı.

Ayrılan serumlardan rutin biyokimya otoanalizörü ile üre ve kreatinin fotometrik olarak tayin edildi.

III. 3. PROTEİN ÖLÇÜMÜ (LOWRY METODU) :

Deneyin Prensibi: Alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşmaktadır. Bu kompleks fosfomolibdatfosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteus-Phenol Reaktifi) redüklemekte ve koyu mavi bir renk oluşmaktadır(88). Burada rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Kullanılan Kimyasal Maddeler: CuSO₄, Na₃Sitrat, Na₂CO₃, NaOH, Folin-Ciocalteus -Phenol Reaktifi

Kullanılan Reaktifler:

A Reaktifi: 0.5 gr. CuSO_4 ve 1 gr. Na_3Sitrat 100ml. distile suda çözüldü.

B Reaktifi: 20 gr. Na_2CO_3 ve 4 gr. NaOH 1 L distile suda çözüldü

C Reaktifi: 50 mL B reaktifine 1mL A reaktifi eklendi.. Reaktif taze hazırlanmalı ve bekletilmeden kullanılmalıdır.

D Reaktifi: Folin-Ciocalteus-Phenol Reaktifi, 1/1 oranında sulandırılarak hazırlandı.

Deneyin Yapılışı: Ağzı kapanan mika tüplere;

Lowry Metodu	Kör tüpü	Numune tüpü
Numune (μL)	-	10
Distile su(μL)	500	490
C reaktifi(μL)	2500	2500

Karıştırılarak 10 dakika beklendi.

D reaktifi(μL)	250	250
-----------------------------	-----	-----

Tüpler vortekslenerek 20-30 dakika oda ısısında inkübe edildi.

Spektrofotometrede 700nm' de numunenin ve standardın absorbanısı köre karşı okundu.

Hesabı:

Protein Standart Grafiği: Konsantrasyonları bilinen Bovin serum albuminden hazırlanmış çözeltiler kullanılarak Optik dansite (OD) – mg / mL protein konsantrasyon grafiği çizildi. Numunelerin absorbanları bu grafikten yararlanılarak hesaplandı. Sonuçlar mg/mL olarak verildi.

III. 4. NİTRİK OKSİD ÖLÇÜMÜ

Deneyin Prensibi: Vücutta endojen olarak üretilen nitrik oksitin doku ve vücut sıvılarındaki konsantrasyonu, pek çok çalışmada nitrit ve nitrat olarak ifade edilmiştir. (18). Çünkü nitrik oksit, üretildiği bölgede saniyeler içinde okside olarak önce nitrite (NO_2^-) daha sonra da nitrata (NO_3^-) dönüşür. Bununla beraber proteinden zengin homojenat, serum, plazma gibi solüsyonlarda spesifik olmayan reaksiyonlar oluşabileceğinden, biz bu non spesifik reaksiyonların önüne geçebilmek için homojenatları önce deproteinize edilip sonra nitrit ve nitrat konsantrasyonlarını ölçtük. Bu amaçla NO problemleri

geliştirilmiştir ama bunların in vivo/ex vivo şartlarda çalışması mümkün değildir.
(19)

Dokularda nitrit ve nitrat miktarı deproteinizasyondan sonra Griess reaksiyonu ile belirlenir (20). Total nitrit (nitrit+nitrat) konsantrasyonu modifiye kadmiyum redüksiyon metodu ile belirlendi. PH 9.7 glisin tamponunda bakır (Cu) kaplı kadmiyum granülleri deproteinize numunenin süpernatantı ile 90 dakikalık inkübasyon sonunda nitrat redüksiyonu sağlandı. Üretilen nitrit, sülfanilamid ve buna bağlı N-naphthylene diaminin (NNDA) diazotizasyonu ile reaksiyonu sonucu oluşan pembe rengin 545 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunması ile belirlendi.

Kullanılan Kimyasal ve Reaktifler

1. Kadmiyum granülleri
2. Glisin-NaOH tamponu (pH: 9.7): 7.5gr. glisin 100mL deiyonize suda çözüldü. 2mol/L NaOH ile pH' sı 9.7' ye ayarlanarak son hacim 1000mL' ye deiyonize su ile tamamlandı. Tampon +2-8 °C' de 1 ay saklanabilir.
3. Sülfanilamid: 5gr. Sülfanilamid tartılıp 500mL 3M HCl içerisinde çözüldü. Oda ısısında 1 yıl korunur.
4. N-Naphtylene daimine (NNDA): 50mg. NNDA alınıp 250 mL distile suda çözüldü.
5. 5mmol/l CuSO₄ solüsyonu hazırlandı.

Standart Solüsyonu: 0.1 mol/L NaNO₂ kullanılır.

1. 75mmol/L ZnSO₄ solüsyonu
2. 55mmol/L NaOH solüsyonu

Deneyin Yapılışı: Önce homojenatların deproteinizasyon işlemi yapıldı.

500µL homojenat+ 2mL 75mmol/L ZnSO₄ ile vortekslenir.2.5mL NaOH eklenip tekrar vortekslenerek 3500gx 10 dakika santrifüj edildi. Berrak süpernatant nitrat tayininde numune olarak kullanıldı.

Kadmiyum granüllerinin aktive edilmesi: Kadmiyum granülleri 3 defa deiyonize su ile yıkanarak, 1-2 dakika 5mmol/L CuSO₄ solüsyonu içinde karıştırıldı. Solüsyon süzülerek döküldükten sonra granüller 1-2mL glisin tamponu ile yıkandı. Bakırla kaplanarak aktive olan kadmiyum granülleri 10 dakika içinde deneyde kullanılmalıdır. Deneyde kullanılan granüller distile su ile yıkanarak 0.1 mol/L H₂SO₄ solüsyonu içinde saklanır.

Nitrat tayini :

1. Aktive edilmiş kadminyum granüllü tüplerin üzerine 1mL glisin tamponu ilave edildi.
2. Üzerine 1mL deproteinize numune ve 2 mL deiyonize su eklenerek tüplerin ağzı kapatıldı.
3. 90 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda ara ara tüpler alt üst edilerek inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonunda nitrit tayini için numune olarak kullanılır.

Nitrit tayini

	Kör (mL)	Numune (mL)	St 1 (mL)	St 2 (mL)	St 3 (mL)
Deprot. Örnek	-	2	-	-	-
St 1	-	-	2	-	-
St 2	-	-	-	2	-
St. 3	-	-	-	-	2
Distile H ₂ O	2.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Sülphanil. Sol.	1	1	1	1	1
NNDA sol.	1	1	1	1	1

Vortekslenerek 20-60 (40) dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edildi.

Spektrofotometrede 545nm' de köre karşı okunan standart solüsyonlarından elde edilen " Optik Dansite-.Konsantrasyon ($\mu\text{mol/L}$) " grafiği ile numune sonuçları hesaplanır. Elde edilen değerler doku protein değerlerine bölünerek sonuçlar $\mu\text{mol/ gr}$ protein olarak verildi.

III.5. MYELOPEROKSİDAZ ÖLÇÜMÜ

Deneyin Prensi: Myeloperoksidaz enziminin aktivitesi MPO aracılı H₂O₂ ile yapılan oksidasyon için substrat olarak 4-aminoantipyrin/phenol solusyonu kullanılarak yapıldı (89).

1 enzim ünitesi, 25⁰C' de 1dakika 1 μmol H₂O₂' yi harcayan enzim olarak ifade edildi.

Kullanılan Kimyasal Maddeler: 4-aminoantipyrine, phenol, H₂O₂

Kullanılan Reaktifler:

Solüsyon 1: 25 mM 4-aminoantipyrine-%2 phenol solüsyonu

Solüsyon 2: 1.7 mM %30' luk H₂O₂

Deneyin Yapılışı

	Numune
Solüsyon 1	1.3 mL
Solüsyon 2	1.5 mL

Vortekslenir, 3 dakika beklenir.

Homojenat süpernatantı	0.2 mL
------------------------	--------

Küvet alt-üst edilerek beklenmeden spektrofotometrede 510nm' de 5 dakika boyunca olan absorbans artışı kaydedilir. Lineer aktivitenin gözlemlendiği absorbans değerleri hesaba katılır.

Hesaplama

1 enzim ünitesi (Ü); 25⁰C' de 1 dakikada 1µmol H₂O₂' yi hatcayan enzim miktarıdır. Elde edilen değerler doku protein değerlerine bölünerek sonuçlar U/g protein olarak verilmiştir.

III.6. MDA ÖLÇÜMÜ:

Deneyin prensibi:

Doku MDA düzeyleri Satoh ve Yagi'den modifiye edilen yöntemle göre, MDA'nın tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girerek oluşturduğu pembe rengin 532 nm'de spektrofotometrik olarak okunmasıyla ölçüldü (TBARS yöntemi)

Kullanılan reaktifler:

1. 1/12 N H₂SO₄
2. %10 Fosfotungstik Asit
3. 2M Na₂SO₄
4. 0.2 % Tiyobarbitürik asit (2 M Na₂SO₄' de çözülmüş)
5. n-bütül alkol
6. Standart 5nmol/L malondialdehid bis dietil asetal (1,1,3,3 tetra ethoksiopropan)
7. EDTA, Glutasyon: (Örnek hazırlanması için)

Deneyin Yapılışı:

Kapaklı santrifüj tüpüne 4 mL 1/12 N H₂SO₄, 0.5 mL homojenat, 0.5 mL %10 Fosfotungstik asit konulup tüpler oda ısısında 5 dakika bekletildi. 10 dk 3000/devir/dk santrifüjlenip süpernatantı atıldı. Presipata 2.5 mL 1/12 N H₂SO₄ eklendi. Tekrar aynı devirde santrifüjlenip süpernatant atıldı.

	Blank	Standart	Numune Örnek
1/12 N H ₂ SO ₄	2.5 ml	2.0 ml	2.5 ml
Standart		0.5 ml	
Tiyobarbitürik Asit	3.0 ml	3.0 ml	3.0 ml

Tüpler bu işlemlerden sonra 60 dk kaynar su banyosunda bekletilip soğutuldu. 3.0 ml bütül alkol köre, standarda ve numuneye eklendi. Hesaplama 530 nm'de köre karşı yapıldı ve değerler nmol/ml cinsinden bulundu.

III.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bu çalışmada bulguların istatistiksel analizinde SPSS for Windows 10.0 istatistik programı kullanılmıştır. Deskriptif istatistikler, ortalama sapmalar ve dağılım grafikleri çıkarılmıştır. Gruplarda veri dağılımı, medyan ve uç değerleri ortaya koymak için, dağılım grafiklerinden saplı kutu grafikleri (box plots) kullanılmıştır.

Gruplar arası farklılıklar ve anlamlılığı nonparametrik olarak, Mann Withney U testi ile değerlendirilmiştir. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. P<0.05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

IV. BULGULAR

Bu çalışmada her iki grubu oluşturan ratların böbrek dokularında NO, MPO ve MDA, serumlarında ise üre ve kreatinin düzeyleri çalışıldı.

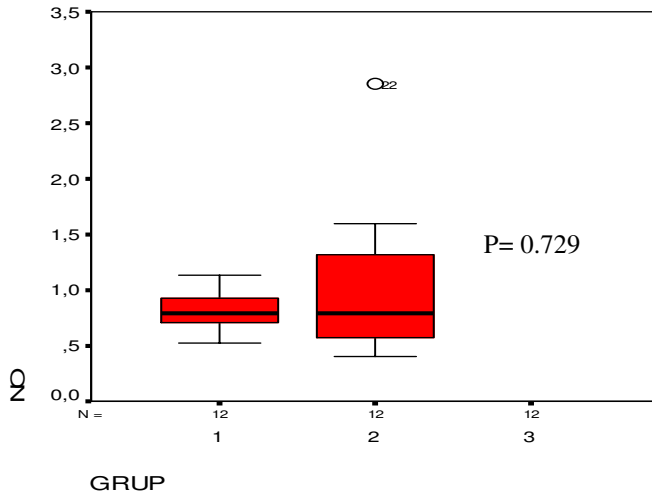
IV.1. GRUP 1 VE GRUP 2 NO, MPO, MDA, ÜRE VE KREATİNİN DÜZEYLERİ

Böbrek dokusunda NO, MPO, MDA düzeyleri serumlardan üre, kreatinin testleri araştırılmış ve sonuçları Tablo6'da ve Grafik-1,2,3,4,5' de verilmiştir.

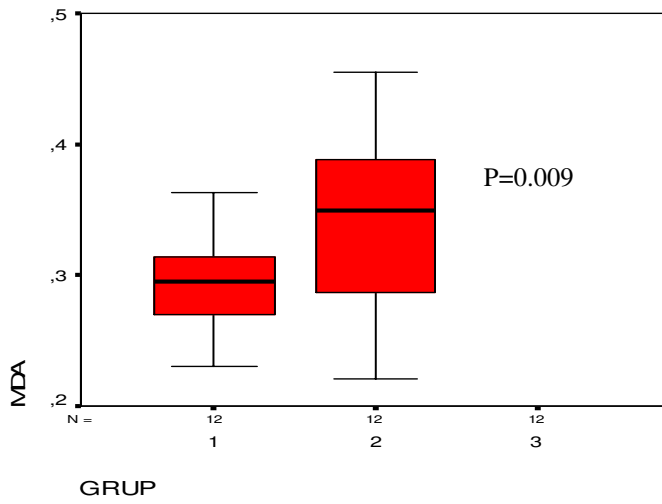
Tablo 6- Grup 1 (kontrol) ve Grup 2 (Portal Hipertansiyon) doku NO, MPO, MDA, serum üre ve kreatinin düzeyleri (ortalama±SD)

	Grup 1 (n= 12)	Grup 2 (n=13)	P değerleri
NO (µmol/gr protein)	0.801± 0.175	1.03 ± 0.69	0.729
MPO (U/gr protein)	0.1006 ± 0.098	0.104 ± 0.08	0.710
MDA (nmol/mL)	0.29 ± 0.03	0.351 ± 0.05	0.009
ÜRE (mg/dl)	47.5 ± 1.334	38.2 ± 1.191	0.008
KREATİNİN (mg/dl)	0.293 ± 0.0139	0.294 ± 0.0167	0.738

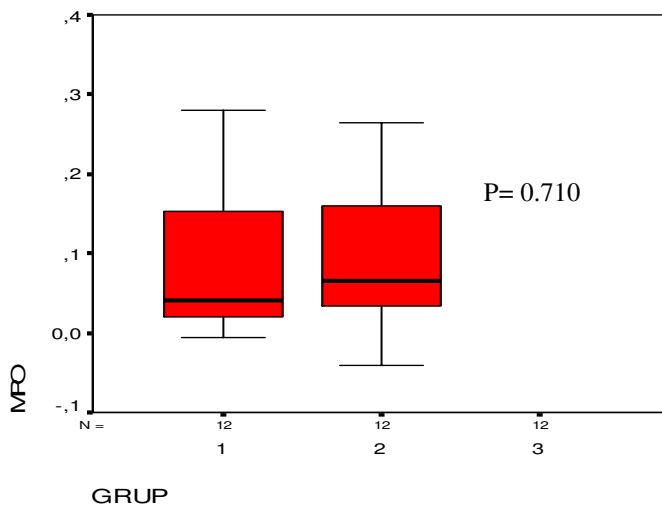
Her iki grup karşılaştırıldığında serum üre düzeyleri ve doku MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (sırası ile p=0.008, p=0.009). Serum kreatinin ve doku MPO, doku NO düzeyleri arasında herhangi bir fark saptanmadı.



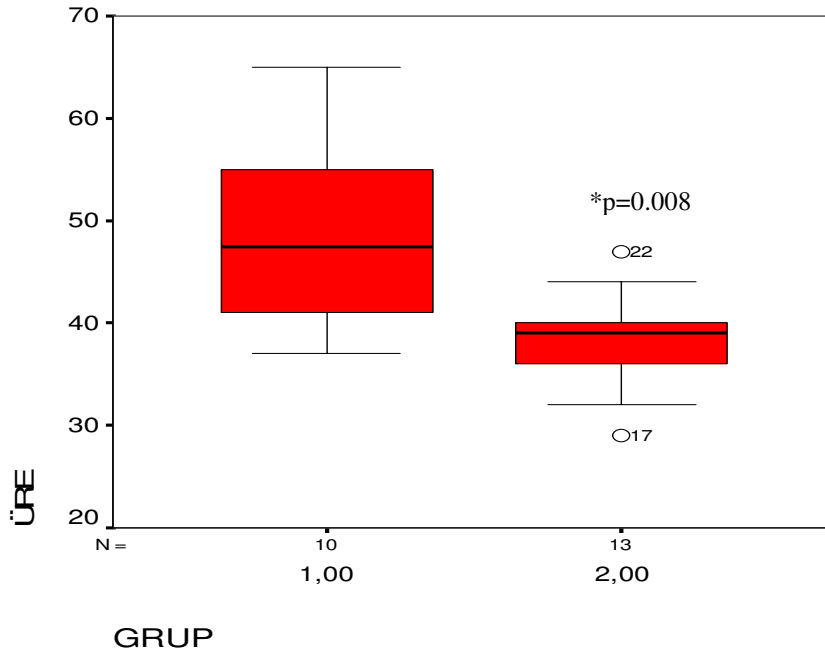
Grafik 1- Grup 1 (kontrol) ve Grup 2 (Portal Hipertansiyon) doku NO düzeyleri(µmol/gr protein)



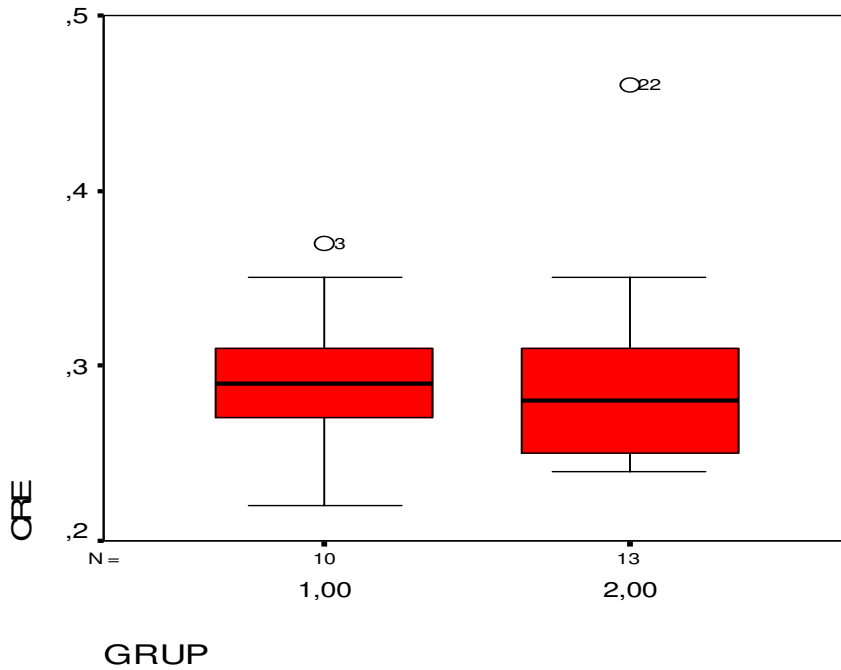
Grafik 2- Grup 1 ve Grup 2 doku MDA düzeyleri (nmol/ml).



Grafik 3- Grup 1 ve Grup 2 MPO düzeyleri (U/gr protein)



Grafik 4- Grup 1 (kontrol) ve Grup 2 (Portal Hipertansiyon) serum üre düzeyleri (mg/dl).



Grafik 5- Grup 1 ve Grup 2 serum kreatinin düzeyleri (mg/dl).

V. TARTIŞMA

Portal hipertansiyon, hemodinamik değişikliklerle karakterize olup, siroz'un en önemli komplikasyonlarından biridir. Etiolojisinde birçok farklı etkenin yer aldığı portal hipertansiyonda temel sorun; portal basıncın 10mm/Hg'nin üzerine çıkması, portal venöz sistemde direncin artması ve buna bağlı olarak splanknik kan akımındaki değişikliklerdir (1-4). Portal kan akımına karşı artmış direnç portal venöz konjesyona ve hipertansiyona neden olmaktadır (6).

Portal hipertansiyonda fizyopatolojik gelişim basamakları; portal kan akımına karşı artmış vasküler direnç, portosistemik kollateral dolaşımın gelişmesi, splanknik vazodilatasyon ve artmış splanknik akım, plazma volümünde artış, periferik vazodilatasyon ve hiperkinetik sistemik dolaşımın gelişmesi olarak özetlenebilmektedir (19).

Portal hipertansiyonda hiperdinamik bir dolaşım bozukluğu olduğu bilinmektedir. Artmış vazodilatatör madde üretiminin ve azalmış endojen katekolamin duyarlılığın, bu hiperdinamik dolaşımın oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir. Mathuna ve ark., Sherwin ve ark.'na göre sirozlu hastalarda yüksek konsantrasyonlarda bulunan ve potent bir vazodilatatör olan glukagon, artmış splanknik kan akışının sağlanmasında işe karışan birincil humoral maddedir (12,13).

Ratlar üzerinde yapılan bazı deneysel çalışmalarda portal hipertansiyonda görülen hiperdinamik durumun ve splanknik sirkülasyon değişikliklerinin artmış nitrik oksid formasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (84,85)

Shams ve arkadaşları (86), sirotik ve nonsirotik portal hipertansiyonlu vakaların serumlarında nitrik oksid düzeylerinin belirgin olarak yüksek olduğunu bulmuşlar ve nitrik oksidin portal hipertansiyonun patogeneğinde primer rol oynadığını düşünmüşlerdir.

Howe ve arkadaşları (87) portal hipertansiyon oluşturulmuş ratların portal venlerinde ve sistemik dolaşımalarında artmış nitrik oksit düzeyleri tespit etmişlerdir.

Grange JD V ve ark.ları(22) asit gelişmiş spontan bakterial peritonlu hastalarda, NO metabolit düzeylerini, asit gelişmemiş olanlara göre daha yüksek bulmuşlardır. Çünkü böbrek yetmezliği olan bu hastalarda efektif arterial kan basıncında azalış meydana gelmektedir.

Bizim çalışmamızda böbrek dokusunda NO düzeyleri portal hipertansiyonlu ratlarda kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu fakat istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı. Gerek endotelial disfonksiyonla, gerekse hepatit, kitle basısı, bilier sistem kaynaklı vb hadiselerle oluşan portal hipertansiyon patogenezinde, NO düzeylerinin önemli rolü olduğu anlaşılmıştır. Portal sistem endotelinden salgılanan NO düzeylerinde oluşabilecek bir azalma endotel disfonksiyon yaratıp portal sistem basıncını artırabilir. Primer nedeni endotel dışı olan siroz patogenezinde ise endotelden NO salgılanması, portal basıncın artışını engellemek için bir savunma mekanizması olarak artabilir. Fakat portal hipertansiyon karaciğere sınırlı olmayıp sistemik bulgular gösterdiğinden yakın veya uzak dokuların da PHT'nin sistemik zararlarından kendilerini korumak için benzeri savunma mekanizmaları kullanmaları beklenmelidir. Bizim çalışmamızda da böbrek dokusunda artmış NO düzeyleri saptandı fakat istatistiksel olarak fark bulunamadı. Bu artışın böbrek gibi çok iyi kanlanan ve yoğun endotel dokusuna sahip dokuların PHT'nin sistemik etkilerinden endotel fonksiyonlarını korumak amaçlı olduğu düşünüldü. İstatistiksel olarak anlam bulunamamasının nedeni böbrek endotelinin portal hipertansiyondan az etkilenmesi veya hiç etkilenmemesi mi yoksa denek sayısının azlığı mı sorularına cevap aranmalıdır. Bunu cevaplamak için örnek sayısının çok daha fazla olduğu çalışmalara ihtiyaç vardır.

Tsai ve ark.ları(21) Pugh's sınıflamasına göre inceledikleri asitli hastalarda asitsiz hastalara göre kreatinin klirensini ve renal kan akımını düşük serum kreatinin düzeyleri arasında ise fark bulamamışlardır. Tsai ve ark.daşlarının yapmış olduğu çalışmaya korele olarak biz de yaptığımız çalışmada kreatinin düzeyinde anlamlı bir fark bulamadık.

Ruiz-del-Arbol L ve ark.ları (23) enfeksiyon tanısında renal yetmezlik gelişen hastaların renal yetmezlik gelişmeyen hastalara göre TNF- α , BUN, plasma renin aktivitesi,norepinefrin,hepatik venöz basınç gradienti, periferal

vasküler rezistans, anlamlı şekilde daha yüksek, kardiyak outputları daha düşük bulmuşlardır. Ruiz-del-Arbol L ve ark.ları'nın yapmış olduğu çalışmaya korele olarak biz de yaptığımız çalışmada BUN düzeyinde yükseklik ve anlamlı bir fark bulduk.

Portal hipertansiyonda serbest radikallerin ve lipid peroksidasyonunun arttığını bildiren birçok çalışma vardır (24). Fakat PHT'da böbrek dokusunda MDA ve MPO metabolitlerinin bakıldığı bir literatüre rastlanmamıştır. Bu çalışmamızda PHT oluşturulmuş ratlarda böbrek dokusunda MDA düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.009$) olarak artmış bulduk. Portal hipertansiyonda karaciğerin birçok fonksiyonunun bozulması beklenir. Karaciğerde faz 1 ve faz 2 tepkimeleri ile gerçekleştirilen detoksifikasyon mekanizmaları da buna dahildir. Biriken toksinler konjuge edilemeyip dolaşıma geçebilir. Bu toksinlerin hedef organları arasında beyin (hepatik ensefalopati) ve böbrek (hepatorenal sendrom) ilk sıralarda yer alır. Bu dokulardan beyin, iyi beslendiğinden ve metabolizmasının kısıtlı olmasından dolayı en fazla zarar gören dokudur. Böbrek dokusu da çok iyi kanlandığından, işlevsel epitel dokuya sahip olduğundan ve endokrin bir doku olduğundan sistemik toksinlere hassastır. Böbrek dokusunda görülen bu MDA artışı olasılıkla karaciğer tarafında detoksifiye edilemeyen toksinlere bağlıdır.

Bu çalışmamızda MPO düzeylerinde kontrol grubu ile PHT'lu grup arasında anlamlı bir fark bulamadık. MPO nötrofiller tarafından bakteriyel lizis esnasında (solunumsal patlama) salgılanan bir radikaldir. PHT'da oluşan renal hasar, mikrobik ajanlardan ziyade toksinlere bağlı olduğundan, MPO düzeylerinde herhangi bir farklılığın bulunamadığını düşünmekteyiz.

VI.KAYNAKLAR

1. Schwartz S. Portal hypertension. *Principles of Surgery*. 1999; 2: 1415-1431.
2. Sherlock S. The portal venous system and portal hypertension. *Disease of The Liver and Biliary System* 1993; 132-173.
3. Klein A, Smith G. Portal hypertension. *Shackelford's Surgery of The Alimentary Tract* 1996; 3: 413-482
4. Scholmerich J. Portal hypertension in chronic liver disease. *Hepatogastroenterology* 1991; 38: 346-348.
5. Zinner M.J. Portal hipertension. Maingot's Abdominal Operations.1997; Vol II: 1649-1663
6. Bosch J, Pizcueta P, Feu F. Pathophysiology of portal hypertension. *Gastroenterol.Clin. North Am* 1992; 21: 1-14.
7. Ueda S. Experimental study of injury on the small intestine in acute portal vein occlusion and the following restoration of portal vein flow in rats—free radicals in the small intestine and lipid peroksidation. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1989; 90 (10): 1722-1731.
8. Ferhan Girgin. Yaşlanmada MAO İnhibitörlerinin sıçan kalp dokusunda oksidan stres ve antioksidan sistemlere etkileri. *Doktora Tezi*, 1996.
9. Henderson JM. :Portal hypertension .Cur. Prob. in Surg 1998; 35: 271-278.
10. Ponce Gonzales JF, Dominguez ALE, Zurita M , et al. Portal hypertensive colopathy: histologic appearance of the colonic mucosa. *Hepato-gastroenterology* 1998; 45: 40-43.
11. Chojkier M, Groszmann RJ: Measurement of portal systemic shunting in the rat by using γ - labeled microspheres. *Am J Physiol* 1981;240:371-375.
12. Yat PC, Cho Ch. Effects of beta adrenoceptor antagonist on portal vein hypertension and ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *J Pharm Pharmacol* 1994; 46:95-97.

13. Lin HC, Yang MC, Hou MC et al. Effects of long-term administration of octreotide in portal vein stenosed rats. *Hepatology* .1996;23:537-543.
14. Huang YT, Cheng YR, Lin HC et al. Hemodynamic effects of eight day octreotide and propranolol administration in portal hypertensive rats. *Digestive Disease Sciences* 1998;43: 358-364.
15. Marshall JO. Portal hypertension and portocaval shunt. *Surgical Research* 2001;49:637-688.
16. Mehmetoğlu İ. Klinik Biyokimya El Kitabı. İnci ofset, 2002.
17. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL. Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
18. Mueller AL, Platz KP, Langrehr JM, Hoffman RA. The effects of administration of nitric oxide inhibitors during small bowel preservation and reperfusion. *Transplantation* 1994; 58: 1309-1316.
19. Malinsky T, Taha Z. Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature* 1992; 358; 676-678.
20. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990; 36: 1440- 1443.
21. Tsai Y-T, Lin H-C, Yang M-CM, et al. Plasma endothelin levels in patient with cirrhosis and their relationships to the severity of cirrhosis and renal function. *J Hepatol* 1995; 23:681-8.
22. Grange JD, Amiot X. Nitric oxide and renal function in cirrhotic patients with ascites: from physiopathology to practice. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2004; 16(6):567-70
23. Ruiz-del- Albol L, Urman J, Fernandez J, Gonzalez M, Navasa M, Monescillo A, Albillos A, Jimenez W, Arroyo V. Systemic, renal, and hepatic hemodynamic derangement in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology*.2003 Nov;38(5):1210-8.
24. Schimpl G, Pesendorfer P, Steinwender G, Feierl G, Ratschek M, Hollwart ME. Allopurinol reduces bacterial translocation, intestinal mucosal lipid peroxidation, and neutrophil- derived myeloperoxidase activity in chronic

- portal hypertensive and common bile duct-ligated growing rats. *Pediatr Res.* 1996 Sep; 40(3): 422-8.
25. Onur E. Defibrotidin aterojenik diyet uygulanan tavşanlarda beyin ve böbrek serbest radikal ve antioksidanlara etkisi. *Tıpta uzmanlık tezi*, 1999.
 26. Halliwell B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis* 1993; 23 (suppl. 1): 118-126.
 27. Kurata M, Suzuki, M, Agar NS. Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals. *Comp. Biochem. Physiol.* 1993; 106(3): 477-487.
 28. McCord J. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New England J. Med.* 1985; 213: 159-163.
 29. Vertechy M, Cooper MB, Ghirardi O, Ramacci MT. Antioxidant enzyme activities in heart and skeletal muscle of rats of different ages. *Experimental Gerontology* 1984; 24: 211-218.
 30. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *Am. J. of Medicine* 1991; (suppl 3C): 145-215.
 31. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *The New England J. of Medicine* 1985; 112: 159-163.
 32. Ballagi-Pordany G, Richter J, Koltai M. Is malondialdehyde a marker of the effect of oxygen free radicals in rat heart tissue? *Basic Res. Cardiol.* 1991; 86: 266-272.
 33. Bulkey GB. The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery* 1983; 94: 407-411.
 34. Pordany GB., Richter J, Koltai M, Arcanyi Z. Is malondialdehyde a marker of the effect of the oxygen free radicals in rat heart tissue? *Basic Res. Cardiol.* 86, 266-272, 1991.
 35. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *Am. J. Med.* 1991; (suppl. 3C): 145-225.

36. Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1983; 23: 239-257.
37. Prasad K, Kalra J, Bharadwaj L. Cardiac depressant effects of oxygen free radicals. *Angiology-The Journal of Vascular Disease* 1993; 44: 257-269.
38. Onat T, Emerk K, Sözmen E. *İnsan biyokimyası* 2002; 666-674.
39. Koç NK. Yüksek kolesterolü diyetle deneysel ateroskleroz geliştirilen tavşanlarda E vitaminin eritrosit ve aort GSH-Px ve SOD düzeyleri ile serum lipid profili üzerine etkileri. *Uzmanlık Tezi*, 1996.
40. Freeman BA, Crepo JD. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 1982; 47: 412-426.
41. Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *Am. J. of Medicine* 1991; (suppl 3C): 235-295.
42. Guutteridge IMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 1995; 41: 1819-1828.
43. Siimic MG, Taylor KA. Introduction to peroxidation and antioxidation mechanisms. Basic Life Sciences. Oxygen radicals in biology and medicine. *Plenium Press, New York* 1988; 49: 1-10.
44. Murray K. Metabolism of xenobiotics. *Harper's Biochemistry*. Appleton & Lange, USA, 1993, 704-709.
45. Champe PC, Harve, RA. Lippincot's Illustrated Reviews: Biochemistry. 2nd Ed. 1994, 163-228, *J. B. Lippincot Company, Philadelphia*.
46. Chen IY, Mehta P, Mehta JJ. Oxidized LDL decreases L-arginine uptake and nitric oxide synthase protein expression in human platelets. Relevance of the effect of oxidized LDL on platelet function. *Circulation* 1996; 93: 1740-1746.
47. Mutaf I. Eksperimental diyabette plazma ve doku lipid peroksidleri. Tıpta uzmanlık tezi, 1990.

48. Demirpençe E, Köksoy C, Kuzu A, Kılınç K. A spectrophotometric assay for tissue-associated myeloperoxidase activity and application to intestinal ischemia-reperfusion. *Turk J Med Sci* 1997; 27: 197-200.
49. Winterbourn CC. Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. *Toxicology* 2002; 181-182; 223-227.
50. Panasenko OM, Spalteholz H, Schiller J, Arnhold J. M. Myeloperoxidase-induced formation of chlorohydrins and lysophospholipids from unsaturated phosphatidylcholines. *Free Radical Biology and Medicine* 2003; 34(5): 553-562.
51. Rodrigues MR, Rodriguez D, Russo M; Campa A. Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 292: 869-873.
52. Harrison JE, Schultz. Studies on the Chlorinating Activity of Myeloperoxidase. *The Journal of Biological Chemistry* 1976; 251(5): 1371-1374.
53. Kostyuk VA, Kraemer T, Sies H, Schewe T. Myeloperoxidase / nitrite-mediated lipid peroxidation of low-density lipoprotein as modulated by flavanoids. *FEBS Letters* 2003; 537: 146-150.
54. Heinecke JW. Oxidative Stress: New Approaches to Diagnosis and Prognosis in Atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2003; 91 (Suppl): 12A-16A.
55. Carr AC, Mc Call MR, Frei B. Oxidation of LDL by Myeloperoxidase and Reactive Nitrogen Species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 1716-1723.
56. Furcghott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.
57. Furcghott RF, Khan MT, Jothianandan D. Comparison of properties of NO and EDRF: some cautionary findings. Karger, *Basel, Switzerland* 1990; 8-21.

58. Ignarro JJ, Byrns RE, Wood KS. Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radicals in vasodilatation. Vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves and endothelium. *Raven press, New York* 1988; 427-436.
59. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factors. *Nature* 1987; 327: 524-526.
60. Koşay S. Nitrik oksidin tanımı. *EÜTF ayın kitabı*, 1996: 83, 1-6.
61. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide generation vasodilators and 8-bromocyclic guanosin monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation cultured rat smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 1374-1377.
62. Whicher J, Biasucci L. Inflammation the acute phase response and atherosclerosis. *Clin. Chem. Lab. Med.* 1999; 37: 265-270.
63. Kharitonov VG. Kinetics of nitric oxide autoxidation in aqueous solution. *J Biol. Chem.* 1994; 269: 5881-5883.
64. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; 6: 3051-3064.
65. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992; 26: 1898-1902.
66. Harrison DG, Inoue N. Modulation of endothelial cell nitric oxide synthase expression. *J Jpn Circ* 1996; 60: 815-821.
67. Bayındır O. Nitrik oksidin reaktivitesi, sentezi ve analiz metodları. *EÜTF ayın kitabı* 1996; 83: 14-21.
68. Haverkate F, Thompson SG. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. *The Lancet* 1997; 349: 462-466.
69. Freedman JE, Ting B. Impaired platelet production of nitric oxide predicts presence of acute coronary syndromes. *Circulation* 1998; 98: 1481-1486.

70. Araki M, Tanaka M. Nitric oxide inhibition improved myocardial metabolism independent of tissue perfusion during ischemia but not during reperfusion. *J Mol Cell Cardiology* 2000; 62: 375-384.
71. Freeman B. Free radical chemistry of nitric oxide. *Chest* 1994; 105 (Suppl 3): 79-84.
72. Shah AM. Inducible nitric oxide synthase and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research* 2000; 45: 148-155.
73. Shimokawa H, Flavahan NA. Natural course of endothelium removal in porcine coronary arteries. *Circulation Research* 1989; 65: 740-753.
74. Carr A, Frei B. The role of natural antioxidants in preserving the biological activity of endothelium-derived nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine* 2000; 12: 1806-1814.
75. Pique JM, Esplugues JV, Whittle BJ. Endogenous nitric oxide as a mediator of gastric mucosal vasodilation during acid secretion. *Gastroenterology* 1992; 102: 168-174.
76. Stark ME, Szurszewsky JH. Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function disease. *Gastroenterology* 1992; 103: 1928-1949.
77. Rattan S, Sarkar A, Chakder S. Nitric oxide pathway in rectoanal inhibitory reflex of opossum internal anal sphincter. *Gastroenterology* 1992; 103: 43-50.
78. Soydan I. Nitric oksidin hastalıklardaki fizyopatolojik rolü. Nitrik oksidin patolojik olaylardaki rolü; *Ege Üniversitesi Basımevi*, 1996
79. Kolb H, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: a pathogenic factor in an autoimmunity. *Immunol Tod.* 1992; 13:157.
80. Rumley AG, Paterson JR. Analytical aspects of antioxidants and free radical activity in clinical biochemistry. *Ann. Clin. Biochem* 1998;35: 181-200.
81. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants and human disease. Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* 1992; 119: 589-620.

82. Carillo MC, Nokubo M, Kitani K, Satoh K, Sato K. Age-related alterations of enzyme activities and subunits of hepatic glutathione S-transferase in male and female Fischer-344 rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1991; 1077: 325-331.
83. Mehmetoğlu İ. *Klinik Biyokimya El Kitabı*. İnci ofset, 2002.
84. Pizcueta P, Pique JM, Fernandez M. Modulation of the hyperdynamic circulation of cirrhotic rats by nitric oxide inhibition. *Gastroenterology* 1992; 103 (6): 1909-1915.
85. Tsugawa K, Hashizume M, Migou S. Role of nitric oxide and endothelin-1 in a portal hypertensive rat model. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35(10): 1097-1105.
86. Shams V, Erkan T, Gumustas MK. The role of nitric oxide in pediatric patients with portal hypertension. *J Trp Pediatr* 2003; 49(1): 33-36.
87. Howe LM, Boothe DM, Slater MR. Nitric oxide generation in a rat model of acute portal hypertension. *Am J Vet Res.* 2000; 61(10): 1173-1177.
88. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL. Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
89. Wei H, Frenkel K. In vivo formation of oxidised DNA bases in tumor promoter-treated Mouse skin. *Cancer Res* 1991; 51: 4443-4449.
90. Güvenç Y. Portal Hipertansiyon Oluşturulmuş Ratlarda, İnce Barsak, Kolon ve Pankreas Dokularında Oksidatif Stresin Araştırılması. *Uzmanlık Tezi* 2003

