

T.C
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ve KLİNİK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

PORTAL HİPERTANSİYON OLUŞTURULMUŞ RATLARDA,
İNCE BAĞIRSAK, KOLON VE PANKREAS DOKULARINDA
OKSİDATİF STRESİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Yeşim GÜVENÇ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Bekir Sami UYANIK

Manisa, 2003

ÖNSÖZ

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda sürdürdüğüm uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini aktararak, anlayış ve ilgilerini esirgemeyen değerli hocalarım;

Prof. Dr. Bekir Sami Uyanık ve Doç. Dr. Zeki Arı'ya,

Paylaştıkları sevgi, dostluk ve tez çalışmalarında gösterdikleri özverili katkılarından dolayı

Yrd. Doç. Dr. Ahmet Var , Yrd. Doç. Dr. Ece Onur, Yrd. Doç. Dr. Fatma Taneli ve Yrd. Doç. Dr. Cevval Ulman' a,

Tezimin deneysel cerrahi aşamasında gösterdikleri yardımlarından dolayı Genel Cerrahi Anabilim Dalı öğretim üyesi

Yrd. Doç. Dr. Hasan Aydede' ye,

Uzmanlık eğitimim boyunca dostluk ve kardeşlik anlayışı içinde birlikte çalıştığım arkadaşlarım;

Uzm. Dr. Kayhan Göktalay, Dr. Banu İşbilen, Dr. Serdar Seven, Dr. Mustafa Altaş, Dr. Özlem Tuncer ve Dr. Sibel Üner' e,

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

Yaşamım boyunca bana her türlü desteği veren aileme,

İyi ve zor günlerimi paylaşan dost ve arkadaşlarıma,

En içten teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Yeşim Güvenç

ÖNSÖZ

İÇİNDEKİLER

I. GİRİŞ	1-2
II. GENEL BİLGİLER	3-59
II. 1. PORTAL HİPERTANSİYON	3-8
II.1.1. Portal hipertansiyonun tanımı	
II.1.2. Portal hipertansiyonun etyolojisi	
II.1.3. Portal sistem anatomisi	
II.1.4. Portal hipertansiyonun fizyopatolojisi	
II. 2. SERBEST RADİKALLER	8-29
II.2.1. Serbest radikallerin reaksiyonları	
II.2.1.1. İki radikalın reaksiyonu	
II.2.1.2. Radikallerin nonradikallerle reaksiyonu	
II.2.2. Serbest radikallerin sınıflandırılması	
II.2.3. Serbest radikallerin kaynakları	
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	
II.2.5. Reaktif oksijen ürünleri:	
II.2.5.1. Süperoksid radikali	
II.2.5.2. Hidroperoksil radikali	
II.2.5.3. Hidrojen peroksid	
II.2.5.4. Hidroksil radikali	
II.2.5.5. Singlet oksijen	
II.2.5.6. Ozon	
II.2.5.7. Nitrojen oksidleri	
II.2.5.8. Hipokloröz asid (HOCl)	
II.2.6. Serbest radikallerin yararlı etkileri.	
II.2.6.1. Detoksifikasyon	

II.2.6.2. Vazodilatasyon	
II.2.6.3. Bakterisid etkisi	
III.2.7.Serbest radikallerin zararlı etkileri	
II.2.7.1. Lipidler üzerine olan etkileri	
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	29-30
II. 4. NİTRİK OKSİD	30-47
II.4.1. Nitrik oksidin yapısı	
II.4.2. Nitrik oksidin biyosentezi	
II.4.3. Nitrik oksid sentaz izoenzimleri:	
II.4.4. Nitrik oksidin moleküler etkileri	
II.4.5. Nitrik oksidin biyolojik etkileri	
II.4.6. Endotel hücresi ve nitrik oksid	
II.4.7. Lipid radikalleri ve nitrik oksid	
II.4.8. Nitrik oksid ve süperoksid etkileşimleri:	
II.4.9. Nitrik oksidin düzeylerini etkileyen faktörler	
II.4.10.Kardiyovasküler sistem ve nitrik oksid	
II.4.11. Sindirim sistemi ve nitrik oksid	
II.4.12. Diğer sistemler üzerine olan etkileri	
II.4.13. Nitrik oksidin ölçüm yöntemleri	
II. 5. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ	47-59
II.5.1. Doğal antioksidanlar	
II.5.1.1. Enzimler	
II.5.1.1.1. Süperoksid dismutaz	
II.5.1.1.2. Katalaz	
II.5.1.1.3. Glutasyon redoks siklusu	
II.5.1.1.4. Glutasyon	

- II.5.1.1.5. Glutatyon peroksidaz
- II.5.1.1.6. Glutatyon redüktaz
- II.5.1.1.7. Glutatyon S-Transferaz
- II.5.1.2. Nonenzimatik antioksidanlar

II.5.2. İlaçlar

III. MATERYAL VE METOD	60-73
III.1. ARAÇ VE GEREÇLER	
III 2. ÇALIŞMA MATERYALLERİ	
III.3. DOKULARIN HOMOJENİZASYON İŞLEMLERİ	
III.4. DOKUDA PROTEİN ÖLÇÜMÜ	
III.5. NİTRİK OKSİD ÖLÇÜMÜ	
III.6. MYELOPEROKSİDAZ ÖLÇÜMÜ	
III.7. KSANTİN OKSİDAZ ÖLÇÜMÜ	
III.8. SÜPEROKSİD DİSMUTAZ ÖLÇÜMÜ	
III.9. GLUTATYON PEROKSİDAZ ÖLÇÜMÜ	
III.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	
IV. BULGULAR	74-91
IV.1. KOLON DOKUSU SONUÇLARI	
IV.2. İNCE BARSAK DOKUSU SONUÇLARI	
IV.3. PANKREAS DOKUSU SONUÇLARI	
V. TARTIŞMA	92-97
V.1. PORTAL HİPERTANSİYON	
V.2. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ; MYELOPEROKSİDAZ, KSANTİN OKSİDAZ VE PORTAL HİPERTANSİYON	
V.3. NİTRİK OKSİD VE PORTAL HİPERTANSİYON	
V.4. ANTIOKSİDAN ENZİMLER VE PORTAL HİPERTANSİYON	
VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	98
VII. ÖZET	99
VIII. İNGİLİZCE ÖZET	100
IX. KAYNAKLAR	101-114

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' nın 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, gastroözefajial 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, glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon-s-transferaz gibi),

vitaminler (vitamin C, E gibi), bilirubin ve serüloplazmin gibi bazı moleküllerden oluşmaktadır (8).

Literatürlerde, portal hipertansiyonda değişen splanknik kan akımı ile kolon ve pankreas gibi organlarda oksidatif hasarın varlığının gösterilmesi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Portal hipertansiyonun gastrointestinal kanama gibi öldürücü komplikasyonlarının önlenmesinde yol göstermesi ve klinik uygulamalarda yeni kavramların önünü açabilmesi amacıyla bu deneysel çalışmada parsiyel portal ven ligasyonu ile portal hipertansiyon oluşturulmuş ratlarda ince barsak, kolon ve pankreas dokularında oksidatif hasarın araştırılması amaçlanmıştır.

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).

Portal Hipertansiyon tanımından sadece basıncın artmış olması değil, 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 durumlar da anlaşılmalıdır (3,5.)

II.1.2. Portal hipertansiyonun etyolojisi

Portal hipertansiyona neden olan durumlar değişik şekillerde sınıflandırılabilmesine karşılık, hemodinamik özelliklere göre gruplandırıldığında daha açıklayıcı ve kapsamlı olmaktadır. 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. Sadece presinuzoidal portal hipertansiyon, hepatosellüler hastalıkla ilgili değildir. Ancak sinuzoidal ve postsinuzoidal portal hipertansiyonda bir çok hepatosellüler hastalık altta yatan neden olarak bulunmaktadır. Bundan dolayı ilk grupta prognoz, diğerlerine göre daha iyi olma eğilimindedir (3).

II.1.3. Portal sistem anatomisi

Vena portae hepatis yaklaşık olarak 5-8 cm uzunluğundadır ve ikinci lomber vertebra düzeyinde collum pancreatis'in arkasında vena mesenterica superior ile vena lienalis'in birleşmesiyle şekillenir.

Vena lienalis, hilum splenicum'dan çıktıktan sonra vena gastrica breves, vena gastromentalis sinistra, vena pancreaticae ve vena mesenterica inferior'u alır. Vena mesenterica inferior ise alt gastrointestinal sistemden vena rectalis superior, vena sigmoideae ve vena colica sinistrayı yapısına katar.

Vena mesenterica superior vena jejunales, vena ileales, vena ileocolica, vena colica dekstra, vena colica media, vena pancreaticoduodenalis inferior ve vena gastromentalis dekstrayı alır.

Vena porta hepatis oluştuktan sonra vena gastrica sinistra ve dekstra ile vena cystica'yı da kendisine dahil eder. Yukarıya doğru foramen epiploika'ya devam eden vena porta, porta hepatis de ramus dexter ve ramus sinister olmak üzere iki dala ayrılarak karaciğere girer. Karaciğer içerisindeki dağılımı segmenter nitelik taşır ve terminal portal venüller karaciğer sinuzoidleri içerisinde son bulur. Portal ven yolu ile gelen kan, sinuzoidlerde kısmen arter kanı ile karışır, daha sonra santral venlere ve oradan da vena hepatica yolu ile vena cava inferior'a dökülür (1,2,9).

II.1.4. 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 hepatik 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 sistemde basınç artışının gelişmesini açıklamak üzere iki hipotez öne sürülmüştür. Geri akım teorisi olarak bilinen teoriye göre bir veya daha fazla anatomik yapıdan karaciğer boyunca geçen portal kan akımına karşı artmış direnç, portal venöz konjesyona ve hipertansiyona neden olur. Cerrahi girişimler sırasında sirotik hastalarda karaciğer kan akımının düşmesi bu teoriyi desteklemektedir (6).

Hepatoportal ve portosistemik kollateral kan akımlarının radyoaktif yöntemlerle ölçülmesiyle, total portal kan akışının PHT'da belirgin bir şekilde yükselmiş olduğu ortaya konulmuştur (10). Bu durum PHT'da, artmış portal akımın temel faktör olduğunu öne süren ön akım teorisi ile uyumludur (11).

Hiperdinamik dolaşımın oluşumunda, vazodilatatör maddelerin üretiminin artması ve endojen katekolaminlere olan duyarlılığın azalmasının rol oynadığı düşünülmektedir. Sirozlu hastalarda yüksek konsantrasyonlarda bulunan ve potent vazodilatatör olan glukagon, artmış splanknik kan akışının sağlanmasında işe karışan birincil humoral maddedir (12,13). Portal ven stenozlu rat modelinde, barsaktaki vasküler dirençteki düşüşün yaklaşık % 40' ından ve portal hipertansiyondaki hiperemik yanıtın % 30 undan glukagonun sorumlu olduğu gösterilmiştir (12).

Vazodilatasyonun diğer mediatörleri; nitrik oksit, adenosin, safra asitleri, prostoglandinler, bradikinin ve endotoksinlerdir (6,12,14-16).

Artmış ön ve arka akım teorileri arasındaki farklılığa rağmen, portal venöz akışa gösterilen direncin artması portal hipertansiyonun gelişmesinde öncelikli faktör olarak rol oynamaktadır.

Ayrıca splanknik hiperemi, portal hipertansiyonun gelişmesinde majör faktör olarak kabul edilmektedir (17).

Portal hipertansiyonlu hastaların çok az bir kısmında presinuzoidal, sinuzoidal ve postsinuzoidal tutulum izole olarak gösterilebilir. Alkolik ve postnekrotik sirozlu hastalarda nodüllerin rejenerasyonu ile terminal hepatik venüllerin kompresyonu sonucu portal hipertansiyon gelişmektedir. Seri

çalışmalarda sirotik hastalarda direncin temel yükünün, hepatik sinuzoidlere doğru olduğu gösterilmiştir (18). Disse aralığında kollagen varlığı ve perisinuzoidal fibrozis, sirotik portal hipertansiyon gelişiminde iki belirgin olay olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca bu bölgede bulunan İto hücreleri de üretken myofibroblastların öncüleridir ve artmış kollagen sentezinin kaynağıdır. Myofibroblastlar lokal ve sistemik vazoaktif bileşenlere yanıt veren kontraktıl elemanlara sahiptirler. Bu nedenle sirotik portal hipertansiyon; nörohumoral mediatörler ve hepatik sinuzoid hücreleri arasındaki kompleks etkileşimlerin dinamik modeli olarak tanımlanmaktadır.

Sonuç olarak 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. (19)

Karaciğer geniş bir vasküler ađ sistemine sahiptir ve bu sayede hepatik vasküler yatak genişleyerek portal akım artışını kompanse eder. Normal koşullarda sinuzoidlerin tümü açık değildir, bir kısmı kollabedir. Sinuzoidlere gelen kan miktarı ile orantılı olarak açılan sinuzoid sayısı artar. İstirahatte yaklaşık 1000 ml/dk olan portal akım, sindirim esnasında 1600 ml/dk'ya kadar çıkar. Normal koşullarda portal basıncı ayarlayabilen sinuzoidler patolojik durumlarda bu özelliklerini yitirir. Basınç artışı, sinuzoidal direnç azalması ve açılan sinuzoidler ile kontrol edilemediğinde direnci azaltacak diğer mekanizmalar yani porta-kaval ve porta-portal anastomozlar devreye girer (1-,3,6).

Son 10 yılda portal hipertansiyon ile intestinal sirkülasyon değişiklikleri arasındaki ilişkinin ortaya çıkarılması ile ilgili bilgiler artmıştır. Mukozal biopsiler ve endoskopik örneklemeler ile yapılan çalışmalarda temel patolojik değişikliğin vaskülopati olduğu saptanmıştır. Bu hastalarda görülen çeşitli

karakteristik lezyonlar portal hipertansif intestinal vaskülopati olarak yorumlanmaktadır (20).

Portal hipertansif gastropati; portal hipertansiyon gelişmiş olan hastalarda görülen konjestif gastropati veya portal gastropati gibi isimler ile anılan gastrik mukozal kapiller ve submukozal venlerde dilatasyon ve ektazi ile karakterize tablodur (21). Mononükleer hücre infiltrasyonları ile karakterize kronik gastrit zaman zaman hafif portal hipertansiyonda görülmekle birlikte inflamasyonun aktivitesi ve derecesi beklenenden fazladır (22). Gerek portal hipertansiyonun gerekse portal hipertansif gastropatinin patogenezi açıklamak için ileri sürülen faktörlerin hiç biri tek başına yeterli değildir. Muhtemelen portal hipertansif gastropati patogenezi multifaktöryel bir olaydır (23-25).

Portal hipertansif gastropatide yüksek serum gastrin seviyeleri ve düşük pepsinojen I seviyeleri olduğu saptanmıştır. Ancak hipoasidite veya hipergastrinemi ile mukozal değişiklikler arasında bir korelasyon kurulamamıştır. Ayrıca gastrik vasküler ektazili portal hipertansiyonlu hastaların antrumunda artmış prostaglandin E2 seviyeleri vardır. Bu durum kapiller dilatasyonun ve kanamanın patogenezinde rol oynamaktadır (26). Ortaya çıkan gastrik konjesyon ayrıca mikrovasküler basınçta artmaya ve takiben de hipoksiye neden olmaktadır. Oluşan hipoksi gastrik mukoza ve vasküler endotelden doku plazminojen aktivatörlerinin salınmasına yol açarak gastrik fibrinolizin artmasına ve sonuçta mukozal kanamaya yol açmaktadır (27).

Portal hipertansif hastalarda portal hipertansif gastropatiye benzer bir durumun duodenumda da olduğu bildirilmiş ve bu durum portal hipertansif duodenopati olarak adlandırılmıştır (28).

Portal hipertansif kolopati, portal hipertansiyon gelişmiş olan hastalarda kolon, rektum ve anüste görülen ve çeşitli karakteristik lezyonların eşlik ettiği bir antitedir (29). Kolonik mukozal lezyonlar endoskopik ve histolojik olarak spider telenjektazi, vasküler ektaziler, eritem, kırmızı noktalanmalar ve vasküler dilatasyonlar şeklinde gelişirler. Mikrosirkülasyonda belirgin dilatasyon, mukoza ve submukozada ödem

vardır ve inflamasyon nadiren görülür. Mukozal inflamasyon olmadan, bazal membran kalınlaşması ile birlikte dilate mukozal kapillerler portal hipertansiyonda spesifik kolon mukozal değişiklikleridir (20,30). Sıklıkla gastrik vasküler ektazi ve rektal varisler birlikte görülürler (31). Portal hipertansiyonda kolonik lezyon görülme sıklığı % 70-85 arasında bildirilmektedir (32). Kolopati akut veya tekrarlayan hematokezya, gizli kanama ve anemiye neden olabilir.

Portal hipertansif enteropati ile ilgili olarak yapılan histolojik çalışmalarda lamina propria'da ödemle birlikte belirlenen vasküler dilatasyon, vasküler duvar kalınlaşması, jejunal villus / kript oranında azalma ve lamina propria'da proliferasyon olduğu gösterilmiştir (33). Portal hipertansiyonlu hastalarda konjesyon ve dilatasyonun geri dönebilen bir fenomen olduğu düşünülmektedir. Ancak irregüler kalınlaşmanın varlığı, dilate damarlarda daha kalıcı ve kronik değişikliklere neden olmaktadır (34). Bu vasküler değişiklikler gizli kanama ve anemiye neden olabilmektedir (35).

Son yıllarda portal hipertansiyonun patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması, karaciğer hastalıklarının daha ayrıntılı olarak değerlendirilmesi, tedavi olanaklarını oldukça genişletmiştir. Portal hipertansiyonun farmakolojik olarak düşürülebileceği, bununla birlikte portal hipertansiyonun en önemli morbidite ve mortalite nedeni olan gastrointestinal kanamaların farmakolojik olarak kontrol altına alınabileceği gösterilmiştir. Burada birinci amaç akut kanamanın durdurulması veya şiddetini azaltılması, kanamanın önlenmesi ve tekrarlamamasını sağlamaktır.

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. (36,37)

Moleküllerin çoğu çift elektronlu, az sayıdaki molekül ise tek elektrondur. 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 (8,36,41).

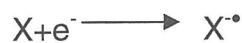
Anaerobik canlılar da dahil olmak üzere her canlıda toksik etkili olan moleküler oksijenin kendisi değil, oksijenin tam olmayan indirgenmesi ile oluşturulan radikalleridir. Atomik ya da moleküler yapıda eşleşmemiş tek elektron içeren bu bileşikler reaktif özellik taşırlar. Serbest radikaller, negatif 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 aldığına 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 (8,36,42).

Serbest radikaller üç şekilde oluşabilir (8,36,41).

1. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı



2. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi

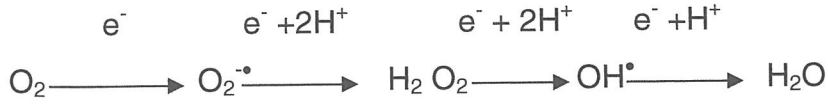


3. Normal bir molekülün kovalan bağının homolitik yarılmaması sonucu eşleşmiş elektronlardan her birinin ayrı parçada kalması



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; süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi (8,36,43-45).



Serbest radikalin 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 radikalin 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 (redüktan 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 (46).

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^{\bullet})
3. Sülfür merkezli serbest radikaller	Till radikali ($R-S^{\bullet}$)
4. Nitrojen merkezli serbest radikaller	Fenildiazin radikali ($C_6H_5N=N^{\bullet}$)
5. Oksijen merkezli serbest radikaller	

A. İnorganik

Süperoksid radikali (O_2^\bullet)

B. Organik

Peroksil radikali (RO_2^\bullet)

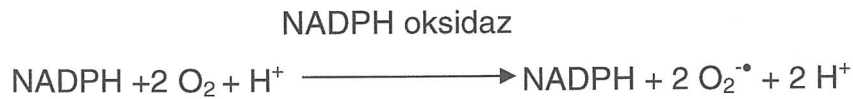
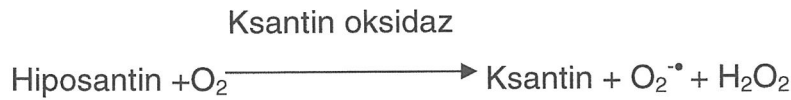
II.2.3. Serbest radikallerin kaynakları

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

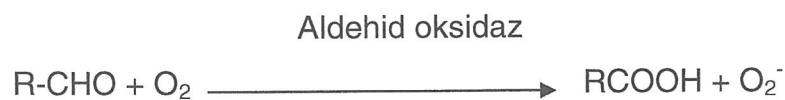
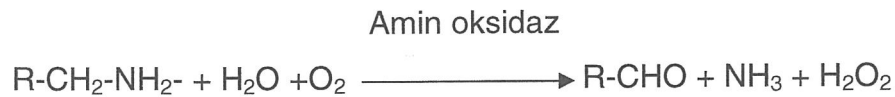
Organizmada serbest radikallerin oluşmasına yol açan tepkimeler şunlardır (8,36).

II.2.3.1. Enzimatik tepkimeler

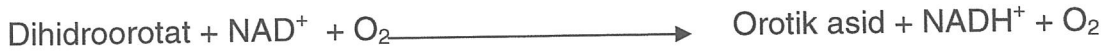
Vücutta endojen olarak oluşabilen oksijen metabolitlerinin enzimatik kaynakları şunlardır (8,42,47,48):



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").



Dihidroorotat dehidrogenaz



Oksijen peroksidazlar



Metilamin dehidrogenaz



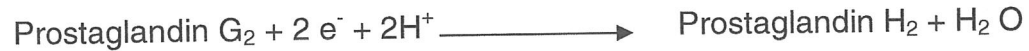
Galaktoz oksidaz



Ribonükleotid redüktoz



Prostaglandin H sentaz



Piruvat format liyaz

**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 redüe olarak $\text{O}_2^{\cdot -}$ üretilmektedir.



Ksantin oksidaz

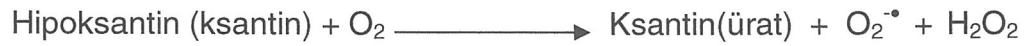
Ksantin oksidaz enzimi, organizmada NAD^+ redükleyici ksantin dehidrogenaz formunda dokularda yaygın olarak bulunmaktadır.

Ksantin oksidaz



Sülfidril oksidasyonu ve proteolizis gibi koşullar altında enzim, hızla oksidaz formuna dönmektedir. Ksantin oksidaz substrat olarak NAD^+ yerine moleküler O_2 kullanmakta ve O_2^{\bullet} ile H_2O_2 gibi radikallerin oluşmasına yol açmaktadır.

Ksantin oksidaz



Peroksidazlar

Peroksidazlar tükürük, ter ve süt gibi ekzokrin sekresyonlar; monosit, nötrofiller ve eozinofiller gibi bazı lökositler; tiroid dokusunda bulunan bir hemoprotein ailesini oluşturmaktadır. Peroksidazlar, bir elektron vericisinin H_2O_2 tarafından oksidasyonunu katalizlemektedir.

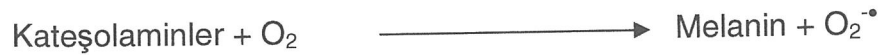
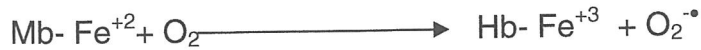
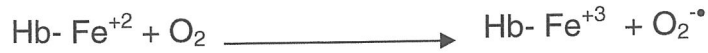
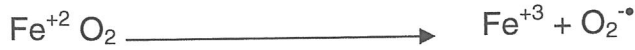
Hemoprotein peroksidazların bir elektron vericisi kullanarak H_2O_2 'nin yıkımını katalizleyen koruyucu bir enzim ailesine ait olduğuna dair düşünceler olmakla beraber, aslında peroksidazların çoğunun hipokloröz asid gibi sitotoksik oksidan oluşumunu katalizlediği de bilinmektedir.

Mitokondrial karma fonksiyonlu oksidaz sistem

Birçok dokuda belli ilaçlar ve ksenobiyotiklerin metabolizmasından sorumlu sistem, mikrozomal karma fonksiyonlu oksidaz sistemi olarak isimlendirilen çok yönlü bir enzim sistemidir. Bu sistem kofaktör olarak O_2 ve NADPH (veya NADH) gerektirmekle birlikte flavoprotein, NADPH sitokrom P_{450} redüktaz ve sitokrom P_{450} olarak bilinen bir grup hemoproteini içermektedir. Bu mikrozomal sistem reaktif endojen bileşiklerin aktivitelerini bozarak ya da detoksifiye ederek vücuttan atılımı için geliştirilmiş olmakla beraber, bazı reaktif ve toksik olmayan bileşikleri sitotoksik ve genotoksik türdeki ürünlere de dönüştürebilmektedir.

II.2.3.2. Nonenzimatik tepkimeler

Otooksidasyon tepkimeleri sonucu oluşan reaktif oksijen metabolitlerinin nonenzimatik kaynakları aşağıda özetlenmiştir (8,36).



II.2.3.3. Patolojik olaylar

- İskemi-reperfüzyon
- Uzun süreli metabolik hastalıklar
- Yangı (nötrofil, eozinofil ve makrofajlar fagositoz sırasında önemli ölçüde $\text{O}_2^{\bullet -}$ 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 $\text{O}_2^{\bullet -}$ akışı yaklaşık %1-2'dir. Sağlam mitokondride $\text{O}_2^{\bullet -}$ 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 (49).

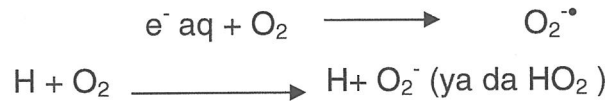
II.2.3.5. Dış etkenler

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 (49).

Toksik kimyasal maddeler: CCl_4 , 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

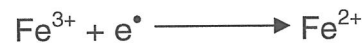
Sigara

Alkol

II.2.4. Serbest oksijen ürünlerinin oluşumu ve geçiş metalleri

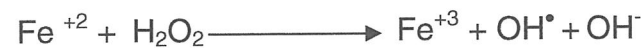
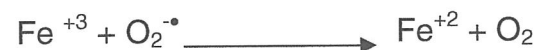
Biyolojik sistemlerde reaktif oksijen türlerinin oluşumunda redoks aktif metal iyonlarının merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir (70). Bu metaller in vitro Ti (III), Cu (I), Fe (II), veya Co (II) olabilir, ancak in vivo özellikle demir, daha az olarak da bakır uygun adaylardır (41).

Çoğu geçiş metali değişken oksidasyon sayısına sahiptir, örneğin demirin Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonları, bakırın Cu^+ veya Cu^{2+} 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).

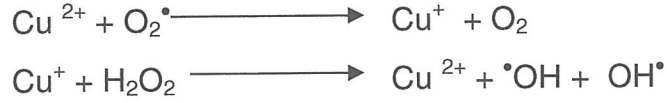
Metaloprotein varlığında (FENTON TEPKİMESİ):



Metaloprotein 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 (50).



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



Bakır iyonları da tiollerin oksidasyonunu artırır (46).



II.2.5. Reaktif oksijen ürünleri:

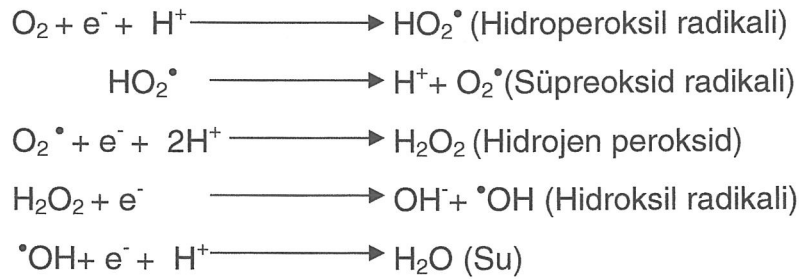
Oksijen serbest radikali teriminin O_2^{\bullet} ve $\bullet OH$ gibi radikallerin yanında H_2O_2 ve 1O_2 gibi reaktif, fakat radikal olmayan türleri ifade etmek için de kullanılması doğru değildir. Bunun yerine daha genel olan reaktif oksijen türleri teriminin kullanılması uygun olur. Oksidan terimi ise H_2O_2 , $\bullet OH$ ve HOCl gibi moleküller için geçerlidir, oysa O_2^{\bullet} hem oksidan hem de redüktandır (41,46).

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 (37,50) Moleküler oksijenin, sitokrom c oksidazla olduğu gibi, 4 elektron birden alarak suya indirgenmesi serbest radikal ara ürünleri oluşturmaz (51). Oysa moleküler oksijenin spin kısıtlaması nedeniyle izleyeceği en kolay yol olan univalan redüksiyon reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olur (47,50) Bu yolda oksijen, elektronların basamaklı olarak eklenmesiyle indirgenirken HO_2^\bullet , $^\bullet\text{OH}$, ve H_2O_2 oluşur. PH 7'de HO_2^\bullet , O_2^\bullet vermek üzere dissosiyasyon olur (52,53).

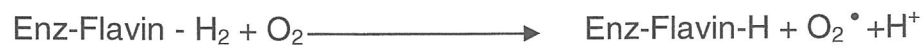
Oksijenin univalan redüksiyonu sırasında ara ürünlerin oluşumu şöyle formüle edilebilir (53,54):



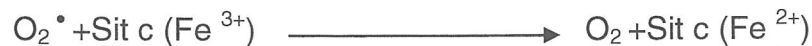
II.2.5.1. Süperoksid radikali (O_2^\bullet)

Oksijenin $\pi 2p$ orbitaline bir elektron girmesiyle oluşur. Çözelti ortamına bağlı olarak askorbik asit 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 (48). Hidrofobik ortamlarda yüksek, büyük sulu ortamlarda düşük reaktiviteye sahiptir (50).

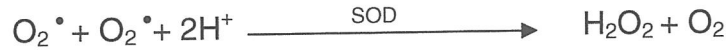
Redükte flavinler, örneğin ksantin oksidazla bulunanlar, moleküler oksijen tarafından univalan olarak yeniden okside edilirken süperoksid radikali oluşabilir (55).



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 süperoksit oluşumu bakterisidal etkiye katkıda bulunur (50,56).

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

O_2^{\bullet} 'nin protane formudur (70). 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 (glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi) savunma sistemleri geliştirilmiştir.

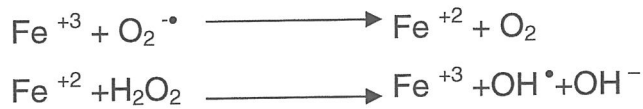
II.2.5.4. Hidroksil radikali (OH^{\bullet})

1934 yılında Haber ve Weiss, hidrojen peroksidin süperoksid anyonu ile indirgenmesi ile hidroksil radikali oluşabileceğini göstermişlerdir (8,36).

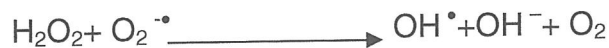


Ardından 1978 yılında redoks katalizör olarak fonksiyon gören bir metal, örneğin şelat yapmış demir (Demir-EDTA kompleksi) varlığında, Haber-Weiss tepkimesinin biyolojik sistemlerde de çalıştığı ve bu yolla önemli miktarlarda OH^{\bullet} üretildiği gösterilmiştir.

Metaloprotein varlığında (Fenton tepkimesi):



Metaloprotein yokluğunda (Haber-Weiss tepkimesi):



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

Hidroksil radikalinin katıldığı tepkimeler üç grupta toplanabilir (8,36).

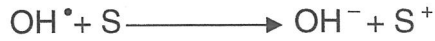
a- Hidroksil radikali hidrojen çıkarma tepkimeleri ile bir radikal ve su açığa çıkarır.



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



c- OH^{\bullet} , organik ve inorganik bileşiklerde elektron transfer tepkimelerine neden olur ki aynı etkiyi $O_2^{\bullet-}$ radikali de göstermektedir.



Yada



II.2.5.5.Singlet oksijen (1O_2)

Moleküler oksijenin en düşük eksite durumudur (50). Çiftleşmemiş elektron içermediği için serbest radikal değildir, ancak spin kısıtlaması olmadığı için oksidan özelliği çok artmış reaktif bir oksijen formudur (53). 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 (50).

II.2.5.6. Ozon(O_3)

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 (53).

II.2.5.7. Nitrojen oksidleri

Nitrik oksid (NO^\bullet) ve nitrojen dioksid (NO_2^\bullet) serbest radikaldir, ama anestezik olarak kullanılan nitroz oksid (N_2O) serbest radikal değildir. NO_2^\bullet güçlü bir oksidan, NO^\bullet ise zayıf bir redüktandır. NO^\bullet vasküler endotel ve diğer hücreler tarafından az miktarda üretilir. NO^\bullet , O_2^\bullet 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^\bullet üretebilir (53).

II.2.5.8. Hipokloröz asid (HOCl)

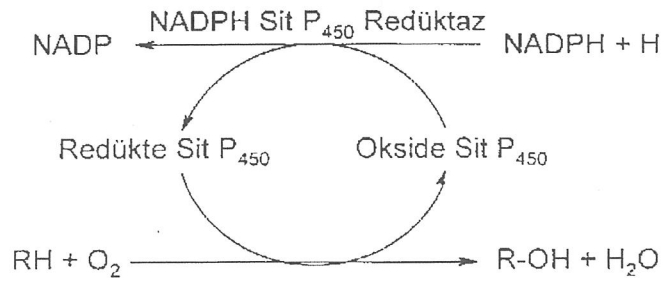
HOCl güçlü bir oksidandır. Vücutta aktive nötrofiller tarafından oluşturulur. Fagosit sitoplazmasındaki myeloperoksidaz enzimi, H_2O_2 ve klorid iyonlarından HOCl oluşumunu katalize eder.

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 (41,52).

II.2.6.Serbest radikallerin yararlı etkileri.

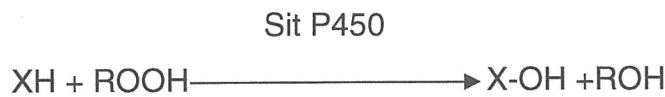
II.2.6.1. Detoksifikasyon

Ksenobiotiklerin metabolize olurken, konjugasyon veya metilasyonla suda daha çözünür hale getirilmeden önce, sitokrom P-450'nin katalizlediği bir reaksiyonla hidroksilasyona uğrarlar (55). Bir hemoprotein olan sitokrom P-450, bu reaksiyonda, demir-oksijen kompleksinin reaktivitesinden yararlanır, kofaktörleri NADPH/ O_2 veya peroksidlerdir. Reaktif oksijen türleri reaksiyon siklusunda merkezi bir yol oynarlar.(50)



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

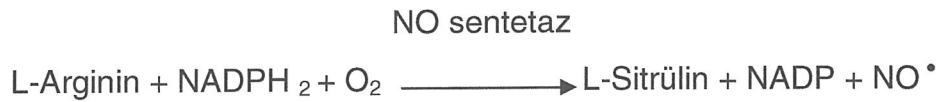
Sit P450 'nin peroksidaz fonksiyonunda peroksidler (ROOH) oksijen donörü olarak kullanılır.



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 (50,56).

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

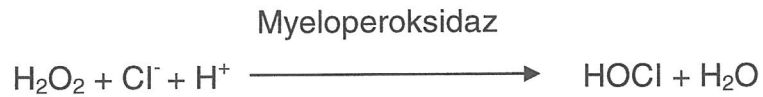


NO sentetazın endotel, sinir dokusu ve trombositlerde Ca²⁺ kalmodulin bağımlı tipi; hepatosit, makrofaj ve nötrofillerde Ca²⁺ bağımsız tipi bulunmuştur. Değişik hücre tiplerinde TNF ve IL-1, enzimi indükler. NO[•], guanilat siklazı aktive ederek, GTP'den c GMP oluşturur. CGMP vazodilatasyon yapar ve trombosit agregasyonunu inhibe eder (70). 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 (56). O₂[•] (50), okside LDL (57) ve muhtemelen okside Lp(a), NO[•] 'in aktivitesini inhibe eder.

II.2.6.3. Bakterisid etkisi

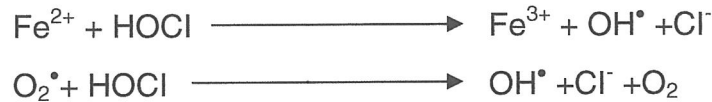
Nötrofiller ve monositler bakterisidal etki için oksijen bağımlı ve bağımsız mekanizmalarla donatılmışlardır. Oksijen bağımsız mekanizma, pH değişikliği ve lizozomları kullanırken, oksijen bağımlı mekanizma myeloperoksidazı içerir.

Fagositozdan sonra lökosit membranındaki NADPH oksidaz moleküler oksijeni O_2^\bullet 'a çevirir (respiratuar patlama). Hormonal olarak düzenlenen bu enzimin genetik eksikliğinde kronik granülomatöz hastalık görülür. Daha sonra O_2^\bullet , SOD ile H_2O_2 'e çevrilir (56). H_2O_2 , Cl^- iyonları ile myeloperoksidaz katalizörlüğünde, bakterileri öldürüren, hipokoröz asid oluşturur (50,53,56).



Hidrojen peroksidin fazlası glutatyon peroksidaz ve katalaz tarafından nötröle edilir.

HOCl demir bağımlı ve bağımsız reaksiyonlarla OH^\bullet verebilir (48):



Oluşan OH^\bullet da bakterisidal etki gösterir (14).

NO^\bullet sentetaz sistemi makrofajlarda da bulunur (50,56). Bakteriyel lipopolisakkaridler ve enfeksiyona cevap olarak açığa çıkan γ - interferon, enzimin sentezini belirgin olarak stimüle eder (57). Aktive makrofajların oluşturduğu reaktif oksijen türleri NO^\bullet ile birleşerek, OH^\bullet gibi, NO^\bullet '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 (58).

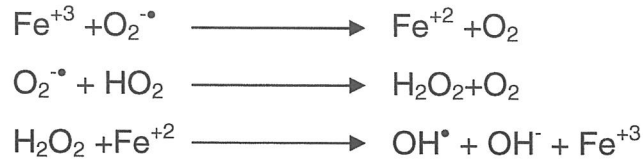
Radikallerin yol açtığı bu olay patolojik ya da fizyolojik işlemlere (prostaglandin sentezi yada yaşlanma gibi) eşlik edebilir.

- 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).

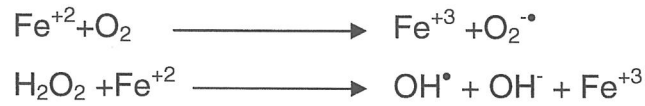
Singlet oksijen ve hidroksil radikalının her ikisi de lipid peroksidasyonunu başlatabilir, ancak peroksidasyon mekanizmaları farklıdır. Lipid radikal (lipid peroksid) zincir tepkimesinin uzunluğu ve böylece lipid peroksidasyonunun şiddeti lipid ansatürasyonunun derecesine göre artmaktadır. Hidroksil radikali ile oluşan lipid peroksidasyonunda ansantüre yağ asidinin iki allik karbonundan hidrojen atomu çıkarken, singlet oksijen ile oluşan 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 (37,57).

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

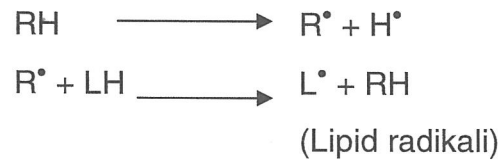


Fe^{+2} 'i bir oksidanın Fe^{+3} 'e oksidlemesiyle de lipid peroksidasyonu başlayabilir. Çoğu kez oksidan moleküler oksijen ve hidrojen peroksittir.

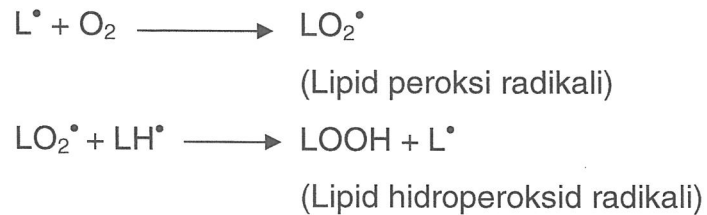


Lipid peroksidasyonu yağların özellikle poliansatüre yağ asidlerinin oksidatif oksijen bağımlı yıkılımı olarak tarif edilir ve dallanan bir zincir reaksiyonudur. Olayda genelde bir enzimin varlığı gerekli olmamasına rağmen belirtildiği gibi demir ve bakır gibi iz metaller, ultraviyole ya da radyasyon olayı katalizleyebilmektedir. Bu zincir reaksiyonu 4 ana aşamada inelenebilir (8,36):

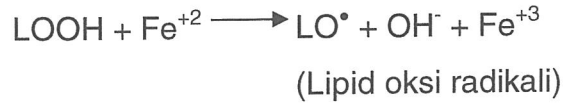
A-Zincir başlangıcı:



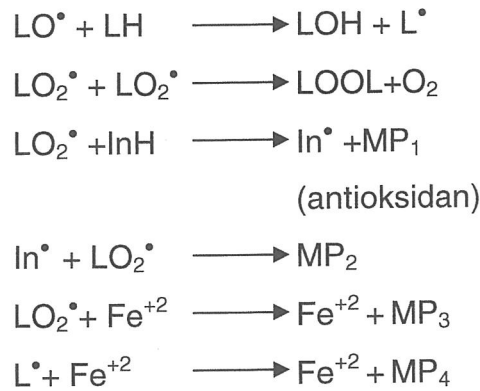
B- Zincir ilerlemesi:



C- Zincir dallanması:



D- Zincir sonlanması:



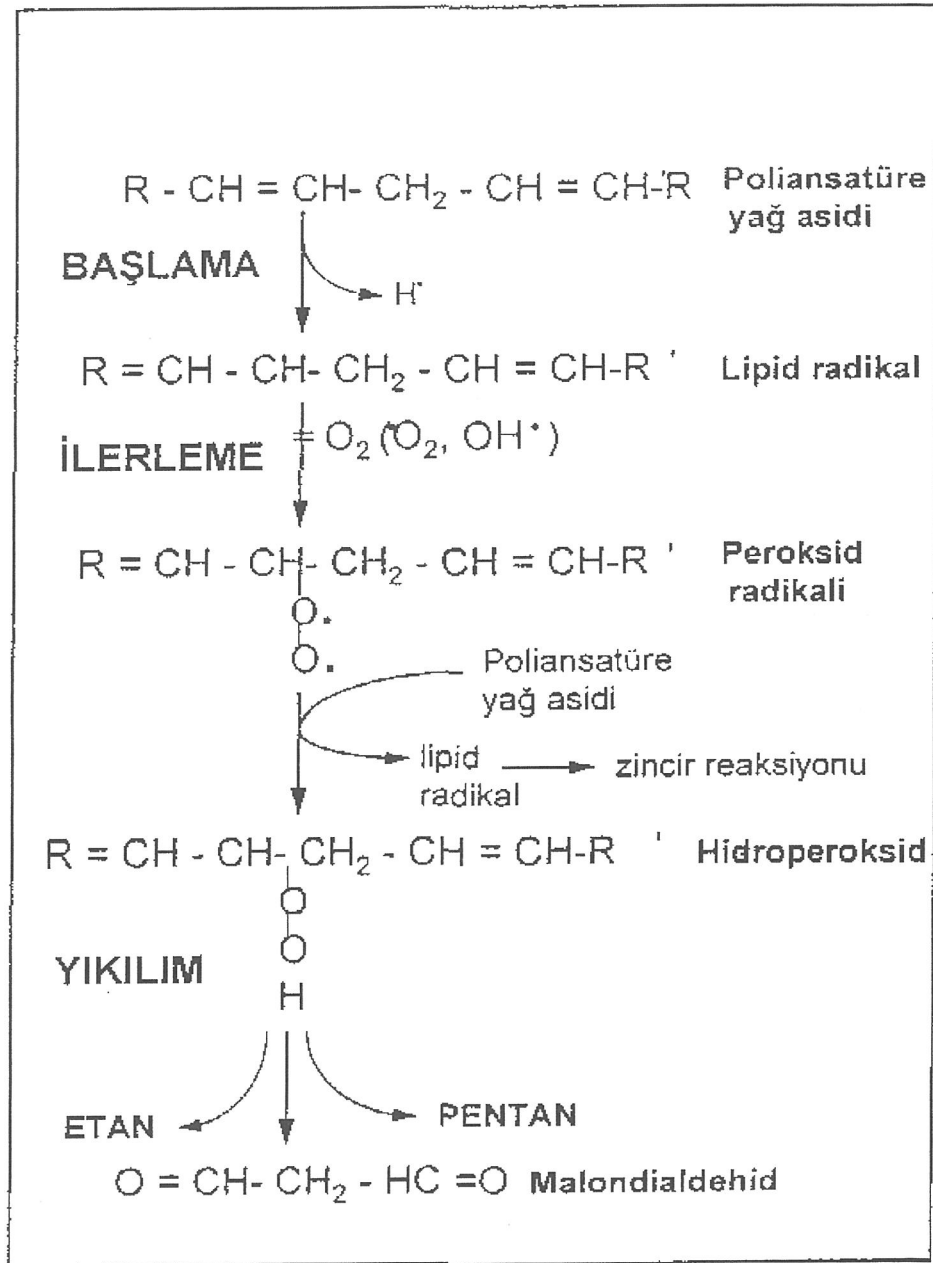
*(MP₁₋₄: Sonraki zincir tepkimelerine katılmayan identifiye edilmemiş çeşitli moleküller)

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

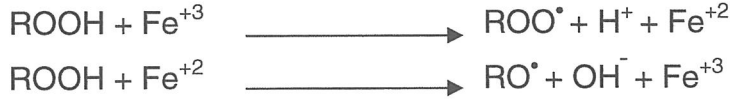


Oluşan lipid pentadienil radikali araşidonik asitte olduğu gibi 5, 8, 9, 12 ve 15. karbonlardaki oksijen ile reaksiyona girmektedir.

Linoleik asidin ya da linoleat esterlerinin primer oksidasyon ürünleri incelendiğinde dört ana konjuge dien hidroperoksidin oluştuğu saptanmıştır. Bu dört üründen (karışımın % 97'si) başka eser miktarlarda nonkonjuge

hidroperoksidler de identifiye edilmiştir. Dien hidroperoksidler anstabilidir (8,36).

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 oranının 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 (58).

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 (50).

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 (52).

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 (59,60). Myeloperoksidaz pek çok farmakolojik ajanın ve ksenobiyotiklerin de dahil olduğu çok çeşitli substratları radikal ara ürünlere okside etmek için hidrojen peroksiti kullanmaktadır (60,61).

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 (62).

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 (60-63). 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 (62).

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.(64-66).

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 (60).

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 karsinogenik 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 (67) 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 (68). Aynı tarihlerde Ignarro ve arkadaşları (69), 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 (70).

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.

Bugün için EDRF'nin tam olarak tanımlanamayan birçok vasodilatör madde içerdiği, bunlardan predominant olanın NO olduğu bilinmektedir. Nitrik oksid için tek endotel kaynak değildir, intimada nötrofil ve monositler tarafından da üretildiği bilinmektedir.

Nitrik oksid endotel yüzeyinde antitrombotik etkinliğe sahiptir. Nitrik oksid sentaz aktivitesinin inhibisyonu, mikrovasküler permeabiliteyi artırarak lökositlerin migrasyonunu ve adezyonunu artırmaktadır (71).

Garg ve Hassid (72) 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 hücresine 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 oksid olarak tanımlanmaktadır. Nitrik oksid; tek sayıda elektron içeren, renksiz, gaz şeklinde bulunan inorganik serbest bir radikaldir (49,73). Eşlenmemiş elektron nitrojen ve oksijen atomu üzerinde yer değiştirerek rezonans stabilitesini sağlamaktadır (74).



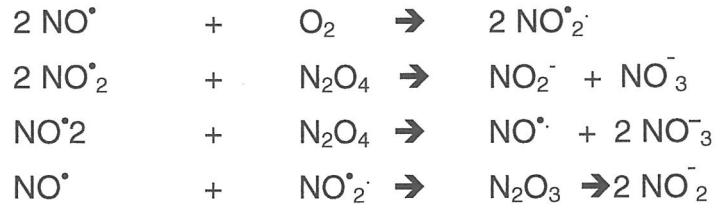
Nitrik oksid lipofilik, kimyasal olarak stabil olmayan, reseptöre bağımlı olmadan kolayca difüze olabilen ve bilinen en düşük moleküler ağırlıklı

memeli hücrenin biyoaktif sekresyon ürünüdür (75). NO ile ilişkili nitrojenin okside metabolitleri Tablo-2' de özetlenmiştir:

Tablo 2. Nitrik oksid ile ilişkili nitrojen metabolitleri

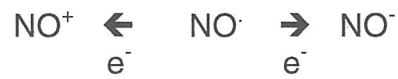
Sembol	İsim	Etki
NO^\bullet	Nitrik oksid	Serbest radikal (S – R)
NO_2^\bullet	Nitrojen dioksid	S-R, nitronize edici etken ajan
N_2O	Nitröz oksid	Anestetik
N_2O_3	Dinitrojen trioksid	Nitronize edici etken ajan
N_2O_4	Dinitrojen tetraoksid	Nitronize edici ajan
NO_2^-	Nitrit	Asidik ortamda NO' oluşturur
NO_3^-	Nitrat	Stabil anyon

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



NO_2^\bullet , N_2O_3 , N_2O_4 gibi NO_x güçlü nitrotize edici ajanlardır (70).

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 $Fe(3)$ 'ün redüksiyonunun gerektiği düşünülmektedir. Son görüşler, iki oksijen molekülünün aktivasyonu ile bir çift oksijen atomunun orjinin substratına girerek NO ve sitrüllini oluşturduğu şeklindedir. N^o hidroksi arginin NO biyosentezinde erken ara üründür (76).

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 sitrülün 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 (76).

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, testesteron 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^o 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 (75).

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
astrozit	Astrozit, kondrosit
B-hücresi,	İnflamatuvar nötrofil
Adrenal medulla ve korteks hücresi	Karsinoma hücresi
renal makula	Sinoviyal hücre
Fare nöroblastoma	

*Nonadrenerjik nonkolinerjik nöron

II.4.2. 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 bileşiğin 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 (76,77).

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 Superoksid anyon radikali	EDRF, tPA** Mutasyon oluşumu Hidroksil radikali oluşumu	Ribonükleotid redüktaz Dehidrogenaz Mutasyon kaybı Superoksid anyon radikali azalışı

* Elektron transport zinciri

**Doku plazminojen aktivatörü

NO^\bullet ve NO_2^\bullet oluşturan bileşikler (NO_2^\bullet , N_2O_3 , $\text{N}_2\text{O}_4 \rightarrow \text{NOX}$) 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 (78).

II.4.3. 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 immün yanıt
Antimikrobiyal (sitotoksik)
Antitümör (sitotoksik)

II.4.4. 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 (79).

“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 (78).

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 (80). 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 arasıdonik asidin metaboliti olasılıkla da epoksit veya lipoksittir.

Endotelden kaynaklanan en az iki vazokonstriktör faktör (EDCF) bulunmaktadır. Bunlardan $EDCF_1$ indometazine duyarsız olup "endotelin" adlı peptid olabileceği düşünölmektedir. $EDCF_2$ ise indometazine duyarlıdır ve superoksit anyonları olabileceği düşünölmektedir (78).

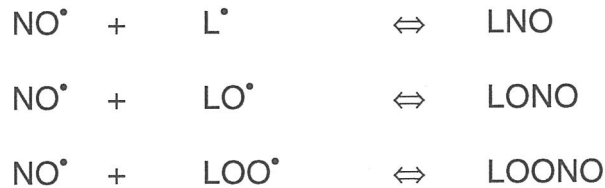
Agrege olan trombositlere karşı endotelyuma bağlı relaksasyonlar esas olarak adenin nükleotidler (ADP, ATP) ve serotonin aracılığıyla gerçekleşir. Endotelyuma bağımsız olan kontraksiyonlar serotonin ve tromboksanlar tarafından gerçekleşir. Normal koşullarda sağlam bir endotelde relaksasyon ve kontraksiyonlar 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 PGI_2 'nin üretimi azalır ve bunların agrege olan trombositlere karşı gösterdikleri sinerjik etkiler ortaya çıkmayabilir (81).

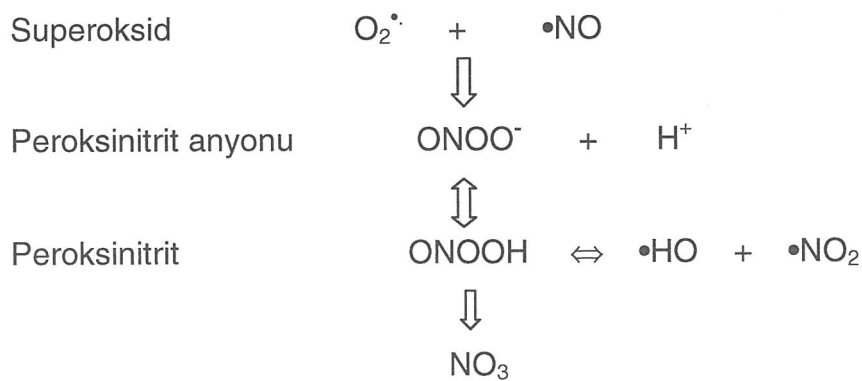
Sonuç olarak; endotelyumun yalnızca kan ile dokular arasında madde alışverişinin yapıldığı nontrombojenik bir bariyer olmayıp aynı zamanda güçlü vazoaktif, antikoagülan ve fibrinolitik maddeler üreten, vücudun en büyük ve en aktif parakrin organı olduğu anlaşılmıştır. Bugün endotelyumun yapısal ve işlevsel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

II.4.5. Lipid radikalleri ve nitrik oksid

NO^\bullet lipid radikali (L^\bullet), lipid alkoksil radikali (LO^\bullet) ve lipid peroksil radikali (LOO^\bullet) lipidperoksil NO ürünlerini oluşturarak antioksidan etki sağlayabilmektedir (kaynak). Bu reaksiyonlar;



II.4.6. Nitrik oksid ve süperoksid etkileşimleri:



NO^\bullet süperoksid anyon radikali ($\text{O}_2^{\bullet-}$) ile peroksinitrit anyonu (ONOO^-) peroksinitröz asidini (ONOOH) oluşturur. Bu oluşan maddenin %20 ile 30'u hidroksil radikali (OH^\bullet) ve NO_2^\bullet 'e dönüşebilir (82).

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^\bullet 'nun antioksidan etkisi ile baskılanır ve bu yolla antiaterojenik etkisi sağlanır. Süperoksid ($\text{O}_2^{\bullet-}$) fazlalığında ise peroksinitrite bağlı olarak proaterojenik etki oluşur (78).

Damarlarda NO ve süperoksid dengesi:



II.4.7. Nitrik oksidin düzeylerini etkileyen faktörler

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

Bir transmitter olarak kendi rolü içinde NO, sinir uyarılarının düzenli transmisionundan 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) üretemez 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 (83).

II.4.8. 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 (78,83).

NO' nun kardiyovasküler sistem ilişkili olduğu konulara kısaca değinirsek,

II.4.8.1.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 (84).

Koroner spazm ya spontan olarak (özellikle varyant anjinal 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.4.9.2.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 (78,83).

Nitrik oksid yıkımının azalması veya durması vasküler düz kas hücrelerinin mediadan intimaya migrasyonunun artışında ve aterosklerotik plakların gelişmesinde pay sahibi olabilir (NO'nun antiproliferatif etkisi nedeniyle). Nitrik oksid dolaylı olarak aterosklerozun ilerlemesini de etkileyebilir. Gerçekten NO'nun foksiyonunu inhibe edeci kapasitesi aynı zamanda trombositlerden PDGF ve TGFB₁ gibi büyüme faktörlerinin salgılanmasını inhibe eder.

Bozulmuş kan akımına bağlı vazodilatasyon egzersiz sırasında hastaların angina eşiğini daha da düşürebilir ve kan damarı duvarını sempatik aktivasyon sırasındaki vazokonstriktör uyarılara karşı duyarlı kılabilir. Bu fenomenlerin sonucunda daha büyük bir iskemi ve angina pektoris ortaya çıkar. Koroner damar tonusunun akut olarak artmasıyla angina pektoris 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 (80).

II.4.9.3. 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 (81,85).

II.4.9.4.Kardiyovasküler sistem üzerindeki diğer etkiler

Özellikle koroner dolaşımda, 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 (85).

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 (83).

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 modulatörleri jinekolojide de kullanım alanı bulabilir.

II.4.10.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 (86).

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 (87). 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 (88).

II.4.11. Diğer sistemler üzerine olan etkileri

- Hipertansiyonun belli formlarında vazokonstrüktör maddelerin arttığı bilinmektedir. Endojen vazodilatatör olan NO' nun boşalmasına bağlı olarak hipertansiyon meydana gelmektedir. Ayrıca anjiyotensin II' nin fizyolojik antagonisti olması ve renin salınımını düzenlemesi nedeniyle NO hipertansiyon üzerinde etkilidir (89).
- 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 (89).

- Diyabetin her formunda, gecikmiş vasküler lezyonların gelişmesinde kısmen de olsa NO yetersizliğinin sorumlu olduğu bilinmektedir (90).
- Nitrik oksidin ayrıca bronkospazmın giderilmesinde, vücudun kansere karşı savunmasında, otoimmün reaksiyonlarda, nörotransmitter olarak beyin fonksiyonlarında ve ağrı oluşumunda önemli rol aldığı gösterilmiştir (89,90).

II.4.12. Nitrik oksid ölçüm yöntemleri:

NO in vivo olarak az miktarda sentezlendiğinden ve oksijen ile hızla reaksiyona girdiğinden ölçümü zordur (79).

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

II.5. ANTIOKSİDAN 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 girişimleri, 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 (8,91). 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

Oksidanlara 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' in (92) 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.
- Glutatyon peroksidaz; hidrojen peroksid ve lipid peroksidlerinin redüksiyonunu katalizler.
- Glutatyon redüktöz; GSSG'nin (okside glutatyon) GSH'ye (redükte glutatyon) dönüşümünü sağlayarak indirekt yolla antioksidan etki gösterir.
- Hidroperoksidaz
- Sitokrom c oksidaz; hücredeki oksijenin % 95'ini detoksifiye eder.

II.5.1.1.1. Süperoksid dismutaz (Süperoksid oksidoredüktaz)

Süperoksid dismutaz, oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunan ve süperoksidin hidrojen perokside dismütasyonunu katalizyen bir metalloenzim olup 21. kromozomda lokalize olmuştur (8,36,93).

Süperoksid dismutaz



SOD, süperoksid anyonunun dismutasyonunu 10^4 kez hızlandırmaktadır ve hız sabitesi 2×10^9 / ms'dir. İndüklemeye bağlı olarak intraselüler SOD artışı dioksijenin toksisitesine karşı gelişen bir direnç artışını da beraberinde getirir (8, 91, 94).

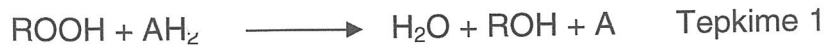
Süperoksid dismutazın bugüne kadar dört farklı şekli bulunmuştur. Bunlardan biri ökaryotik hücrelerin sitozolünde (Zn^{++} ve Cu^{++}) ve mitokondrinin intermembran aralığında (Mn^{++}) bulunur. Molekül kütlesi 31 200 Da olan bu enzim her bir dimerik protein için birer molekül bakır ve çinko içerir. Çinkonun stabiliteyi sağladığı, bakırın ise aktiviteden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Çinkonun ayrılması irreversibl iken, bakır reversibl olarak ayrılıp tekrar bağlanabilir. Mn-SOD kalp, karaciğer ve böbrekte en yüksek konsantrasyonlardadır. Cu-Zn SOD ise karaciğer, beyin ve testiste en yüksek; eritrosit, akciğer ve pankreasta ise en düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Cu-Zn SOD sıçan karaciğerinde lizozomlarda da bulunur. Cu-Zn SOD siyanür ile inhibe olurken Mn-SOD siyanür ile inhibe edilemez. Dördüncü tip SOD demir içerir ve E.Coli'nin periplazmik aralığında bulunur. Molekül kütlesi 40 000 Da olan bu enzim yapısal olarak Mn SOD 'a büyük benzerlikler göstermektedir (8,36).

II.5.1.1.2. Katalaz

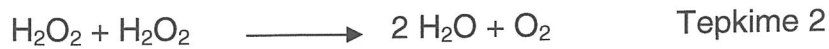
Katalaz yapısal olarak bir hemoproteindir. Sığır karaciğerinde yürütülen çalışmalarda katalazın molekül kütlesinin 248 000 Da olduğu ve non kovalan bağlı protoporfirin IX Fe (hem) grubu içerdiği ortaya konmuştur. Bu enzim kan, kemik iliği, karaciğer, müköz membran ve böbrekte yüksek miktarlarda bulunmaktadır. Eritrosit dışında özellikle peroksizomlarda yoğun olarak bulunur. Katalaz, düşük hızlarda hidrojen peroksidin oluştuğu

durumlarda ya da yüksek elektron alıcısı konsantrasyonlarının bulunduğu ortamlarda peroksidatif tepkimeyle (Tepkime 1), hidrojen peroksit oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkimeyle (Tepkime 2) hidrojen peroksidi suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırır (8,91,95,96).

Katalaz (peroksidatif)



Katalaz (katalitik)



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



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



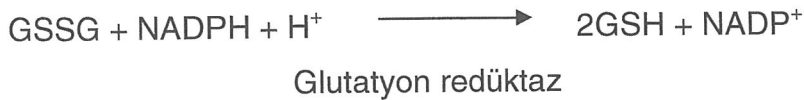
Yapılan son çalışmalar, katalazın rat kalp mitokondrisinde lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu rol oynadığını göstermiştir. Oksidanlar, GSH-Px aktivitesini bastırarak düzeye ulaştığında, mitokondriyal katalaz, membran hasarına neden olan hidrojen peroksitinin etkisini önler. Sitokrom c, mitokondriyal membranlara olan oksidatif stresde katalist rolü görmektedir (97).

II.5.1.1.3. Glutasyon redoks siklusu

Glutasyon redoks siklusu, hücre içi hidroperoksidlerin indirgenmesinde, temel antioksidan mekanizmayı oluşturmaktadır. Katalazı tamamlayıcı etkisinin yanısıra, değişik hidroperoksidleri temizleme etkisine de sahiptir. Metabolize edilen ürünler arasında, büyük moleküllü lipid peroksidleri ve lipooksigenaz aracılığı ile katalizlenen reaksiyonların ürünleri de yer almaktadır.

Hidroperoksidlerin indirgenmesinde, redoks sisteminden sorumlu olan kilit enzim glutatyon peroksidaz (GSH-Px) dır (65). GSH-Px'in molekül ağırlığı yaklaşık olarak 85000 D dur ve 4 selenyum atomu içeren tetramer bir protein yapısındadır. GSH-Px, kosubstrat olarak redükte glutatyona (GSH) ihtiyaç duymakta ve okside glutatyonun (GSSH) meydana geldiği reaksiyonu katalizlemektedir.

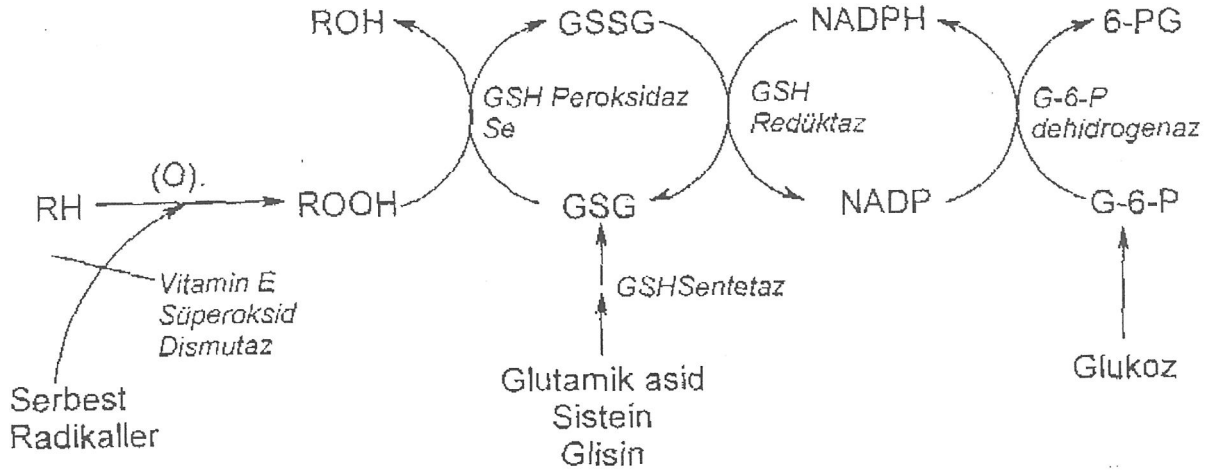
Sağlıklı işleyen bir hücrede GSH/GSSG oranı yüksek olarak korunmaktadır ve yaklaşık olarak 500/1 dir. Hidroperoksidlerin redükte olması ile meydana gelen GSSG, glutatyon redüktazın katalizlediği bir tepkime ile tekrar GSH'a dönüşmektedir.



Glutatyon peroksidazın hücredeki dağılımı glutatyon redüktaza bağımlıdır. Her iki enzimde sitozolde en yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Yapılmış olan çalışmalar, fotokimyasal olarak oluşturulan fosfolipid hidroperoksidlerinin GSH-Px etki etmeden önce fosfolipaz A₂ ile hidroliz edilmiş olmaları gerektiğini göstermektedir. Diğer yandan, kolesterol hidroperoksidleri de GSH-Px'a dirençli bulunmuşlardır. Bu nedenle, ikinci bir selenoenzim olan ve fosfolipid hidroperoksid glutatyon peroksidaz (PHGPx) olarak tanımlanan enzimin etkileri araştırılmış ve bu enzimin fosfolipaz A₂ ye ihtiyaç duymadan, membran fosfolipid hidroperoksidlerini indirgeyebildiği saptanmıştır. PHGPx' in membrana olan afinitesi fazla olup substrat olarak GSH'a mutlak bir spesifitesi yoktur. PHGPx'in membran fosfolipidlerine, GSH-Px'in sitozolik hidroperoksidlerine etkisi ile yaygın bir etki alanı oluşturulmaktadır.

Glutatyon redoks siklusunun aktivitesi, karaciğer ve eritrositlerde en yüksek oranlarda olup, kalpteki etkinliği daha azdır (98).

Şekil-3. Antioksidan savunma sistemlerinde glutatyonun yeri



II.5.1.1.4. Glutatyon (γ -glutamilsisteinilglisin)

Glutatyon, ökaryotik hücrelerde en fazla bulunan kısa peptidlerden ve en bol bulunan intrasellüler tiyollerden biridir (65). GSH'nın birçok önemli biyolojik fonksiyonu vardır. Hidroksil radikallerinin ve singlet oksijen'in scavenger'ıdır. DNA ve proteinin sentezi, transportu ve ara metabolizmasını kapsayan diğer hücre fonksiyonlarında geniş yere sahiptir. Redükte GSH vücutta oldukça yüksek oranda bulunur ve glutatyon disülfid'e (GSSG) oksidize olur. Hücre içi GSH/GSSG oranı, glutatyon redüktaz tarafından yüksek seviyede idame ettirilir (63). Eğer doku yüksek miktarda hidroperoksid ve diğer serbest radikallere maruz kalırsa bu oran düşer ve GSSG birikimi meydana gelir. Bu da, hücre içi oksidasyon – redüksiyon durumunun bozulmasıyla, enzimlerin inaktivasyonu ile inter veya intra moleküler mixed disülfid oluşumu ile sonuçlanabilir. Böylece doku oksidatif stresse maruz kalır (91,98).

Serbest oksijen radikalleri, birçok hastalığın ve doku hasarının patogenezinde yer alır. Bu sitotoksik özellikler, lipid peroksidleri gibi çeşitli serbest radikal derivelerini içerdiği gibi, süperoksid, hidrojen peroksid ve hidroksil radikallerini de kapsar. Hidrojen peroksid ve peroksidler, yüksek diffüze edilebilirlik ve reaktivitelerinden dolayı çok fazla oksidatif hasara yol açarlar.

Hidroperoksidlerin GSH bozukluğu ve hücre hasarının diğer tipleri üzerine olan etkisi çeşitli organ ve dokularda araştırılmıştır (99,100,102).

Glutasyonun redükte formu (GSH) serbest sülfhidril grubu içeren bir tripeptid olup, canlılarda yaygın olarak bulunmaktadır. Glutasyon, hemoglobindeki sistein rezidülerin ve diğer eritrosit proteinlerinin redükte halde kalmasını sağlayan bir sülfhidril tamponu gibi görev görmektedir. GSH'ın hücredeki fonksiyonları şöyle özetlenebilir:

1. Endojen peroksid ve serbest radikallerin yıkılımını sağlar.
2. Proteinlerdeki –SH gruplarının devamlılığını sağlar.
3. Glikozilaz gibi bazı enzimlerin koenzimidir.
4. Yabancı bileşiklerin detoksifikasyonunu sağlar.
5. Disülfid değişim tepkimelerine katılır.
6. Aminoasidlerin membran boyunca transportunu sağlar.

GSH tayininde rastlanan bazı zorluklar mevcuttur. Kullanılan analitik metoda bağlı olarak, preperasyon ve analiz sırasında örnekte meydana gelen oksidatif değişiklikler en büyük sıkıntıdır. Ayrıca, ölçülecek olan GSH'ın azalmış seviyeleri, GSH yıkılımında en önemli enzim olan GGT' nin etkilenmesinin bir sonucu olabilir. Böbrekte ayrı bir öneme sahip olan GGt, vücutta en yüksek seviyeye de bu organda sahiptir (101).

II.5.1.1.5. Glutasyon peroksidaz

Glutasyon peroksidaz adıyla anılan, glutatyona bağımlı, üç farklı enzim bulunmaktadır.

1- Klasik, selenyum içeren glutasyon peroksidaz

GSH-Px, substratları H₂O₂ ve lipid hidroperoksidleri (LOOH) olan (103) ve aşağıdaki genel reaksiyonları katalize eden bir selenoenzimdir. (50,91)



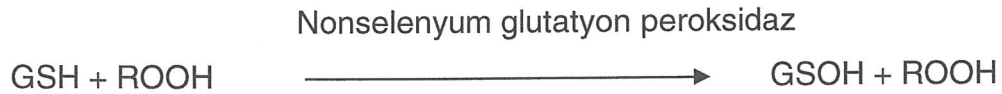
2- Fosfolipid hidroperoksid glutasyon peroksidaz:

Selenyum içeren bir enzimdir. H₂O₂ ve LOOH yanında, membran fosfolipidlerinden oluşan hidroperoksidlere de etki eder. (50,104) Katalitik aktivite bakımından klasik glutasyon peroksidaza benzerse de substrat spesifitesi ve molekül ağırlıkları bakımından farklıdır. Glutasyon peroksidaz fosfolipid hidroperoksidlere (PLOOH) etkili değildir. Ayrıca fosfolipid

hidroperoksid glutatyon peroksidazın molekül ağırlığı glutatyon peroksidazın ¼'üdür (50).

3- Nonselenyum glutatyon peroksidaz:

Glutatyon transferaz'ın substrat olarak organik hidroperoksidleri kullanarak glutatyon peroksidaz reaksiyonunu katalize edebilen bazı izoenzimlerini ifade eder. Selenyum içermez. Sitozolik izoenziminin substratı LOOH, mikrozomal izoenziminin substratları. LOOH ve PLOOH'dır Enzim glutatyonun hidroperoksidlere transferini katalizler.

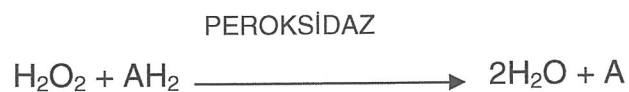


Bu reaksiyonu nonenzimatik bir reaksiyon takip eder.



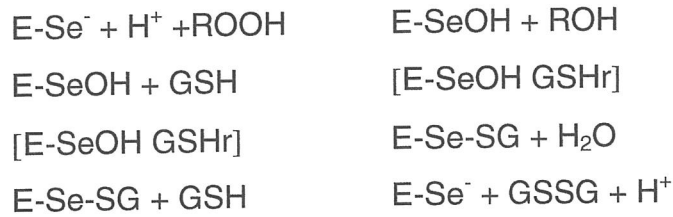
Glutatyon transferazın selenyum bağımlı glutatyon peroksidaza oranla önemi, değişik türlerin doku ve hücre kompartmanlarında farklılık gösterir. Örneğin, rat karaciğer sitozolünde bu aktivite total peroksidaz aktivitesinin % 35'ini oluştururken, testis sitozolünde %95'ini, hepatosit nükleusunda %80'inini oluşturur. Bu oran insan karaciğer sitozolünde %80, kobaylarda ise %100'dür (50).

Konumuzu oluşturan klasik glutatyon peroksidaz prostetik grup olarak selenyum içermesi, fiziksel özellikleri ve substrat spesifitesi ile prohem içeren peroksidazlardan ayrılır (82). Hemoprotein yapısındaki peroksidazlar askorbat, kinonlar ve sitokrom c gibi molekülleri elektron akseptörü olarak kullanarak peroksidleri indirgerler (55).



GSH-Px'in yapısında bulunan selenosistein formundaki selenyum atomları biyolojik aktivite için gereklidir (81). Normal sisteinde yan zincir SH iken, selenosisteinde SeH biçimindedir (46). Aktif bölgeyi oluşturan selenosistein hidroperoksidlerle muhtemelen selenik asid türevine okside olur. Daha sonra glutatyon karboksilik fonksiyonları yoluyla katalitik merkeze bitişik iki arginin kalıntısına elektrostatik olarak bağlanarak SH gruplarının

okside selenyuma yönlendiğini sağlar. Glutatyondan SH grubu selenik asit rezidüsü ile reaksiyona girerek selenadisülfid köprüsü oluşturur, bu daha sonra enzimin rejenerasyonu sırasında ikinci GSH molekülü ile birleşir (50).



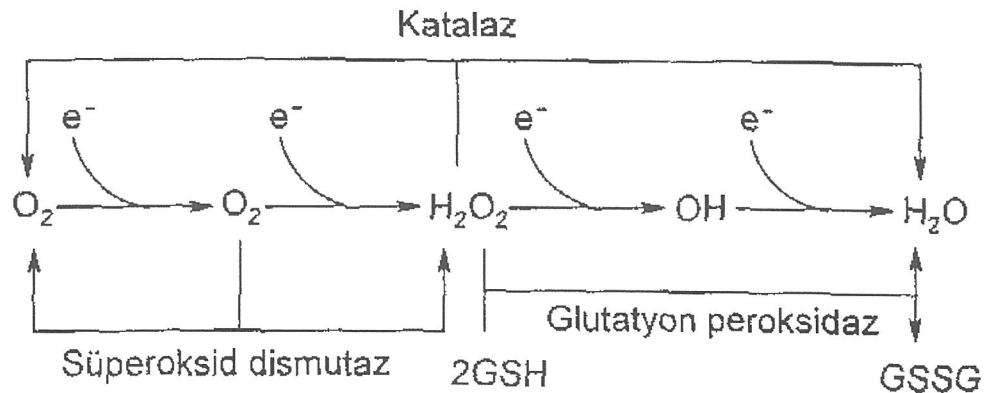
Uzun süreli selenyum eksikliğinde tüm vücut dokularında GSH-Px aktivitesinde azalmaya bağlı olarak serbest radikaller birikir ve hücre membranı hasarı sonucu, kardiyomyopati gibi çeşitli patolojiler ortaya çıkar (81). GSH-Px özellikle hücre içinde, daha az olarak da ekstrasellüler ortamda (EC-GPx) bulunur (8,36).

Katalazın aksine glutatyon peroksidaz H_2O_2 'in düşük kararlı durum konsantrasyonlarında etkilidir. Bu iki enzimden biri diğerinin eksikliğini kompanse edebileceği gibi (36), H_2O_2 'in daha yüksek konsantrasyonlarında katalazın etkili olması, glutatyon peroksidaz reaksiyonu sırasında glutatyon ve NADPH tüketiminin sınırlandırılmasına yönelik olabilir (50).

Glutatyon peroksidaz diğer bir antioksidan olan süperoksid dismutaz ile birbirlerinin inhibitörü olan O_2^\bullet ve H_2O_2 'i ortadan kaldırmak suretiyle sinerjik etki gösterir (47,50).

Glutatyon peroksidaz ile zincir kırıcı bir antioksidan olan E vitamini arasında da birkaç şekilde ortaya çıkan bir sinerjizm vardır. Bunlardan birisi her iki antioksidanın da lipid peroksidasyonunu engellemesidir. Glutatyon peroksidaz H_2O_2 'i indirgerken glutatyonu (GSH) kullanır, oluşan okside glutatyon (GS-SG) FAD içeren bir flavoprotein olan glutatyon redüktaz tarafından katalizlenen bir reaksiyonla indirgenir. Gerekli NADPH pentoz fosfat yolundan sağlanır. Pentoz fosfat yolunun önemli bir enzimi olan glukoz-6- fosfat dehidrogenaz eksikliğinde primakin, aspirin ve sülfonamid gibi oksidanlara maruz kalan eritrositler hemolize olur. Ayrıca eritrositlerde H_2O_2 birikimi hemoglobinin methemoglobine dönüşümünü artırarak eritrosit ömrünü kısaltabilir (55).

Şekil-4. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve antioksidan enzimlerin etkileri



II.5.1.1.6. Glutasyon Redüktaz

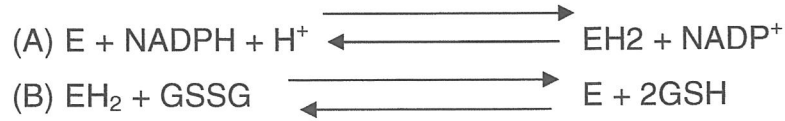
Glutasyon redüktaz, NADPH varlığında okside glutasyonunun redüksiyonunu katalizler.



Glutasyonun indirgenmiş formda tutulabilmesini sağlamak, oksijenle oluşturulan hücre hasarına karşı koymak ve DNA sentezi için gerekli deoksiribonükleotidleri sağlamak gibi fonksiyonlara sahip olan glutasyon redüktaz, flavoprotein disülfid oksidoredüktazlar isimli büyük bir enzim ailesinin üyesidir (107).

İnsan glutasyon redüktazı, 8. kromozomun kısa kolunda tek bir lokus tarafından kodlanan ve biri FAD içeren 52.4 kDa ağırlığında iki subünitten oluşan bir homodimerdir (108). Aktif bölgesinde taşıdığı redoks-aktif disülfid parçacığı, geriye dönüşümlü olarak iki elektron depolama ve indirgenmiş ekivalanları okside glutatona transfer etmede önemli fonksiyona sahiptir (107). Reaksiyon sırasında NADPH, elektronları disülfide transfer eden FAD'ı indirger. FAD ve indirgenmiş disülfidin yük transfer kompleksini içeren iki elektronu indirgenmiş enzim, glutasyon tarafından oksitlenir (109).

Tüm katalitik dizilim redüktif bir yarı reaksiyona (A) ve oksidatif bir yarı reaksiyon (B) şeklinde gösterilebilir:



Eritrosit içinde glukozun oksidasyonu ile oluşan NADPH' lar hücre içinde glutasyonun indirgenmiş şekilde tutulması için gereklidir. Glutasyon, eritrositlerde aminoasitlerden sentezlenir ve bir redoks tamponu olarak görev yapar. İndirgenmiş durumdaki proteinlerin sülfhidril gruplarını korur ve demirin ferröz (Fe^{+2}) durumunda kalmasını sağlar.

Glutasyon redüktaz, aktivite için riboflavin gerektiren bir FAD enzimidir. Glutasyon metabolizmasındaki anormallikler, glutasyon redüktaz için gerekli riboflavin ve glutasyon peroksidaz için gerekli selenyumun nütrisyonel eksikliklerinden kaynaklanabilir. Glutasyon redüktaz apoenziminin kalıtsal bir eksikliği de tanımlanmaktadır. Glutasyon redüktaz, ayrıca glutasyon ve proteinlerin (Pr) karma disülfidlerinin redüksiyonunu katalizler:



Böylece, heksokinaz, gliseraldehid-fosfat dehidrogenaz, glutasyon redüktaz ve hemoglobinin aktif disülfhidril grupları indirgenmiş formda tutulmaktadır. Glutasyon redüktaz, hidrojen peroksid ve süperoksid anyonu gibi potansiyel olarak hasar verici okside bileşiklerin inaktivasyonunda da görevlidir (107).

II.5.1.1.7. Glutasyon S-Transferaz

Glutasyon-S-Transferaz'lar (GTS's), elektrofilik bir merkez içeren çeşitli hidrofobik bileşiklerin, glutasyonun $-\text{SH}$ grubu ile konjugasyonunu katalize eden bir enzim grubudur. Bileşiklerdeki elektrofilik grupların nötralizasyonu sonucunda suda çözünürlükleri artmaktadır. Oluşan konjugattan glutamat ve glisin rezidülerinin ayrılması sonucunda kalan sisteinil rezidüdeki serbest amino grubunun asetilasyonu ile son ürün olarak bir merkaptürik asit oluşmakta ve atılıma uğramaktadır (110,111). GST'lar ayrıca bilirubinin de

dahil olduğu çeşitli lipofilik bileşikler için intrasellüler bağlayıcı proteinler olarak etki etmektedirler (111).

Sitozolik GST'lar en az 5 farklı gen ailesinde kodlanmakta olup, bunlar arasında memelilerde en fazla bulunan α , μ ve π izo- enzimleridir. Ekspresyonları cinsiyet, yaş, doku, tür ve tümör spesifik durumlara bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (111,112). İnsan kırmızı kan hücreleri ise GST sigma ve GST rho enzimlerini içermektedir. GST sigma eritrosit yaşına bağlı bir değişkenlik göstermezken, GST rho yaşa bağlı belirgin bir değişiklik göstermekte ve hücre yaşlanması ile birlikte detoksifikasyon yeteneğinde de bir azalma gözlenmektedir (113). Yaşlanma olayında reaktif oksijen ürünlerindeki artışın yanısıra GSH redoks siklusu ile ilişkili enzimlerin aktivitelerinde de değişiklikler olduğu ileri sürülmektedir (114).

GST'ı endükleyen bileşiklerin birçoğu bu enzimin substratıdır yada substrat olabilecek ürünlere metabolize olur. GST'ların invivo olarak reaktif oksijen ürünleri aracılığı ile düzenlenmesi söz konusu olabilir. Çünkü en güçlü enzim endükleyicilerin serbest radikal oluşturma kapasitelerinin yanısıra, H_2O_2 'inde memeli hücrelerinde GST'ı indüklediği gösterilmiştir.

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.
- Tiyo içerenerler (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 (114).

II.5.2. İlaçlar

- Ebselen; endojen glutatyon peroksidaz aktivitesini artırır.
- Demir şelatörleri; desferroksamin, dimetil tioüre, serüloplazmin; serbest Fe⁺³ü bağlarlar.
- Sitokinler (TNF ve interlökin-1).
- Ksatin oksidaz inhibitörleri (allopurinol, oksipürinol); ksatin oksidaz tarafından süperoksid anyon üretimini inhibe ederler.
- Proteaz inhibitörleri; serin proteaz inhibitörleri, fenilmetilsülfonil florid; ksantin oksidazın ksantin dehidrogenaza dönüşümünü bloke ederler.
- NADPH oksidaz inhibitörleri; adenozin, lokal anestezikler, Ca⁺² kanal blokerleri, nonsteroidal antiinflamatuvar ajanlar; nötrofil ve makrofajlardaki NADPH oksidaz üretimini inhibe ederler.
- Mannitol; OH• radikalini tutar.
- Barbitüratlar
- Flavonoidler
- Trimetazidin
- İndepamid
- H₂ reseptör blokerleri

III. MATERYAL VE METOD

III.1. ARAÇ VE GEREÇLER

1. **Benmari:** Medingen W 22
(0-99 °C) (Germany)
2. **Homojenizatör:** IKA Labortechnik 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 (116).

Parsiyel portal ven ligasyonu farklı hayvanlarda, özellikle ratlarda portal hipertansiyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (30,117-119). 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 (120).

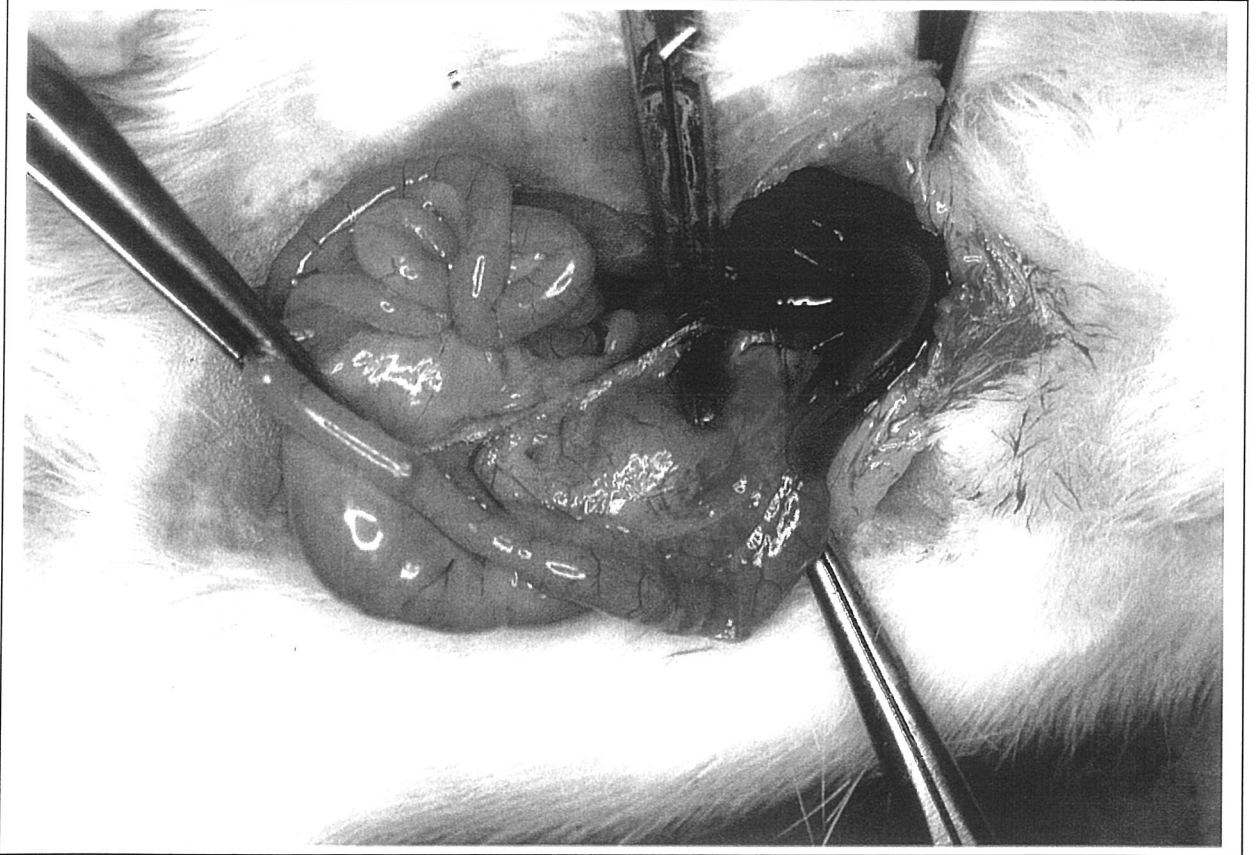
Sıçanlar 2 gruba ayrıldı.

I.Grup (13 adet) :Kontrol grubu

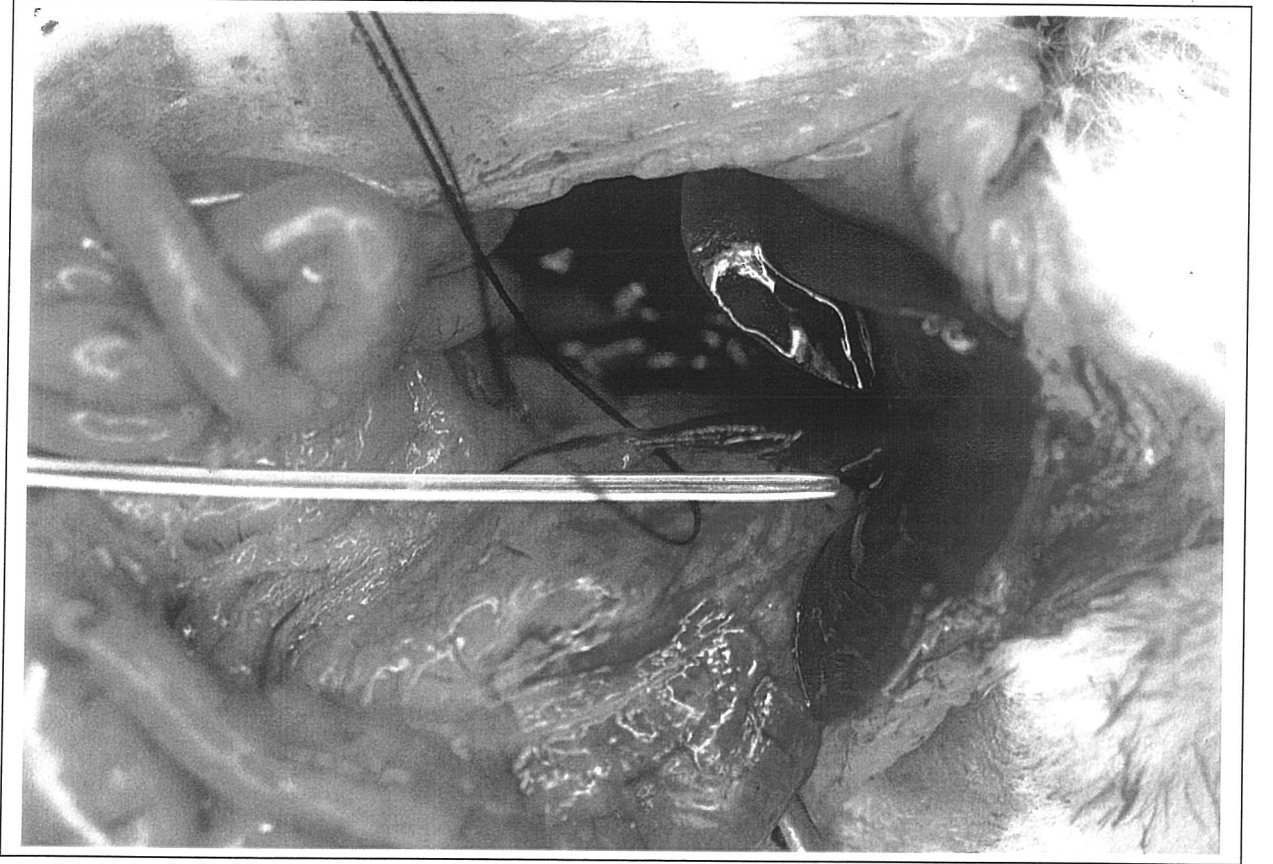
II.Grup (12 adet) :Portal hipertansiyon oluşturulmuş grup

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.

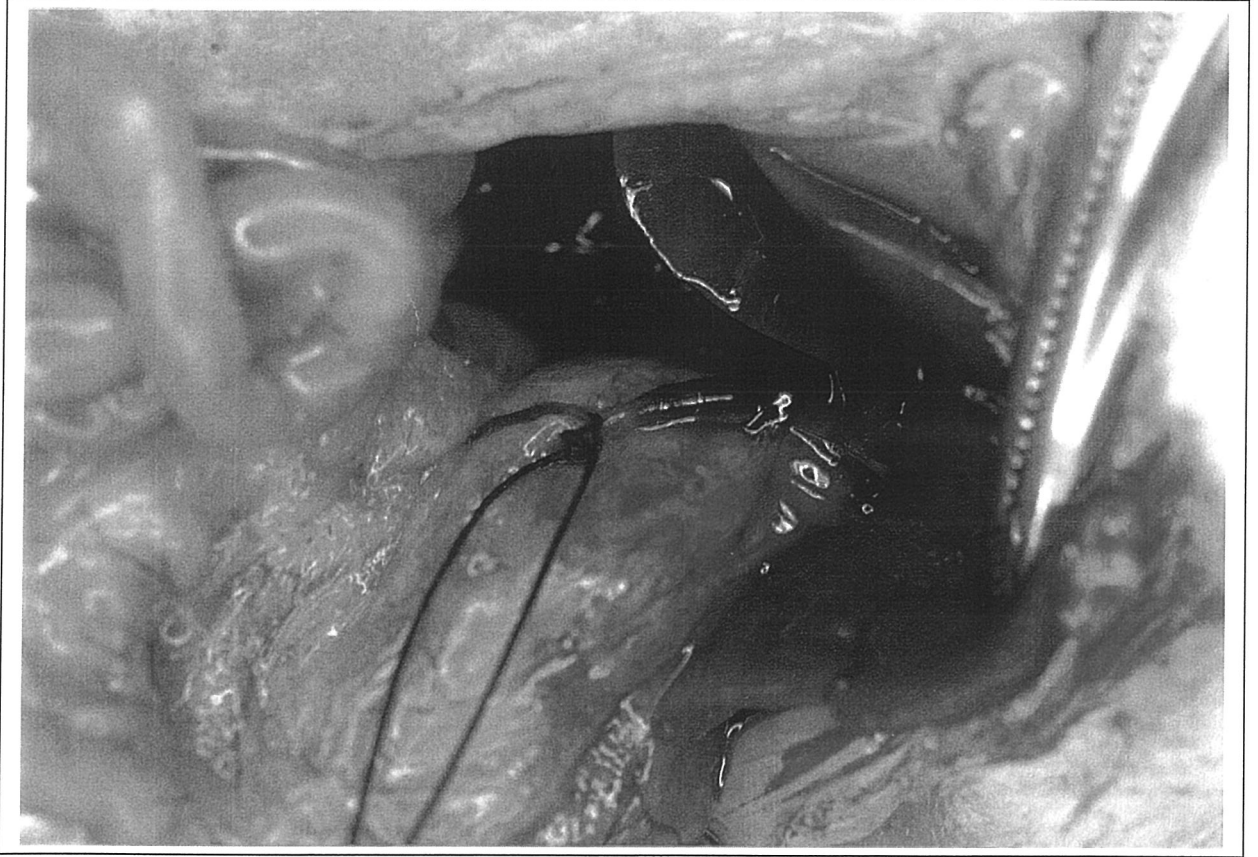
Parsiyel portal ven ligasyonu için ketamin anestezisi sonrası standart orta hat insizyonu yapıldı. Portal ven proksimalden bifurkasyona kadar eksplore edildi (Resim.I). Portal stenoza yol açmak için portal ven, 20 numara branül ile birlikte 4-0 ipek ile bağlandı (Resim.II). Bu metodla portal vende yaklaşık %75'lik darlık elde edildikten sonra branül geri çekildi (Resim.III). Orta hat insizyonu 3-0 ipek ile kapatıldı. Sekiz hafta sonra bütün denekler servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edilerek laparotomi yapıldı. Trietz ligamanından itibaren 5 cm distalden proksimal jejunum ve ileoçekal valvin 5 cm proksimalinden distal ileum segmentleri , çıkan kolon segmenti ve pankreas dokusu çıkarıldı. Dokular hemen soğuk izotonik su ile yıkandı. Kan ve diğer dokulardan temizlenip alüminyum folyeye sarılarak -85 °C derin dondurucuda biyokimyasal testlerin yapılacağı zamana kadar saklandı.



Resim I. Sıçan portal veninin eksplorasyonu.



Resim II. Parsiyel portal ven ligasyonu.



Resim III. Branül çekildikten sonra portal ven stenozunun görünümü.

III. 3. DOKULARIN HOMOGENİZASYON İŞLEMLERİ

III.3.1. Homojenizasyonda kullanılan reaktifler:

PH 7.5, 0.2 mM Tris-HCl tamponu hazırlandı (121). NO, superoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve ksantin oksidaz (XO) 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.

Homojenatlar 3220 rpm / 30 dakika +6 °C' de santrifüj edildi. Ayrılan süpernatantlardan GSH-Px, XO ve protein tayinleri yapıldı.

Süpernatant 1/1 oranında kloroform/etanol (3/5,v/ v) ile vortekslenip cam tüpte 3220 rpm / dakika +4°C' de santrifüj edildi. Üstte oluşan etanol fazından SOD enzim aktivite 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.

III. 3. PROTEİN ÖLÇÜMÜ (LOWRY METODU) :

Deneyin Prensipleri: Alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşmaktadır. Bu kompleks fosfomolibdatfosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteus-Phenol Reaktifi) redüklemekte ve koyu mavi bir renk oluşmaktadır(122). Burada rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Kullanılan Kimyasal Maddeler: CuSO_4 , Na_3Sitrat , Na_2CO_3 , 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: Ağız 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 vorteksenerek 20-30 dakika oda ısısında inkübe edildi.

Spektrofotometrede 700nm' de numunenin ve standardın absorbansı 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 absorbansları bu grafikten yararlanılarak hesaplandı. Sonuçlar mg/mL olarak verildi.

III. 4. NİTRİK OKSİD ÖLÇÜMÜ

Deneyin Prensipleri: Vücutta endojen olarak üretilen nitrik oksit doku ve vücut sıvılarındaki konsantrasyonu, pek çok çalışmada nitrit ve nitrat olarak ifade edilmiştir. (123). Çünkü nitrik oksit, üretildiği bölgede saniyeler içinde okside olarak önce nitrite (NO_2^-) daha sonra da nitrate (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. (124)

Dokularda nitrit ve nitrat miktarı deproteinizasyondan sonra Griess reaksiyonu ile belirlenir (125). 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 CuSO_4 solüsyonu hazırlandı.

Standart Solüsyonu: 0.1 mol/L NaNO_2 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.

Kadmilyum granüllerinin aktive edilmesi: Kadmilyum 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 kadmilyum 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 kadmilyum 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 (µmol/L) "

grafiği ile numune sonuçları hesaplanır. Elde edilen değerler doku protein değerlerine bölünerek sonuçlar $\mu\text{mol}/\text{gr}$ protein olarak verildi.

III.V. MYELOPEROKSİDAZ ÖLÇÜMÜ

Deneyin Prensibi: Myeloperoksidaz enziminin aktivitesi MPO aracılı H_2O_2 ile yapılan oksidasyon için substrat olarak 4-aminoantipyrin/phenol solusyonu kullanılarak yapıldı (126).

1 enzim ünitesi, 25°C ' de 1dakika $1\mu\text{mol}$ H_2O_2 ' yi harcayan enzim olarak ifade edildi.

Kullanılan Kimyasal Maddeler: 4-aminoantipyrine, phenol, H_2O_2

Kullanılan Reaktifler:

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

Solüsyon 2: 1.7mM %30' luk H_2O_2

Deneyin Yapılışı

	Numune
Solüsyon 1	1.3mL
Solüsyon 2	1.5mL

Vortekslenir, 3 dakika beklenir.

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

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

Hesaplama

$$\text{Sonuç } \dot{U}/L = [\Delta \text{OD} / \Delta t (\text{dakika}) \times (3/0.2)] \times F$$

1 enzim ünitesi (\dot{U}); 25°C ' de 1 dakikada $1\mu\text{mol}$ H_2O_2 ' yi harcayan enzim miktarıdır. Elde edilen değerler doku protein değerlerine bölünerek sonuçlar U/gr protein olarak verilmiştir.

III. 8. KSANTİN OKSİDAZ ÖLÇÜMÜ

Deneyin yapılışı: Ksantin oksidaz aktivitesi, numunede bulunduğu farzedilen ksantin oksidazın ortamdaki ksantinden ürik asit oluşturması esasına dayanır. Oluşan ürik asit miktarı, % 100' lük triklor asetik asit TCA solüsyonunun eklenmesi ile sabitlenir. Spektrofotometrede 293nm dalga boyunda absorbands değerleri ölçülerek 30 dakika içinde üretilen ürik asit miktarı belirlenir (127).

Kullanılan Reaktifler:

1. Fosfat tampon: 50 mM, pH7.5.
2. 4 mM ksantin
3. % 100 Triklor asetik asit
4. Ürik Asit Stok solüsyonu: 10 mikromol (16.8 mg ü asit alındı 10 ml ye tamamlandı).
5. Ürik Asit Standart solüsyonu: 500 mikromol (0.5mL stok solüsyonu alındı 10 mL ye tamamlandı).

Deneyin yapılışı:

	Numune körü	Numune	Stand. Körü	Standart
Tampon (mL)	2.8	2.8	2.85	2.8
Ksantin (µL)	50	50	50	50
Numune (µL)	-	50	-	-
Standart (µL)	-	-	-	50

30 dk. 37⁰C' de inkübe edildi

Numune (µL)	50	-	-	-
TCA (mL)	0.10	0.10	0.10	0.10

İlave edilerek vortekslendi

4000 rpm' de 45 dakika santrifüj sonrasında elde edilen süpernatantların absorbandsları 293 nm dalga boyunda okundu. Sonuçlar absorbands-ürik asit standart konsantrasyon grafiğinden yararlanılarak hesaplandı. Elde edilen değerler doku protein değerlerine bölünerek sonuçlar U/ mg protein olarak verilmiştir.

III.4. SÜPEROKSİD DİSMUTAZ ENZİM ÖLÇÜMÜ

Deneyin prensibi: Ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin, nitro blue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi esasına dayanır(128,129). Oluşan süperoksit radikalleri ($O_2^{\cdot-}$) ortamdaki NBT' yi indirgeyerek renkli formazon bileşiği oluşturur ve bu kompleks 560 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir. Enzimin olmadığı ortamda bu indirgeme maksimum olup, mavi-mor renk oluşumu belirgin izlenir. Ortamda SOD bulunması, süperoksit radikalini dismute edeceğinden NBT' nin indirgenmesi azalır ve renkli formazon oluşumu enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak inhibe olur. Enzim bulunmayan (kör) değer ile enzim bulunan numune absorbans değerleri hesaba katılır.

Kullanılan kimyasal maddeler: Ksantin, EDTA, nitroblue tetrazolium(NBT), Na_2CO_3 , bovine serum albumin, (BSA), $CuCl_2$, ksantin oksidaz.

Kullanılan reaktifler:

1. Assay Reaktifi: 0.3 mmol/L ksantin, 0.6mmol/L EDTA, 150 μ mol/L NBT, 400mmol/L Na_2CO_3 , 1gr/L bovine serum albumin koyu renk cam şişede köpürtülmeden birleştirildi. 2-8 $^{\circ}C$ ' de 2 ay saklanabilir.
2. 0.8 mmol/L $CuCl_2$
3. 400 Ü/L Ksantin oksidaz

Deneyin yapılışı:

	Kör(mL)	Numune(mL)
Assay reaktifi	2.85	2.85
Ekstrakt(etanol fazı)	-	0.1
Bidistile su	0.1	-
XO	0.05	0.05

Enzim ilavesi ile tüpler hemen alt üst edilerek inkübasyon süresi başlatıldı. 25 $^{\circ}C$ ' de 20 dakika inkübasyondan hemen sonra;

$CuCl_2$	1	1
----------	---	---

İlavesi ile reaksiyon durdurulur.

Distile suya karşı körden başlanarak numuneler 560nm' de spektrofotometrede okundu.

Hesaplama:

Enzimin % inhibisyonu= (Abs. kör-Abs. Numune)/Abs.kör x 100

Bir SOD ünitesi; NBT redüksiyonunu %50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir.

%50 inhibisyon= (% inhibisyon/50)x1/0.1=Ü/mL= Spesifik Aktivite(SA)

Elde edilen değerler doku protein değerlerine bölünerek sonuçlar U/ mg protein olarak ifade edildi.

III. 7. GLUTATYON PEROKSİDAZ (GSH-PX) ENZİMİNİN AKTİVİTE TAYİNİ

Deneyin Prensipleri: Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksit(H_2O_2) varlığında redükte glutasyonun (GSH) okside glutatona (GSSG) yükseltgenmesini katalizler. Hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda GSH-Px' in oluşturduğu GSSG, glutasyon redüktazve NADPH yardımı ile GSH' a indirgenir. GSH-Px aktivitesi NADPH' ın $NADP^{+}$ 'ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının okunması ile hesaplanır (130).

Kullanılan reaktifler:

1. GSH-Px Tamponu: PH 7, 50 mM Fosfat tamponu ve 5 mM EDTA içerir
2. 150 mM redükte Glutasyon (GSH)
3. 8 mM redükte NADPH
4. GSH-Redüktaz enzimi
5. 2 mM Hidrojen peroksit

Deneyin Yapılışı:

	mL
Fosfat tamponu	2.650
Redükte glutasyon	0.100
NADPH	0.100
GSH-Redüktaz	0.010
NaN_3	0.010
Numune	0.020

30 dakika oda ısısında inkübasyon

H ₂ O ₂	0.100
-------------------------------	-------

Dalga boyu 340 nm' ye ayarlanmış spektrofotometrede numunelerin absorbans değerleri kaydedildi. Lineer aktivite azalışının olduğu 2-3. dakikalardaki absorbans değişikliği esas alınarak hesap yapıldı.

Hesap:

Enzim ünitesi: Birim zamanda okside olan NADPH' in mikromol miktarıdır.

$$IU/L = [(\Delta Abs/t) / 6.22 \times 10^{-6}] \times (1 / 0.02)$$

Elde edilen değerler doku protein değerlerine bölünerek sonuçlar

IU/ mg protein olarak verilmiştir.

III.8. 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.

IV. BULGULAR

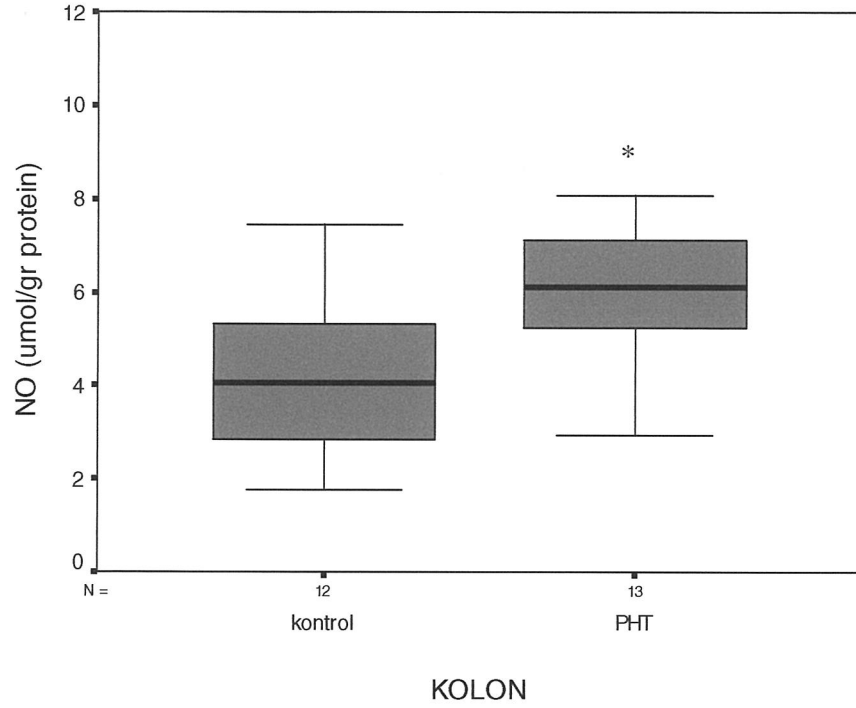
Bu çalışmada kontrol grubu (Grup 1) ve portal hipertansiyon oluşturulmuş grup (Grup 2) olmak üzere toplam iki grup üzerinde çalışıldı. Her iki grubun kolon, ince barsak ve pankreas dokuları alınarak, her dokuda nitrik oksit(NO), myeloperoksidaz (MPO), ksantin oksidaz (XO), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) düzeyleri araştırıldı.

IV.1.KOLON DOKUSU SONUÇLARI

Kolon dokusunda NO, MPO, XO, SOD, GSH-Px düzeyleri araştırılmış ve sonuçları Tablo-6 ve Grafik-1,2,3,4,5' de verilmiştir.

Tablo 6. Kolon dokusu sonuçları (ortalama \pm SD)

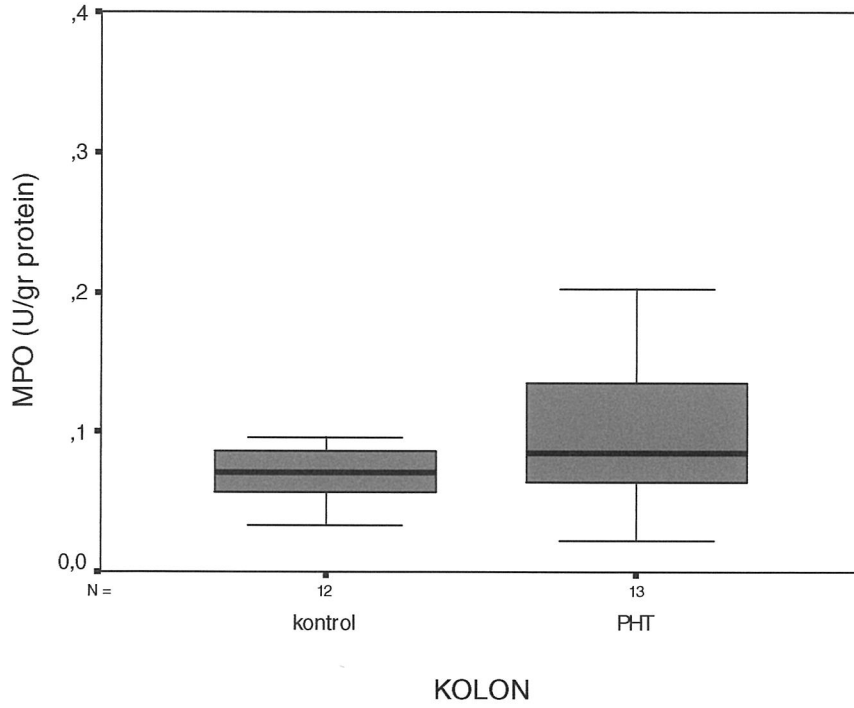
	Kontrol (n= 12)	Portal hipertansiyon (n= 13)	Gruplar arası farklılık (p)
NO (μ mol/gr protein)	4.29 \pm 1.83	6.19 \pm 1.80	0.019
MPO (U/gr protein)	0.077 \pm 0.035	0.11 \pm 0.077	0.180
XO (U/mg protein)	2.02 \pm 1.04	1.76 \pm 0.62	0.570
SOD (U/mg protein)	1.13 \pm 0.68	0.77 \pm 0.23	0.650
GSH-Px (IU/mg protein)	126.08 \pm 19.73	132.25 \pm 21,74	0.225



*p < 0.05

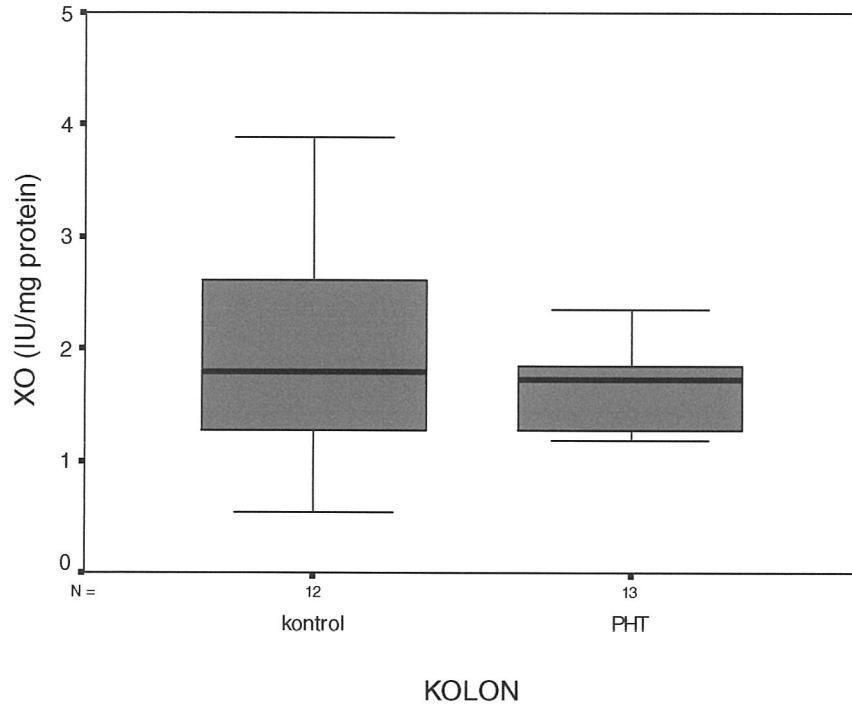
Grafik-1. Kolon dokusundaki NO düzeyleri

Kolon dokusu NO değerleri incelendiğinde, portal hipertansiyon oluşturulan grup 2 'de kontrol grubu olan grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek olarak saptanmıştır. (Tablo-6, Grafik-1)



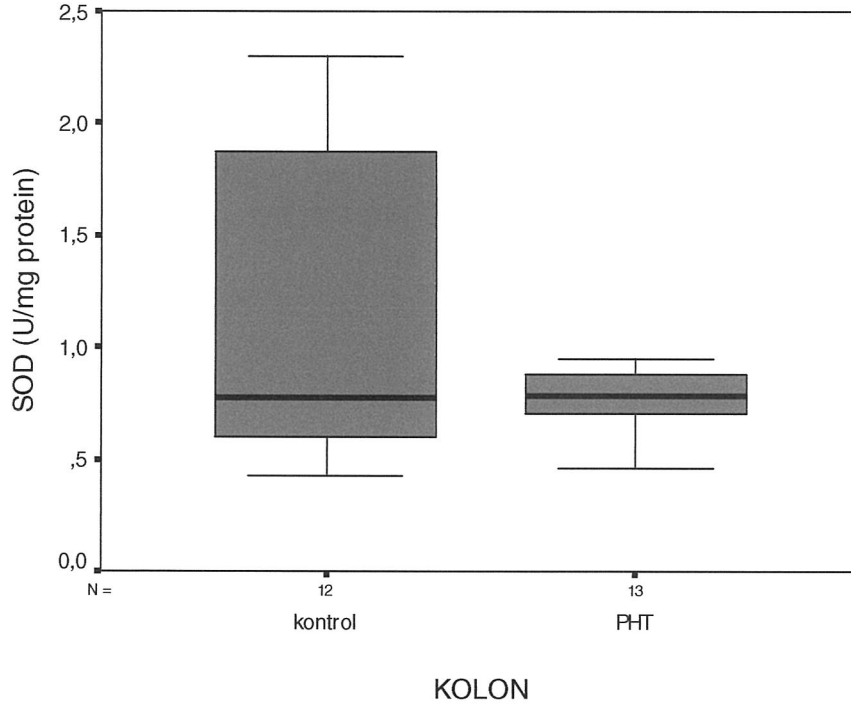
Grafik-2. Kolon dokusundaki MPO düzeyleri

Kolon dokusu MPO değerleri incelendiğinde, portal hipertansiyon oluşturulan grup 2 'de kontrol grubu olan grup 1'e göre daha yüksek olduğu fakat bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. (Tablo-6, Grafik-2)



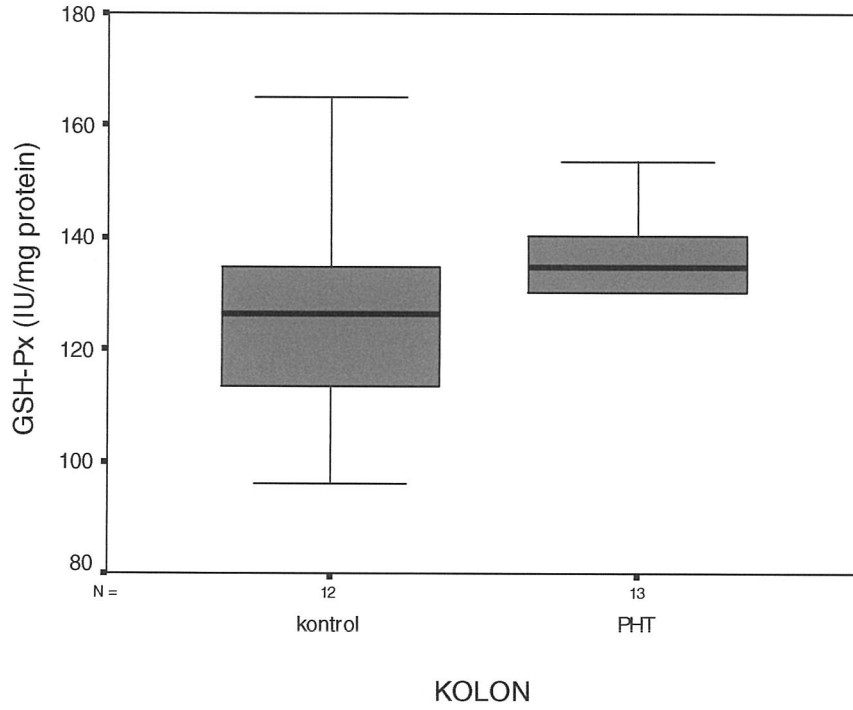
Grafik-3. Kolon dokusundaki XO düzeyleri

Kolon dokusu XO değerleri incelendiğinde, portal hipertansiyon oluşturulan grup 2 'de Kontrol grubu olan grup 1'e göre daha düşük olduğu fakat bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. (Tablo-6, Grafik-3)



Grafik-4. Kolon dokusundaki SOD düzeyleri

Kolon dokusu SOD değerleri incelendiğinde, portal hipertansiyon oluşturulan grup 2 'de kontrol grubu olan grup 1'e göre daha düşük olduğu fakat bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. (Tablo-6, Grafik-4)



Grafik-5. Kolon dokusundaki GSH-Px düzeyleri

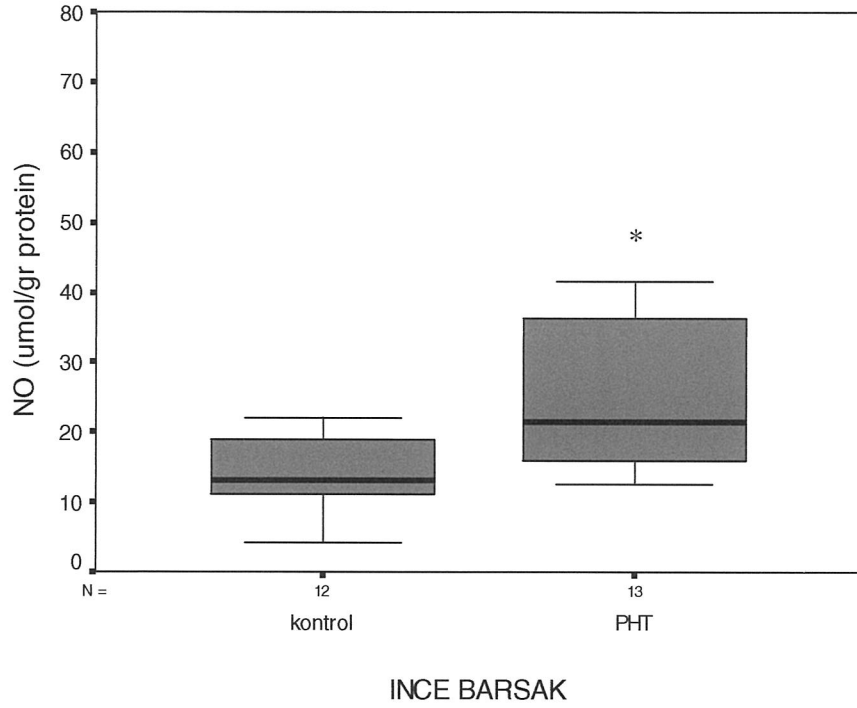
Kolon dokusu GSH-Px değerleri incelendiğinde, portal hipertansiyon oluşturulan grup 2 'de kontrol grubu olan grup 1'e göre daha yüksek olduğu fakat bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. (Tablo-6, grafik-5)

IV.2. İNCE BARSAK DOKUSU SONUÇLARI

İnce barsak dokusunda NO, MPO, XO, SOD, GSH-Px düzeyleri araştırılmış ve sonuçları Tablo 7 ve Grafik 6, 7, 8, 9, 10 da verilmiştir.

Tablo 7. İnce barsak dokusu sonuçları (ortalama \pm SD)

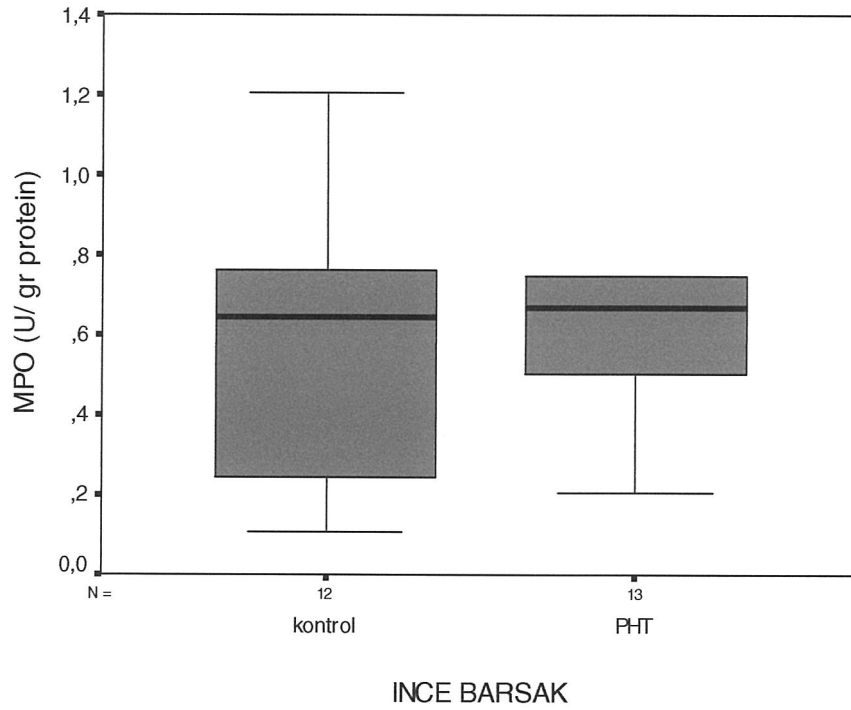
	Kontrol (n= 12)	Portal hipertansiyon (n= 13)	Gruplar arası farklılık (p)
NO (μ mol/gr protein)	16.12 \pm 9.12	27.41 \pm 15.68	0.016
MPO (U/gr protein)	0.58 \pm 0.35	0.67 \pm 0.30	0.500
XO (U/mg protein)	7.43 \pm 3.28	9.75 \pm 2.61	0.060
SOD (U/mg protein)	1.67 \pm 1.06	1.58 \pm 0.99	0.760
GSH-Px (IU/mg protein)	146.76 \pm 55.11	142.11 \pm 40.65	0.530



* $p < 0,05$

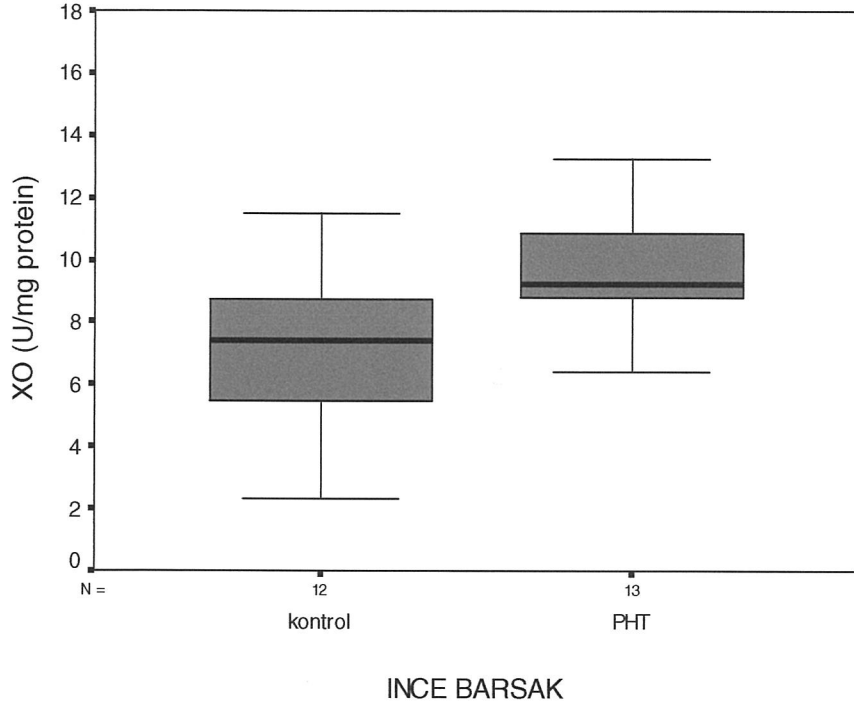
Grafik-6. İnce barsak dokusundaki NO düzeyleri

İnce barsak dokusu NO değerleri incelendiğinde, portal hipertansiyon oluşturulan grup 2 'nin NO düzeylerinin, kontrol grubu olan grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu saptanmıştır. ($p=0.016$) (Tablo 2, grafik-1)



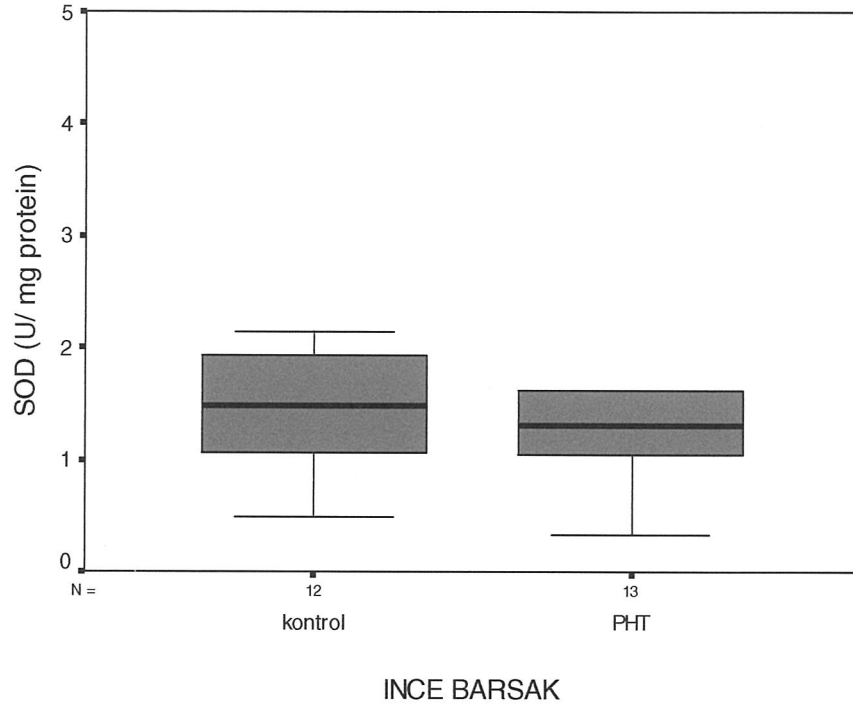
Grafik-7. İnce barsak dokusundaki MPO düzeyleri

İnce barsak dokusu MPO değerleri incelendiğinde, portal hipertansiyon oluşturulan grup 2 'nin MPO düzeylerinin, kontrol grubu olan grup 1'e göre daha yüksek olduğu fakat bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. (Tablo 7, grafik 2)



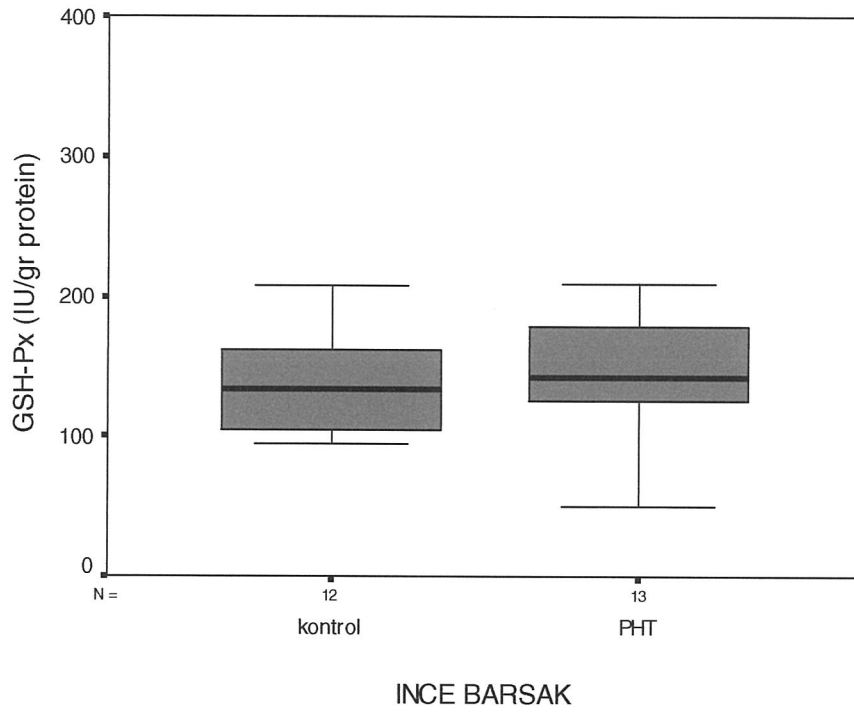
Grafik-8. İnce barsak dokusundaki XO düzeyleri

İnce barsak dokusu XO değerleri incelendiğinde, portal hipertansiyon oluşturulan grup 2 'nin XO düzeylerinin, kontrol grubu olan grup 1'e göre daha yüksek olduğu fakat bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. (Tablo 7, grafik 3)



Grafik-9. İnce barsak dokusundaki SOD düzeyleri

İnce barsak dokusu SOD değerleri incelendiğinde, portal hipertansiyon oluşturulan grup 2' nin SOD düzeylerinin, kontrol grubu olan grup 1'e göre daha düşük olduğu fakat bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. (Tablo 7, grafik 4)



Grafik-10. İnce barsak dokusundaki GSH-Px düzeyleri

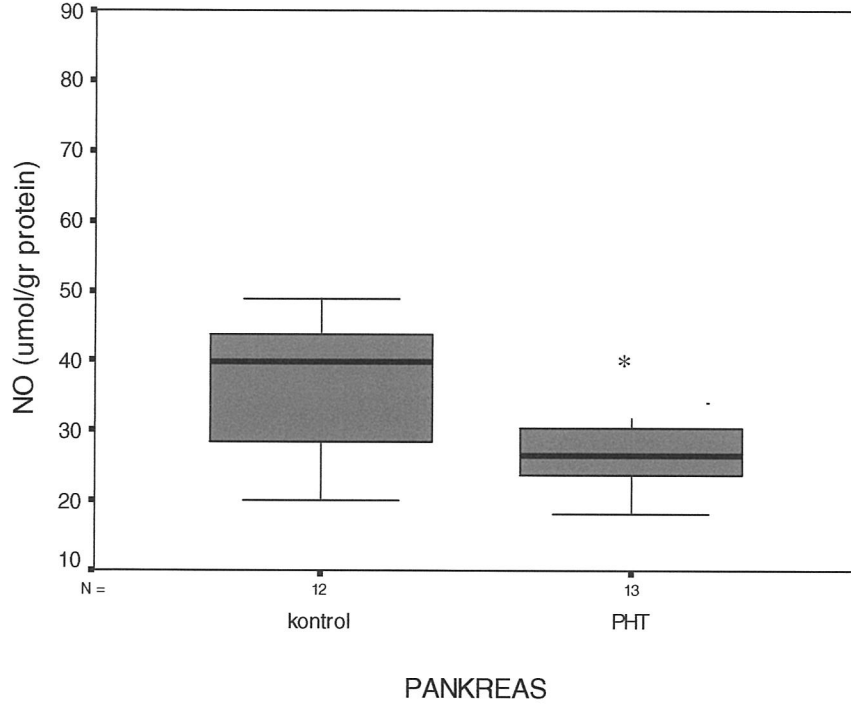
İnce barsak dokusu GSH-Px değerleri incelendiğinde, portal hipertansiyon oluşturulan grup 2 'nin GSH-Px düzeylerinin, kontrol grubu olan grup 1'e göre daha yüksek olduğu fakat bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. (Tablo-7, Grafik-10)

IV.3. PANKREAS DOKUSU SONUÇLARI

Pankreas dokusunda NO, MPO, XO, SOD, GSH-Px düzeyleri araştırılmış ve sonuçları Tablo 8 ve Grafik 11, 12, 13, 14, 15 de verilmiştir.

Tablo 8. Pankreas dokusu sonuçları (ortalama \pm SD)

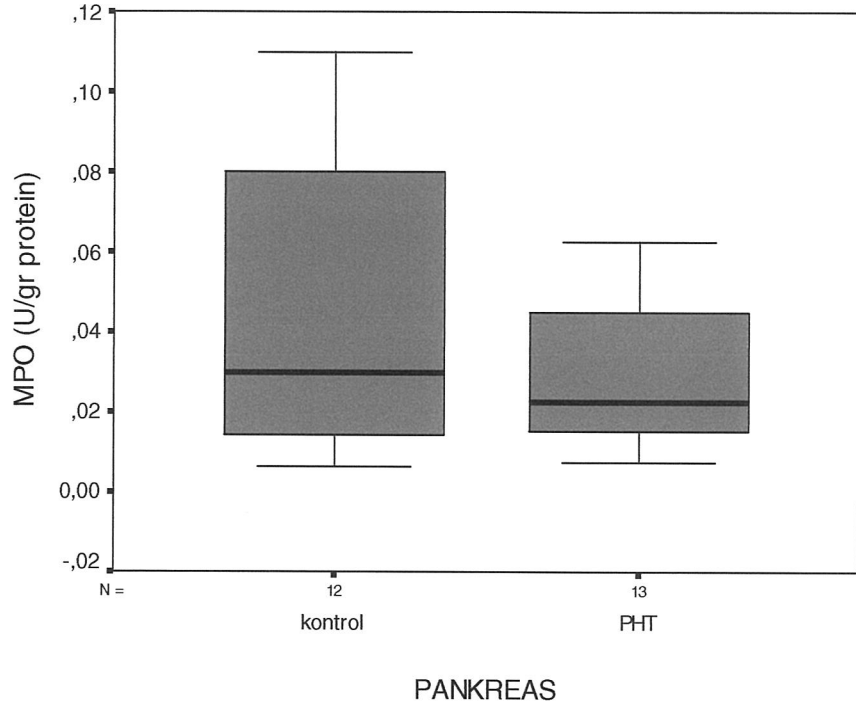
	Kontrol (n= 12)	Portal hipertansiyon (n= 13)	Gruplar arası farklılık (p)
NO (μ mol/gr protein)	39.11 \pm 14.83	27.61 \pm 7.05	0.022
MPO (U/gr protein)	0.045 \pm 0.037	0.037 \pm 0.030	0.810
XO (U/mg protein)	1.32 \pm 0.47	1.56 \pm 0.67	0.610
SOD (U/mg protein)	0.57 \pm 0.16	0.15 \pm 0.04	0.000
GSH-Px (IU/mg protein)	84.03 \pm 33.60	41.9 \pm 13.22	0.000



* p<0.05

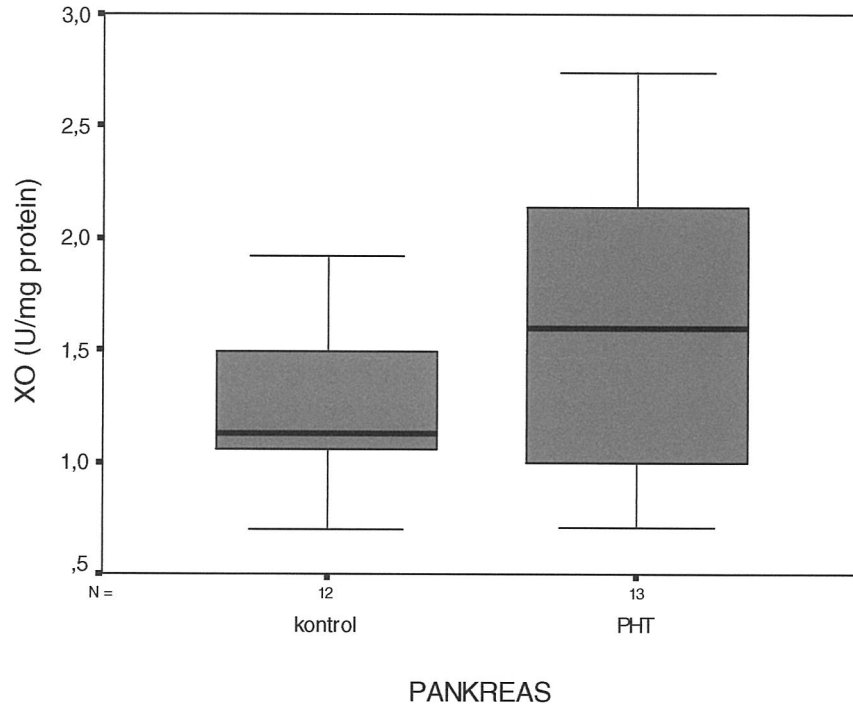
Grafik-11. Pankreas dokusundaki NO düzeyleri

Pankreas dokusu NO değerleri incelendiğinde, portal hipertansiyon oluşturulan grup 2 'nin NO düzeylerinin, kontrol grubu olan grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu saptanmıştır. (p=0.022) (Tablo-8, grafik-11).



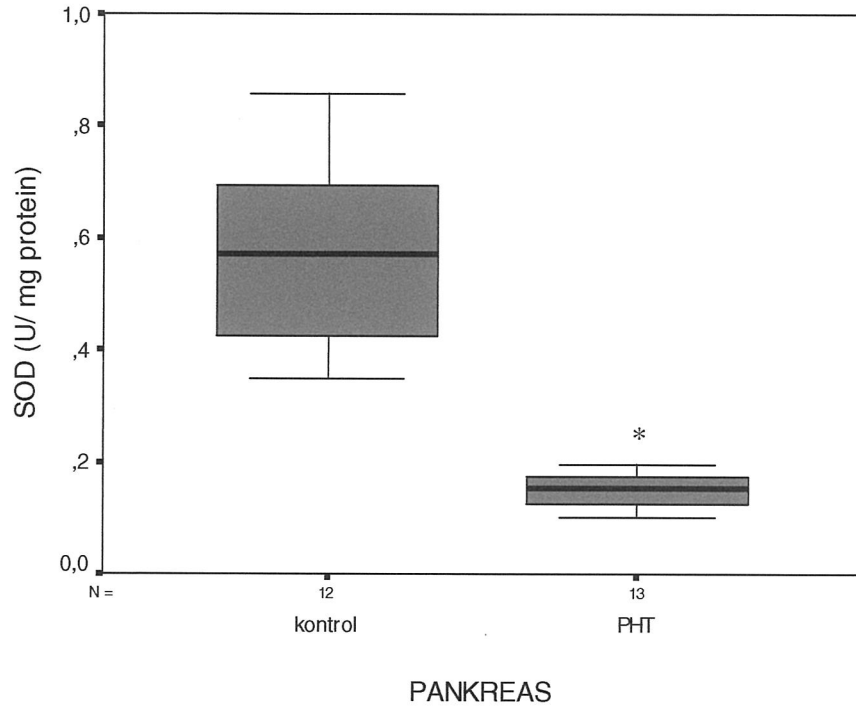
Grafik-12. Pankreas dokusundaki MPO düzeyleri

Pankreas dokusu MPO değerleri incelendiğinde, portal hipertansiyon oluşturulan grup 2 'nin MPO düzeylerinin, kontrol grubu olan grup 1'e göre daha düşük olduğu fakat bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. (Tablo-8, Grafik-12)



Grafik-13. Pankreas dokusundaki XO düzeyleri

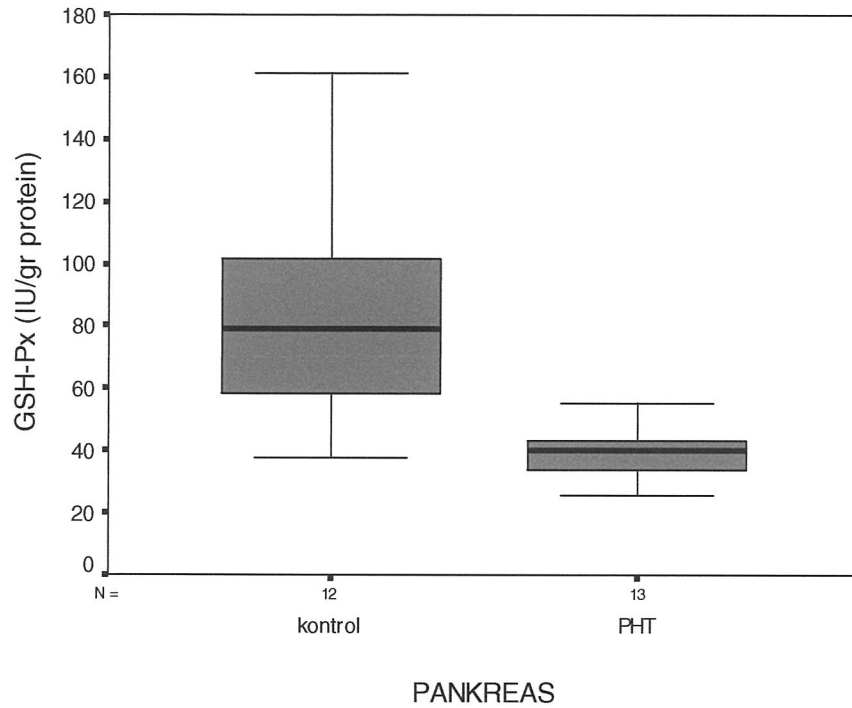
Pankreas dokusu XO değerleri incelendiğinde, portal hipertansiyon oluşturulan grup 2 'nin XO düzeylerinin, kontrol grubu olan grup 1'e göre daha yüksek olduğu fakat bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. (Tablo-8, grafik-13)



*p < 0.0001

Grafik-14. Pankreas dokusundaki SOD düzeyleri

Pankreas dokusu SOD değerleri incelendiğinde, portal hipertansiyon oluşturulan grup 2 'nin SOD düzeylerinin, kontrol grubu olan grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu saptanmıştır. (p=0.000) (Tablo-8, grafik-14)



*p < 0.0001

Grafik-15. Pankreas dokusundaki GSH-Px düzeyleri

Pankreas dokusu GSH-Px değerleri incelendiğinde, portal hipertansiyon oluşturulan grup 2 'nin GSH-Px düzeylerinin, kontrol grubu olan grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu saptanmıştır. (p=0.000) (Tablo- 8, grafik-15)

V. TARTIŞMA

Portal hipertansiyon, hemodinamik değişikliklerle karakterize olup, siroz'un en önemli komplikasyonlarından biridir. Etyolojisinde 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).

Gerek portal hipertansiyonun gerekse portal hipertansif gastropatinin patogenezi için ileri sürülen faktörlerin hiç biri tek başına yeterli değildir. Muhtemelen portal hipertansif gastropati patogenezi multifaktöryel bir olaydır.(23-25)

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).

Son 10 yılda portal hipertansiyon ile intestinal sirkülasyon değişiklikleri arasındaki ilişkinin ortaya çıkarılması ile ilgili bilgiler artmıştır. Mukozal biopsiler ve endoskopik örneklemeler ile yapılan çalışmalarda temel patolojik değişikliğin vaskülopati olduğu saptanmıştır. Bu hastalarda görülen çeşitli karakteristik lezyonlar portal hipertansif intestinal vaskülopati olarak yorumlanmaktadır (20).

Portal hipertansif kolopati, portal hipertansiyon gelişmiş olan hastalarda kolon,rektum ve anüste görülen ve çeşitli karakteristik lezyonların eşlik ettiği bir antitedir. Mukozal eritem, kolorektal varisler ve hemoroidler tanımlanmıştır (29). Mikrosirkülasyonda belirgin dilatasyon ,mukoza ve submukozada ödem vardır ve inflamasyon nadiren görülür. Mukozal inflamasyon olmadan ,bazal membran kalınlaşması ile birlikte dilate mukozal

kapillerlerin oluşumu portal hipertansiyonda spesifik olan diğer kolon mukoza değişiklikleridir.(20,30)

Yapılan kaynak taramalarında portal hipertansiyonda değişen splanknik kan akımı ile kolon ve pankreas gibi organlarda oksidatif hasarın varlığının gösterilmesi ile ilgili bir çalışma saptanamamıştır. Klinik uygulamalarda yeni kavramların önünü açabilmesi amacıyla bu deneysel çalışmada parsiyel portal ven ligasyonu ile ekstrahepatik portal hipertansiyon oluşturulmuş ratların ince barsak, kolon ve pankreas dokularında oksidatif hasarın ortaya konması amaçlanmıştır.

Bu amaçla, kolon, ince barsak ve pankreas dokularında nitrik oksid, myeloperoksidaz, ksantin oksidaz, süperoksid dismutaz ve glutatyon peroksidaz düzeyleri ölçülmüştür.

V.1. NİTRİK OKSİD VE PORTAL HİPERTANSİYON

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). Portal ven stenozlu rat modelinde Benoit ve Granger; glukagonun barsaktaki vasküler dirençteki düşüşün yaklaşık % 40'ından ve portal hipertansiyonda hiperemik yanıtında % 30'undan sorumlu olduğunu göstermişlerdir (14). Vazodilatasyonun diğer mediatörleri; nitrik oksit, adenozin, safra asitleri, prostoglandinler, bradikinin ve endotoksinlerdir (12,14-16,131).

Ratlar üzerinde yapılan bazı deneysel çalışmalarda portal hipertansiyonda görülen hiperdinamik durumun ve splanknik sirkülasyon değişikliklerinin artmış nitrik oksid formasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (132,133)

Shams ve arkadaşları (134), 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 (135) portal hipertansiyon oluşturulmuş ratların portal venlerinde ve sistemik dolaşımlarında artmış nitrik oksit düzeyleri tespit etmişlerdir.

Portal hipertansif gastropatili ratlarda Lee ve arkadaşları (136), artmış nitrik oksid ve prostaglandin düzeylerinin gastrik mukozal kan akımı üzerinde önemli rol oynadığını bildirmişlerdir.

Yu ve arkadaşlarının (137) yaptıkları çalışma sonucunda ise artmış nitrik oksid düzeylerinin portal hipertansif enteropatili ratların kolon dokularındaki mukozal lezyonların ve sirotik portal hipertansif enteropatili ratların vasküler lezyonları üzerinde etkili olabileceği gösterilmiştir.

Bizler de bu çalışmamızda portal hipertansiyon yapılmış ratların ince barsak ($p=0.016$) ve kolon ($p=0.019$) dokularında nitrik oksid düzeylerini anlamlı olarak artmış bulduk. Bu bulgularımız diğer araştırmacıların sonuçlarını desteklemektedir. Ancak portal hipertansif grubun pankreas dokusunda nitrik oksid düzeyleri düşük saptandı ($p=0.022$). Pankreasın endokrin ve egzokrin bezlerden zengin olması, ayrıca portal hipertansiyonda glukagonun birincil vazodilatör etken olarak pankreastan salgılanması nitrik oksid düzeylerinde pankreasta lokal bir inhibisyon yapmış olabilir. Buna rağmen portal hipertansiyonun pankreas üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalar henüz yeterli düzeyde değildir. Bu konuda daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

V.2. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ; KSANTİN OKSİDAZ, MYELOPEROKSİDAZ VE PORTAL HİPERTANSİYON

Portal hipertansiyonda ince barsak dokusunda bakteriyel translokasyonda artış olduğu bilinmektedir.

Hashimoto ve arkadaşları (138), portal hipertansiyonun barsak mukozası üzerine olan etkilerini incelemişler ve sirozda barsak lümeninde bakterilerin artmış olduğunu ve bu bakterilerin barsak lümeninden lenf nodlarına geçerek spontan enfeksiyonlar oluşturduğunu göstermişlerdir

Wang ve arkadaşları (139), yaptıkları çalışmada portal ven obstrüksiyonu olan ratlarda barsak bakteri düzeylerinin artmış olduğunu ve bu durum ile gastrointestinal motilite arasında bir ilişki bulunduğunu göstermişlerdir.

Bakteriyel translokasyona yanıt olarak nötrofil infiltrasyonu meydana gelir. Aktive olan nötrofillerden salgılanan MPO ortamdaki H_2O_2 ve Cl iyonlarını hipokloröz asite kataliz ederek bakterisidal etkiye katkıda bulunur. Oluşan hipokloröz asit doku üzerine toksik etkileri olan güçlü bir radikaldir.

Portal hipertansif ratların ince barsak dokularında myeloperoksidaz düzeylerinin ve lipid peroksidasyonunu arttığı ve bu durumun allopürinol ile inhibe olduğu gösterilmiştir (140).

Serbest oksijen radikallerinin diğer bir oluşum kaynağının da ksantin ve ksantin oksidaz sistemi olduğu bilinmektedir. Bu sistemde oluşan O_2^- , ince barsak duvarında hasar oluşturan lipid peroksidasyonunu arttırmaktadır(141).

Ueda ve arkadaşları (7), portal ven oklüzyonu sonucunda ince barsak dokusunda özellikle ksantin oksidaz , semikinon radikalleri ve paramanyetik metal demirleri olmak üzere serbest radikallerin arttığını ve bunun sonucu oluşan lipid peroksidasyonunun ince barsaklarda hasar oluşturduğunu göstermiştir.

Ramachandran ve arkadaşlarının (142) yaptığı diğer bir çalışmada portal hipertansiyonun önemli bir komplikasyonu olan sirozda ince barsak dokusunda ksantin oksidaz düzeyleri yüksek olarak bulunmuştur.

Yapılan bir diğer çalışmada portal hipertansif ratların ince barsaklarında artmış ksantin dehidrogenaz ve ksantin oksidaz düzeylerinin, barsak bariyerinde yetersizliğe yol açarak bakteriyel translokasyona neden olduğunu göstermişlerdir (143). Bu olay MPO düzeylerinin artmasına katkıda bulunabilir.

Bizler bu çalışmamızda portal hipertansiyon oluşturulmuş ratların ince barsak ve kolon dokularında MPO düzeylerini kontrol grubuna göre daha yüksek bulduk. Fakat bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı değildi. Portal hipertansiyonda muhtemelen hemodinamik dolaşım bozukluğuna sekonder olarak artan bakteriyel translokasyon ve bunun sonucunda oluşan nötrofil

kemotaksisi artan MPO düzeylerini açıklayabilir. İncebarsak ve kolonda görülen MPO aktivite artışı pankreatik dokuda saptanamamıştır. Bu bize portal hipertansif pankreas dokusunda nötrofil infiltrasyonunun bulunmadığını, dolayısı ile bir inflamatuvar yanıtın olmadığını göstermektedir.

Bu çalışmada portal hipertansiyon oluşturulmuş grupta ince barsak dokusunda ksantin oksidaz düzeyleri yüksek bulundu fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi. Portal hipertansiyonda karaciğerin metabolik işlevlerinde disfonksiyon meydana gelmekte, özellikle protein sentezinin bozulması ile hipoproteinemi ve hipoalbüminemi oluşmaktadır. Bunun sonucunda diğer dokulardaki protein yıkımındaki artış sonucu ksantin ve ksantin oksidaz sistemini aktive olur. Ksantin, ksantin oksidaz enziminin katalizi ile ürik aside dönüşümü süperoksid anyonun oluşumunu arttırmaktadır. Artmış süperoksid anyonu ince barsakta lipid peroksidasyonuna yol açarak ince barsak ve pankreas dokularında harabiyete yol açmaktadır. Bu da portal hipertansiyonda barsak dokusunda artmış myeloperoksidaz düzeyleri ile birlikte görülen spontan bakteriyel enfeksiyonların bir nedeni olabileceğini düşündürmektedir. Bulduğumuz artmış ksantin oksidaz seviyelerinin varlığı portal hipertansif enteropatının histopatolojik bulgularını desteklemektedir.

Ancak literatürlerde pankreas dokusunda oksijen radikallerinin düzeylerini araştıran çalışmalar bulunmamaktadır. Biz pankreas dokusunda ksantin oksidaz düzeylerini artmış, olarak bulduk. Bunu portal hipertansiyonun pankreasta daha az hasara neden olduğu, bu yüzden de serbest radikal oluşumunun erken basamakları üzerinde etkili olduğu şeklinde açıklayabiliriz.

V.3. ANTİOKSİDAN ENZİMLER VE PORTAL HİPERTANSİYON

Oksijenin reaktif metabolitlerinin organizmada doku hasarına neden olduğu bilinmektedir. Bu hasarlar, bir yada birkaç basamakta antioksidan savunma sistemleri ile engellenebilir. Antioksidan savunma sistemleri, oksidanları direk etki ile inaktif hale getiren bazı enzimler (örneğin; süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz

gibi) yada vitaminler (vitamin C, E gibi), bilirubin, serüloplazmin gibi bazı nonenzimatik moleküllerden oluşmaktadır.

Kaur ve arkadaşları (144) portal hipertansif gastropatili ratların mide dokularında superoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz düzeylerini azalmış olarak bulmuşlardır.

Yaptığımız çalışmada; ince barsak, kolon ve pankreas dokularında superoksid dismutaz, ince barsak ve pankreas dokularında glutatyon peroksidaz enzim aktiviteleri düşük bulundu. Pankreas dokusundaki düşüklük istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.001$). Kolon dokusunda glutatyon peroksidaz düzeyi bir miktar artmış olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.

Antioksidan savunma sistemlerindeki bu düşüklük portal hipertansiyonun akut bir olay olmayıp kronik bir sürece bağlı olmasından kaynaklanmış olabilir. Portal hipertansiyonda serbest radikallerin üretimindeki artış, dolaşım bozukluğu, birikmiş toksik metabolitler (amonyak gibi), protein sentezinin azalması gibi etkenler antioksidan enzim düzeylerindeki düşüklüğe katkıda bulunabilir.

Portal hipertansiyonun ince barsak, kolon ve pankreas dokularındaki antioksidan savunma sistemleri üzerine olan etkilerini açıklayabilmek için daha çok araştırma yapılmasına gereksinim olduğunu düşünmekteyiz.

VI. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu çalışmada; ince barsak ve kolon dokularında nitrik oksit düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. Bu durum portal hipertansiyonun hiperdinamik sirkülasyona bağlı etkilerini ve vazodilatasyona bağlı bulgularını açıklamaktadır. Pankreas dokusundaki nitrik oksit düzeylerinin anlamlı düşük olarak gözlenmesi, bu dokunun salgıladığı endokrin ve egzokrin maddelerin nitrik oksit üzerine yaptığı inhibisyonun sonucu olabilir.

İnce barsak dokusunda ksantin oksidaz düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir yükseklik bulunmaktadır. İnce barsak ksantin oksidaz düzeylerinde ve kolon ve ince barsak dokularındaki myeloperoksidaz düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı olmayan yüksekliğine bu dokularda oluşan bakteriyel translokasyonunun sonucunda ortaya çıkan serbest radikallerin neden olduğu düşünülmektedir.

İnce barsak, kolon superoksid dismutaz ve ince barsak glutatyon peroksidaz düzeyleri düşük olarak bulunmuştur. Her iki enzimin pankreas dokusundaki düzeyleri ise anlamlı olarak düşük gözlenmiştir. Antioksidan enzimlerdeki bu düşüklüğün sebebi, portal hipertansiyonun kronik bir süreç olması, birikmiş toksik metabolitler (amonyak gibi) ve azalmış protein sentezi olabilir.

Portal hipertansiyonda oksidatif stresin net olarak değerlendirilmesi için daha ileri araştırmalar yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

VII. ÖZET

PORTAL HİPERTANSİYON OLUŞTURULMUŞ RATLARDA, İNCE BAĞIRSAK, KOLON VE PANKREAS DOKULARINDA OKSİDATİF STRESİN ARAŞTIRILMASI

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

Bu çalışmada PHT' da, kolon, ince barsak ve pankreas dokularında oksidatif stresin 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 kolon, ince barsak ve pankreas dokuları çıkarıldı. Bu dokularda nitrik oksid (NO), myeloperoksidaz (MPO), ksantin oksidaz (XO), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Kolon ve ince barsakta PHT oluşturulmuş grupta NO düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı yüksek ($p<0.05$), pankreasta ise anlamlı düşük ($p<0.05$) olarak bulundu. Pankreasta PHT' lu grupta SOD ve GSH-Px düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşüktü ($p<0.0001$). Ayrıca PHT' lu grupta ince barsak ve kolon MPO, ince barsak ve pankreas XO enzim düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek; ince barsak, kolon SOD ve ince barsak GSH-Px enzim düzeyleri kontrol grubuna göre düşük olarak bulundu. Ancak sonuçlar istatistiksel olarak anlamsızdı.

Portal hipertansiyonun kolon, ince barsak ve pankreas dokularında serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemleri üzerine olan etkilerinin araştırılması için daha ileri çalışmalar yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

VIII. SUMMARY

OXIDATIVE STRESS MARKERS IN SMALL INTESTINE, COLON AND PANCREAS TISSUES OF RATS WITH PORTAL HYPERTENSION

Portal hypertension (PH) 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 PH. The aim of our study was to evaluate the changes in oxidative stress markers in small intestine, colon and pancreas tissues of rats with PH.

A total of 25 male Sprague-Dawley rats were assigned into two groups randomly. Group 1 rats (n=13) comprise the control group, whereas Group 2 rats (n=12) comprise PH group. PH was induced by the ligation of portal vein for 8 weeks. At the end of the experimental period, the above mentioned tissues were removed after decapitating the rats. Nitric Oxide (NO) levels and Myeloperoxidase (MPO), Xanthine Oxidase (XO), Superoxide Dismutase (SOD) and Glutathione Peroxidase (GSH-Px) activities were measured in these tissues spectrophotometrically. NO levels were found to be statistically increased in small intestine and colon tissues of PH group ($p<0.05$) when compared to controls. Whereas, NO levels of pancreas tissue were found to be statistically decreased in PH group ($p<0.05$). Pancreas SOD and GSH-Px activities in PH group were significantly different than those in controls ($p<0.0001$). Although small intestine and colon MPO activities and small intestine and pancreas XO activities in PH group were observed to be higher than those in controls and small intestine and colon SOD and small intestine GSH-Px activities in PH group were observed to be lower than those in controls, no statistical significance were detected.

As a conclusion, further studies are needed to clarify the role of PH on the production of free radicals and on antioxidant defense systems in small intestine, colon and pancreas.

IX. 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 fallowing 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. Snell R. Klinik Anatomi1998; 212-213.
10. Vorobioff J, Bredfeldt J, Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation in a portal hypertensive rat model:A primary factor for maintenance of chronic portal hypertension. Am. J. Physiol 1983; G52: 244-248.
11. Benoit J, Womack WA, Hernandez L. Forward and backward flow mechanizm of portal hypertension :Relativ contributions in the rat model of portal vein stenozis. Gastroenterolgy; 1985: 89:1092-1096.

12. Mac-Mathuna P, Westaby D, Williams R. Taking the tension out of the portal system: An approach to the management of portal hypertension in the 1990s. *Scand. J. Gastroenterol* 1990; 175:131-145.
13. Sherwin R, Joshi P, Hender R. Hyperglucagonemia in Laennec's cirrhosis. *N. Engl. J. Med* 1974; 290:239-246.
14. Benoit JN, Granger DN. Splanchnic hemodynamics in chronic portal hypertension. *Semin. Liver Dis.* 1986; 6: 287-298.
15. Carlson RE, Ehrenfeld WK. Recurrent variceal hemorrhage following successful Warren shunt. *Arch. Surg.* 1976; 111:587-591.
16. MacDougall BR., Westaby D., Blendis LA.: Portal hypertension--25 years of progress. *Gut* 1991; 9: (Suppl 1): 18-24.
17. Rikkers GM. New concepts of pathophysiology and treatment of portal hypertension. *Surgery* 1990. 107:481-489.
18. Shibayama Y, Nakata K. Localization of increased hepatic vascular resistance in liver cirrhosis *Hepatology* 1985; 5: 643-651.
19. Henderson JM. :Portal hypertension .*Cur. Prob. in Surg* 1998; 35: 271-278.
20. Viggiano TR, Gostout CJ. Portal hypertensive intestinal vasculopathy: a review of the clinical, endoscopic and histopathologic features. *Am. J. Gastroenterol* 1992; 87: 944-954
21. Hashizume M, Tanaka K, Mokucki K. Morphology of gastric microcirculation in cirrhosis. *Hepatology* 1983;3: 1008-1012.
22. McCormack TT, Sims J, Eyre-Brook I. et al. Gastric lesions in portal hypertension :Inflammatory gastritis or congestive gastropathy? *Gut* 1985; 26: 1226-32.
23. Ohta M, Hashizume M, Higashi H. et al. Portal and gastric mucosal hemodynamics in cirrhosis patients with portal hypertensive gastropathy. *Hepatology* 1994; 20: 1432-1436.

24. Bernstein DE, Phillips RS. Portal hypertensive gastropathy. *Gastrointest endosc Clin N Am* 1996; 6: 697-708.
25. Iwao T, Toyonaga A, Sumino M et al. Portal hypertensive gastropathy in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 1992;2: 2060-5.
26. Saperas E, Perez-Ayuso RM, Poca E, et al. Increased gastric PGE2 biosynthesis in cirrhotic patients with gastric vascular ectasias. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 138-44.
27. Minami T. Bleeding in portal hypertensive gastropathy evaluated in terms of gastric mucosal microcirculation and coagulation –fibrinolysis. *Kurume Med J* 1997; 44: 241-255.
28. Gupta R, Saraswat VA, Kumar M et al. Frequency and factors influencing portal hypertensive gastropathy and duodenopathy in cirrhotic portal hypertension. *J Gastroenterol Hepatol.* 1996; 11: 728-733.
29. Naveau S, Bedossa P, Poynard T, Morry B. Portal hypertensive colopathy. *Dig Dis and Sci.* 1991; 36: 1774-81.
30. Ponce Gonzales JF, Dominguez ALE, Zurita M , et al. Portal hypertensive colopathy: histologic appearance of the colonic mucosa. *Hepato-gastroenterology* 1998; 45: 40-43.
31. Cales P, Payen J, Berg P, et al. Colonic arterial spider in cirrhosis. *Gastrointest Endosc* 1991; 37: 589-90.
32. Yamakado S, Kanazawa H, Koyabashi M. Portal hypertensive colopathy: endoscopic findings and the relation to portal pressure. *Intern Med* 1995; 34: 153-157.
33. Misra V, Misra SP, Dwivedi M, Gupta SC. Histomorphometric study of portal hypertensive enteropathy. *Am J Clin Pathol* 1997; 108:652-659.
34. Nagral AS, Joshi AS, Bhatia SJ, et al. Congestive jejunopathy in portal hypertension. *Gut* 1993; 34: 694-697.
35. Thiruvengadam R, Gostout CJ. Congestive gastroenteropathy: an extension of nonvariceal upper gastrointestinal bleeding in portal hypertension. *Gastrointest Endosc.* 1989; 35: 504-507.

36. Onur E. Defibrotidin aterojenik diyet uygulanan tavşanlarda beyin ve böbrek serbest radikal ve antioksidanlara etkisi. Tıpta uzmanlık tezi, 1999.
37. Halliwell B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis* 1993; 23 (suppl. 1): 118-126.
38. Kurata M, Suzuki, M, Agar NS. Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals. *Comp. Biochem. Physiol.* 1993; 106(3): 477-487.
39. McCord J. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New England J. Med.* 1985; 213: 159-163.
40. 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.
41. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *Am. J. of Medicine* 1991; (suppl 3C): 145-215.
42. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *The New England J. of Medicine* 1985; 112: 159-163.
43. 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.
44. Bulkey GB. The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery* 1983; 94: 407-411.
45. 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.
46. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *Am. J. Med.* 1991; (suppl. 3C): 145-225.

47. Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1983; 23: 239-257.
48. Prasad K, Kalra J, Bharadwaj L. Cardiac depressant effects of oxygen free radicals. *Angiology-The Journal of Vascular Disease* 1993; 44: 257-269.
49. Onat T, Emerk K, Sözmen E. *İnsan biyokimyası* 2002; 666-674.
50. 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.
51. Freeman BA, Crepo JD. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 1982; 47: 412-426.
52. Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *Am. J. of Medicine* 1991; (suppl 3C): 235-295.
53. Guutteridge IMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 1995; 41: 1819-1828.
54. Siimic MG, Taylor KA. Introduction to peroxidation and antioxidation mechanisms. *Basic Life Sciences. Oxygen radicals in biology and medicine.* Plenum Press, New York 1988; 49: 1-10.
55. Murray K. Metabolism of xenobiotics. *Harper's Biochemistry.* Appleton & Lange, USA, 1993, 704-709.
56. Champe PC, Harve, RA. *Lippincot's Illustrated Reviews: Biochemistry.* 2nd Ed. 1994, 163-228, J. B. Lippincot Company, Philadelphia.
57. 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.
58. Mutaf I. *Eksperimental diyabette plazma ve doku lipid peroksidleri.* Tıpta uzmanlık tezi, 1990.

59. Demirpençe E, Köksoy C, Kuzu A, Kılınc K. A spectrophotometric assay for tissue-associated myeloperoxidase activity and application to intestinal ischemia-reperfusion. *Turk J Med Sci* 1997; 27: 197-200.
60. Winterbourn CC. Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. *Toxicology* 2002; 181-182; 223-227.
61. 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.
62. Rodrigues MR, Rodriguez D, Russo M; Campa A. Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 292: 869-873.
63. Harrison JE, Schultz. Studies on the Chlorinating Activity of Myeloperoxidase. *The Journal of Biological Chemistry* 1976; 251(5): 1371-1374.
64. 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.
65. Heinecke JW. Oxidative Stress: New Approaches to Diagnosis and Prognosis in Atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2003; 91 (Suppl): 12A-16A.
66. Carr AC, Mc Call MR, Frei B. Oxidation of LDL by Myeloperoxidase and Reactive Nitrogen Species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 1716-1723.
67. Furcghott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.
68. Furcghott RF, Khan MT, Jothianandan D. Comparison of properties of NO and EDRF: some controversial findings. Karger, Basel, Switzerland 1990; 8-21.

69. 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.
70. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factors. Nature 1987; 327: 524-526.
71. Koşay S. Nitrik oksidin tanımı. EÜTF ayın kitabı, 1996: 83, 1-6.
72. 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.
73. Whicher J, Biasucci L. Inflammation the acute phase response and atherosclerosis. Clin. Chem. Lab. Med. 1999; 37: 265-270.
74. Kharitonov VG. Kinetics of nitric oxide autoxidation in aqueous solution. J Biol. Chem. 1994; 269: 5881-5883.
75. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J 1992; 6: 3051-3064.
76. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. Science 1992; 26: 1898-1902.
77. Harrison DG, Inoue N. Modulation of endothelial cell nitric oxide synthase expression. J Jpn Circ 1996; 60: 815-821.
78. Bayındır O. Nitrik oksidin reaktivitesi, sentezi ve analiz metodları. EÜTF ayın kitabı 1996; 83: 14-21.
79. 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.

80. Freedman JE, Ting B. Impaired platelet production of nitric oxide predicts presence of acute coronary syndromes. *Circulation* 1998; 98: 1481-1486.
81. 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.
82. Freeman B. Free radical chemistry of nitric oxide. *Chest* 1994; 105 (Suppl 3): 79-84.
83. Shah AM. Inducible nitric oxide synthase and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research* 2000; 45: 148-155.
84. Shimokawa H, Flavahan NA. Natural course of endothelium removal in porcine coronary arteries. *Circulation Research* 1989; 65: 740-753.
85. 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.
86. Pique JM, Esplugues JV, Whittle BJ. Endogenous nitric oxide as a mediator of gastric mucosal vasodilation during acid secretion. *Gastroenterology* 1992; 102: 168-174.
87. Stark ME, Szurszewsky JH. Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function disease. *Gastroenterology* 1992; 103: 1928-1949.
88. Rattan S, Sarkar A, Chakder S. Nitric oxide pathway in rectoanal inhibitory reflex of opossum internal anal sphincter. *Gastroenterology* 1992; 103: 43-50.
89. Soydan I. Nitric oksidin hastalıklardaki fizyopatolojik rolü. Nitrik oksidin patolojik olaylardaki rolü; Ege Üniversitesi Basımevi, 1996
90. Kolb H, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: a pathogenic factor in an autoimmunity. *Immunol Tod.* 1992; 13:157.

91. Rumley AG, Paterson JR. Analytical aspects of antioxidants and free radical activity in clinical biochemistry. *Ann. Clin. Biochem* 1998;35: 181-200.
92. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants and human disease. Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* 1992; 119: 589-620.
93. Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 1996; 27: 1121-1128.
94. Wheeler CR, Salzman JA, Elsayed NM, Omaye ST, Korte DW. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, and glutathion reductase activity. *Anal. Biochem.* 1990; 184: 193-199.
95. Del Maestro R, McDonald W. Distribution of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in developing rat brain. *Mechanism of Aging and Development* 1987; 41: 24-38.
96. Radi R, Sims S, Cassina A, Turrens JF. Roles of catalase and cytochrome C in hydroperoxide-dependent lipid peroxidation and chemiluminescence in rat heart and kidney mitochondria. *Free Radical Biology & Medicine* 1993; 15: 653-659.
97. Ebersole BJ, Molinof PB. Inhibition of binding of (³H)PN200-110 to membranes from rat brain and heart by ascorbate is mediated by lipid peroxidation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 259(1): 337-344.
98. Sara Habif. Kalsiyum kanal blokerlerinin oksidan ve antioksidan savunma sistemlerine etkileri. *Tıpta Uzmanlık Tezi*, 1992.
99. Ji LL, Fu R. Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hidroperoxide. *Methods in Enzymology* 1990;186: 681-683.
100. Hughes H, Jaeschke H, Mitchel JR. Measurement of oxidant stress in vivo. *Methods in Enzymology* 1990; 186: 683-685.

101. Roberts JC, Francetic DJ. The importance of sample preparation and storage in glutathione analysis. *Anal. Biochem* 1993; 211: 183-187.
102. Halliwell B. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2nd ed. Clarendon Press Oxford, 1995.
103. Beutler E, Red cell metabolism. *A manual of biochemical methods*. Grune and Stratton Inc. Orlando, 1984; 74-76.
104. Mailer K, Del Maestro RF. Stability of the anti-oxidative enzymes in aqueous and detergent solution. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1991; 107: 47-54.
105. Milne DB. Trace elements. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 2nd Ed. W.B. Saunders Comp. Philadelphia, 1994: 1317-1353.
106. Fairbanks VF., Klee GG. Biochemical aspects of hematology. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 2nd Ed. W.B. Saunders Comp. Philadelphia, 1994, 1974-2072.
107. Perham RN, Scrutton NS, Berry A. New enzymes for old: Redesigning the coenzyme and substrate specific of glutathione reductase. *Bioassays* 1991; 10: 515-525.
108. Ermler V, Ghisla S, Massey V. Structural, spectroscopic and catalytic activity studies on glutathione reductase reconstituted with FAD analogues. *Eur. J. Biochem.* 1991; 199: 133-138.
109. Cenas NK, Rakauskiene GA. One- and two- electron reduction of quinones by glutathione reductase. *Biochim. Biophys. Acta* 1989; 973: 399-404.
110. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol* 1995; 30(6): 445-600.
111. Terrier P, Townsend AJ, Coindre JM, Triche TJ., Cowan KH. An immunohistochemical study of pi class glutathione S-transferase

- expression in normal human tissue. *Am.J. Pathol.* 1990; 137(4): 845-853.
112. Howie AF, Forrester LM, Glancey MJ, Schlager JJ. Glutathione S-transferase and glutathione peroxidase expression in normal and tumour human tissues. *Carcinogenesis* 1990; 11: 451-458.
113. Fazi A, Accorsi A, Piatti E, Magnani M. Cell age dependent decay of human erythrocytes glutathione S-transferase. *Mech. Ageing Dev.* 1991; 58(2-3): 255-266.
114. 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.
115. Rangan V, Bulkley GB. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *Brit. Med. Bull.* 1993; 49(3): 710-717.
116. Chojkier M, Groszmann RJ: Measurement of portal systemic shunting in the rat by using γ - labeled microspheres. *Am J Physiol* 1981;240:371-375.
117. 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.
118. 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.
119. 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.
120. Marshall JO. Portal hypertension and portocaval shunt. *Surgical Research* 2001;49:637-688.
121. Mehmetoğlu İ. *Klinik Biyokimya El Kitabı*. İnci ofset, 2002.

122. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
123. 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.
124. Malinsky T, Taha Z. Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature* 1992; 358: 676-678.
125. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990; 36: 1440- 1443.
126. Wei H, Frenkel K. In vivo formation of oxidised DNA bases in tumor promoter-treated Mouse skin. *Cancer Res* 1991; 51: 4443-4449.
127. Prajda N, Weber G, Malign transformation linked imbalance decreased XO activity in hepatomas. *FEBS Lett* 1975; 59: 245-249.
128. Sun Y, Oberly LW, Ying L. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
129. Durak I, Yurtaslan Z, Canbolat O, Akyol O. A methodological approach to superoxide dismutase activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium reduction. *Clin Chem Acta* 1993; 214: 103-104.
130. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erithrocyte glutathione peroxidase. *J Lab & Clin Med* 1967; 70: 158-169.
131. Merino UC. Nitric oxide in gastroenterology. *Rev Gastroenterol Peru* 1995; 15(Suppl 1): 101-104.
132. Pizcueta P, Pique JM, Fernandez M. Modulation of the hyperdynamic circulation of cirrhotic rats by nitric oxide inhibition. *Gastroenterology* 1992; 103 (6): 1909-1915.

133. 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.
134. 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.
135. 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.
136. Le Q, Zhang J, Xu Q. Effects of nitric oxide and prostaglandin on gastric mucosal perfusion in rats with portal hypertensive gastropathy. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2001; 9(4): 232-234.
137. Yu Y, Yin C, Yu J. Experimental study on the correlation of nitric oxide with portal hypertensive enteropathy. *J Tongji Med Univ* 1998; 18(4): 221-224.
138. Hashimoto N, Ohyanagi H. Effect of acute portal hypertension on gut mucosa. *Hepatogastroenterology* 2002; 49(48): 1567-1570.
139. Wang WD, Guo WD, Wang Q. The association between enteric bacterial overgrowth and gastrointestinal motility after subtotal liver resection or portal vein obstruction in rats. *Eur J Surg* 1994; 160(3): 153-160.
140. Schimpl G, Pesendorfer P, Steinwender G. 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; 40(3): 422-428.
141. 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—hemodynamics and lipid peroxidation. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1989; 90(8): 1238-1244.

142. Rasaratnam B, Kaye D; Jennings G. The effect of selective intestinal decontamination on the hyperdynamic circulatory state in cirrhosis. A randomize trial. *Ann Intern Med* 2003; 139(3): 186-193.
143. Schimpil G, Pabst MA, Feierly G. A tungsten supplement diet attenuates bacterial translocation in chronic portal hypertensive and cholestatic rats: role of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase. *Gut* 1999; 45(6): 904-910.
144. Kaur S, Kaur U, Tandon C. Gastropathy and defense mechanisms in common bile duct ligated portal hypertensive rats. *Mol Cell Biochem* 2000; 203(1-2): 79-85.