

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİYABET OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA SERBEST RADİKAL
REAKSİYONLARININ LENSDEKİ ROLÜ VE ANTİOKSİDANLAR**

Mehmet TUZCU

96314

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez,.....Tarihinde Aşağıda Belirtilen Jüri Tarafından Oybirliği/Oy
Çokluğu İle Başarılı/Başarısız Olarak Değerlendirilmiştir.

(İmza)

(İmza)

(İmza)

Danışman

Yrd.Doç.Dr. Nihat DİLSİZ

ÖZET**Yüksek Lisans Tezi****DIYABET OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA SERBEST RADİKAL
REAKSİYONLARININ LENSDEKİ ROLÜ VE ANTİOKSİDANLAR****Mehmet TUZCU****Fırat Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
2000, sayfa: 64**

Katarakt, lens saydamlığının kaybolması sonucunda ışık geçirgenlik oranının azalması ve görmenin bozulmasıdır. Kataraktlı lenslerde malondialdehit (MDA) miktarındaki artış, lipid peroksidasyonunun katarakt oluşumunda çok önemli olduğunu göstermektedir. MDA *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda proteinlerin, fosfolipitlerin ve nükleik asitlerin amino grupları ile reaksiyona girebilmektedir. Bunun sonucunda lens proteinlerinde ileri glikasyon ürünleri oluşmaktadır. Bu çalışmada aspirin ve aminoguanidin gibi antioksidan ilaçların streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş sıçan lenslerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla diyabet oluşturulmuş sıçan lenslerindeki MDA miktarı ölçülmüş ve proteinlerdeki disülfid oluşumu incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlar; lens proteinlerinde glikasyon oluşumunun, aspirin ve aminoguanidin uygulanan gruplarda diyabet grubuna oranla daha az meydana geldiğini göstermiştir. Diyabetik lens örnekleri diğer gruplar ile karşılaştırıldığında, serbest proteinlerde bir azalma ve buna karşılık serbest olmayan proteinlerde artış görülmüştür.

Buna ilave olarak aspirin ve aminoguanidin uygulanan diyabet gruplarında MDA seviyesinin diyabet grubuna göre az da olsa düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar aspirin ve aminoguanidin gibi antioksidan ilaçların hayvanlarda deneysel olarak oluşturulan diyabetik kataraktı önlemede rol aldığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, Serbest radikal, Katarakt, Lens proteinleri, Antioksidan, SDS-PAGE, Malondialdehit

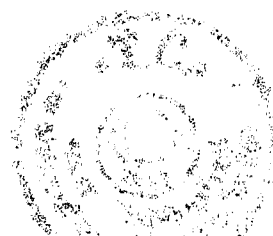
ABSTRACT**Master Thesis****THE ROLE OF FREE RADICAL REACTIONS
AND ANTIOXIDANTS IN DIABET INDUCED RAT LENS****Mehmet TUZCU****Firat University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
2000, Page:64**

Cataract is the clouding of the lens of the eye, which reduces the amount of incoming light and results in the deterioration of vision. The increases in malondialdehyde (MDA) level in the cataractous lenses is the cataract formation. MDA reacts *in vivo* and *in vitro* with free amino groups of proteins, phospholipids, or nucleic acids. As a result of this, advanced glycation end products (AGE) of proteins occur in lens. In this study, the possible role of antioxidant drugs aspirin and aminoguanidine was investigated in STZ induced diabetic rat lens. For this, the MDA content was measured and disulphide bond formation of proteins investigated in the diabet induced rat lens.

It was found that the increased glycation (non-enzymatic glycosylation) of lens proteins caused by diabetes was less in the diabetic rats treated with aspirin and aminoguanidine. In diabetic lens samples, water soluble proteins were decreased whereas, water-insoluble proteins increased when compared to other groups.

In addition, MDA level was found to be lower in diabetes supplemented with aspirin and aminoguanidine than diabetic group. These results indicated that, antioxidant drugs aspirin and aminoguanidine have possible protective effect against cataract development in diabetic rats.

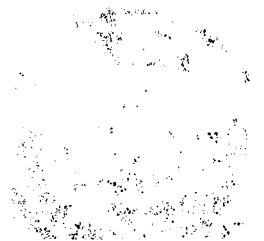
Key Words: Diabet, Free radicals, Cataract, Lens proteins, Antioxidant, SDS-PAGE, Malondialdehyde.



TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Danışman Hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Nihat DİLSİZ'e teşekkürlerimi borç bilirim.

Mehmet TUZCU



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	II
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
FOTOĞRAFLAR LİSTESİ	VII
TABLolar LİSTESİ	IX
KISALTMALAR LİSTESİ	X
1. GİRİŞ	1
1.1. Lensin Genel Yapısı.....	1
1.2. Lensin Biyokimyası.....	3
1.2.1. Lens elektrolitleri	3
1.2.2. Lens proteinleri.....	4
1.2.3. Lens lipitleri.....	7
1.3. Diabetes Mellitus.....	7
1.3.1. Tip I diabetes mellitus.....	8
1.3.2. Tip II diabetes mellitus.....	8
1.4. İnsülin Biyokimyası.....	8
1.5. Lens Glukoz Metabolizması.....	9
1.5.1. Glikozilasyon.....	11
1.5.2. Lens proteinlerinin nonenzimatik glikozilasyonu.....	12
1.6. Serbest Radikaller.....	15
1.6.1. Serbest oksijen radikalleri ve reaktif oksijen türleri.....	16
1.6.1.1. Süperoksit radikali.....	18
1.6.1.2. Hidrojen peroksit.....	18
1.6.1.3. Hidroksil radikali.....	19
1.6.2. Serbest radikallerin etkileri	19
1.6.2.1. Membran lipitlerine etkileri (Lipit peroksidasyonu).....	20
1.6.2.2. Proteinlere etkileri.....	22
1.6.2.3. Nükleik asitlere etkileri.....	23
1.6.2.4. Karbohidratlara etkileri.....	23

1.6.3. Serbest radikaller ve diyabet.....	24
1.7. Katarakt Gelişim Mekanizması.....	25
1.7.1. Senil katarakt.....	25
1.7.2. Oksidatif tahribat ve katarakt.....	26
1.7.3. Diyabetik katarakt.....	26
1.7.4. Ultraviyole ışını ve katarakt.....	27
1.8. Antioksidanlar.....	27
1.8.1. Enzimler.....	28
1.8.2. Küçük moleküller.....	30
1.8.3. Aspirin ve aminoguanidinin antioksidan etkileri.....	33
1.9. Lensde Oksidan ve Antioksidan Faktörler.....	35
2. MATERYAL VE METOD.....	39
2.1. Deney Hayvanları.....	39
2.2. Deney Hayvanlarının Beslenmesi.....	39
2.3. Deneysel Uygulamalar.....	39
2.4. Lens Örneklerinin Alınması.....	41
2.5. Protein Analizi.....	41
2.5.1. SDS-poliakrilamid jel elektroforezis (SDS-PAGE).....	41
2.5.1.1. Kullanılan çözeltiler.....	42
2.5.1.2. SDS-PAGE için jellerin hazırlanması.....	43
2.5.2. Lens örneklerinin hazırlanması.....	44
2.5.3. Lens proteinlerinin SDS-PAGE ile analizi.....	44
2.5.4. Lens örneklerinde protein miktar tayini	45
2.6. Lens Örneklerinde Lipit Peroksit Ölçüm Yöntemi	47
3. SONUÇLAR.....	49
3.1. Protein analiz sonuçları.....	49
3.1.1. SDS-PAGE elektroforez ile sıçan lens örneklerinin protein analiz sonuçları.....	49
3.1.2. Sıçan lens örneklerinde protein miktar tayini sonuçları.....	50
3.2. Lens Dokularındaki MDA Düzeyleri.....	52
4. TARTIŞMA	54
KAYNAKLAR.....	57

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Konu	Sayfa No
1.1.	Gözün yapısı.....	2
1.2.	Lenste glukoz metabolizması.....	9
1.3.	Sorbitol yolu.....	11
1.4.	Kataraktlı göz.....	14
1.5.a.	Kataraktlı lens.....	15
1.5.b.	Normal lenste objelerin görünümü.....	15
1.5.c.	Başlangıç kataraktlı lenste objelerin görünümü.....	15
1.5.d.	İleri kataraktlı lenste objelerin görünümü.....	15
1.6.	Oksijen molekülünün suya indirgenmesi sırasında serbest radikallerin oluşması.....	17
1.7.	Serbest radikallerin hücrel hasar yapma mekanizmaları.....	20
1.8.	Lipit peroksidasyonu reaksiyonları.....	21
1.9.	Antioksidan enzim sistemi	30
1.10.	Glutasyon ve askorbik asidin antioksidan etkileri.....	36
1.11.	Glutasyon sentezi.....	36
1.12.	Merkaptoürük asit yolu.....	38
3.1.	Standart absorbans değerleri ile elde edilen kalibrasyon kurvesi.....	51
3.2.	Sıçan lens dokularında MDA sonuçları.....	52

FOTOĞRAFLAR LİSTESİ

Fotoğraf	Konu	Sayfa No
3.1.	Sıçan lens örneklerinin serbest protein fraksiyonları.....	49
3.2.	Sıçan lens örneklerinin serbest olmayan protein fraksiyonları.....	50



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo	Konu	Sayfa No
1.1.	Kristalinlerin karakteristik özellikleri	5
1.2.	Çözünür ve çözünmez lens proteinlerinin lens içindeki oranlarının yaşla değişimi.....	6
1.3.	Organizmadaki temel serbest radikal reaksiyonları.....	17
2.1.	Deney hayvanlarına verilen yemin bileşimi.....	39
2.2.	Deneysel diyabette sıçanlar için önerilen ağırlık ve glisemi düzeyine göre insülin dozu.....	41
3.1.	Standart absorbans değerleri.....	50
3.2.	Lens örneklerinden elde edilen protein miktarları.....	51
3.3.	Sıçan lens dokularında MDA değerleri.....	52
3.4.	Sıçan lens dokularında ortalama MDA değerleri.....	53

KISALTMALAR

AG	aminoguanidin
AGE	ileri glikolizasyon son ürünleri
ATP	adenozin trifosfat
°C	derece Celcius
DNA	deoksiribonükleik asit
EDTA	etilendiamin tetra asetik asit
GSH	glutasyon
GSH-P_x	glutasyon peroksidaz
GSSH	yükseltgenmiş glutasyon
HCO₃	bikarbonat
IDDM	insülin bağımlı diabetes mellitus
IgG	immunoglobulin G
kDa	kilodalton
LDL	düşük yoğunluklu lipoprotein
LPO	lipit peroksidasyon
µM	mikromolar (10 ⁻⁶ M)
M	molar
MDA	malondialdehit
mg	miligram
mM	milimolar (10 ⁻³ M)
NADP	nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH	nikotinamid adenin dinükleotid fosfat redükte formu
NEB	nonenzimatik kahverengileşme
NEG	nonenzimatik glikozillenme
NIDDM	insülin bağımlı olmayan diabetes mellitus
PAGE	poliakrilamid jel elektroforez
PUFA	poliansatüre yağ asitleri
RNA	ribonükleik asit
SDS	sodyum dodesil sülfat

SOD	süperoksit dismutaz
STZ	Streptozotosin
TBA	tiyobarbitürik asit
TE	tris-EDTA buffer
TEMED	N, N, N', N'-tetrametil-etilendiamin
Tris	hidroksimetil amino metan



1.GİRİŞ

1.1. Lensin Genel Yapısı

Lens, irisin arkasında, vitreus hümorun önünde yer alır. Kristal görünümüne sahip olan lensin yetişkin insanlarda yüksekliği 10 mm, genişliği 6 mm'dir. Düzleştirilmiş bir küre şeklindeki lens, pupilladan göze giren ışığı kırarak bunu retina üzerinde toplar. Lensin en ön kısmına ön kutup, en arkadaki kısmına arka kutup adı verilir. Lensi boyuna çevreleyen kısım ise ekvator adını alır (Şekil 1.1).

Lens doğumdan itibaren damar ve sinir dokusundan yoksundur. Saydam bir kapsül tarafından sarılan lens iki tip hücreden oluşmaktadır. Bunlar ön kapsülün altında yer alan tek tabakalı epitel hücreleri ve bu hücrelerin ekvator bölgesindeki bölünmeleri sonucunda oluşan lens lif hücreleridir. Lens lif hücreleri, epitel hücrelerinden oluştuktan kısa bir süre sonra çekirdek yapılarını kaybederler ve dolayısıyla bölünme özelliklerine sahip olmayan özel hücrelerdir.

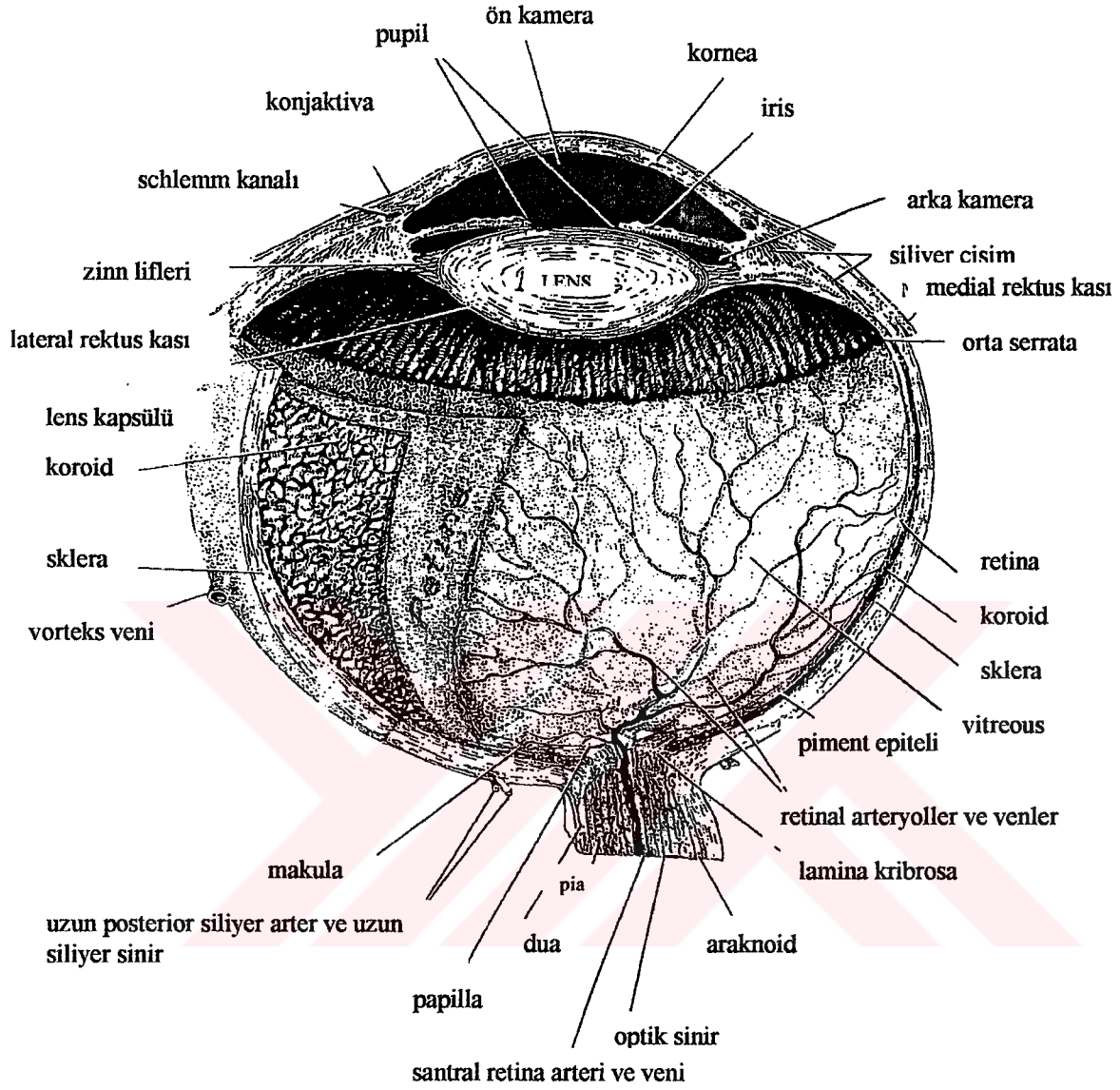
Lensin mikroskopik olarak kapsül, epitel ve nükleer bölgeleri vardır.

Kapsül aselüler, elastik bir yapı olup, gelişen ve farklılaşan hücreleri çevreler. Kapsül önde alttaki epiteli, arkada ise yüzeysel lens liflerini sarar. Bazal membran ile analog olup vücuttaki en kalın bazal membrandır. Düşük moleküler ağırlıklı bileşiklere geçirgen olup kolloidal materyale geçirgen değildir.

Çekirdek ve sitoplazmik organellere sahip olan epitel hücreleri fonksiyonel olarak iki bölüme ayrılır. Bunlar:

1. Ekvatorda bulunan ve aktif olarak bölünüp lens fibrillerine farklılaşan hücreler.
2. Bölünmeyen, aköz ile lens arasında madde alışverişini sağlayan ve kapsüler materyali salgılayan hücrelerdir.

Epitelde dışarı doğru sodyum ve su pompalayan Na-K ATPaz enzimi ile epitel hücreleri ve lens fibrilleri arasında metabolizmada rol oynayan ara birleşim noktaları tespit edilmiştir.



Şekil 1.1. Gözün yapısı

Korteks, ekvatordaki epitel hücrelerinin lens fibrillerine farklılaşması ile ortaya çıkar. Yeni oluşan lens hücresinin bir ucu öne, diğer ucu arkaya doğru ilerler ve diğer lens lifleri ile ön ve arkada birleşerek sutur çizgilerini oluşturur. Olgunlaşan lens lif hücrelerinde, çekirdek ve mitokondri gibi yapılar parçalanmaktadır.

Lens çekirdeği en merkezde bulunan ve embriyonik lense oluşturan hücreler tarafından meydana getirilir (Moses, 1975).

Lens zonüller bağlarla (zinn lifleri) kirpiksi kaslara bağlıdır. Kirpiksi kasın görme sırasında kasılması ile lens kalınlaşır ve refraktif gücü artar. İnsan lense doğumda 60 mg, birinci yaşta 140 mg, 80 yaşında ise 250 mg ağırlığa kadar ulaşır (Çakinel, 1992). Lens damarsız bir yapıya sahiptir ve beslenmesi kamaralar sıvısı ile sağlanır. Bu sıvıdaki glukoz, lense büyüme ve şeffaflığını devam ettirmesi için gerekli olan kimyasal enerjiyi sağlar (Bengisu, 1990).

1.2. Lense Biyokimyası

1.2.1. Lens elektrolitleri

Lens dehidrate bir organdır. Diğer birçok dokuyla karşılaştırıldığında, lense yüksek protein, düşük su içeriğine sahip olduğu görülür. Yetişkin insan ve hayvan lense yaklaşık olarak %66 su, %33 protein içerir. Lense dehidrateliği, lens lifleri ve lens epitel membranındaki Na-su pompasıyla korunmaktadır. Lenste su miktarının, kamaralar sıvısı ve vitre ortamından daha düşük olması kırıcılığının yüksek olmasını sağlar. Lens yapısında su ve proteinden başka aminoasitler, lipitler, bazı anyon ve kasyonlar, glutatyon ve askorbik asit bulunmaktadır (Cotlier, 1987).

Lens yüksek oranda K^+ düşük oranda Na^+ ve Cl^- iyonları ihtiva eder. Bu miktarlar kamaralar sıvısındaki miktarlardan düşüktür. Lenste Na-K arasındaki denge Na-K pompası ile sağlanır. Bu pompa epitel hücrelerinde çok aktiftir. Bu yolla Na^+ dışarı atılırken K^+ lens içine alınır. Burada plazma membranında bulunan Na-K ATPaz enzimi kullanılır ve 3 Na^+ 'u dışarı atıp, 2 K^+ 'u içeri almak için 1 mol ATP harcanır. Na-K ATP az enziminin inhibisyonu lenste Na^+ ve Cl^- iyonlarının birikmesine neden olur. Na^+ ile H_2O girişinin artması sonucu, osmotik denge bozulur ve lens şişer. Lens içinde su artışı lens liflerinin membran permeabilitesini bozar. Sonuçta lens iyon



dengesizliği ortaya çıkar ve lensin şeffaflığı kaybolur. Lensin osmolaritesine yardımcı olan katyonlar sodyum, potasyum, anyonlar ise klorür, bikarbonat, sülfat, askorbat ve glutatyondur (Uğuz,1993).

Lensteki Ca^{+2} konsantrasyonu kamaralar sıvısına göre daha azdır. Ca^{+2} lens içine spesifik Ca^{+2} kanallarıyla girer ve dışarıya ise Ca-ATPaz pompasıyla atılır. Ca-ATPaz en fazla epitelde bulunur, kortekte ise daha azdır. Ca^{+2} lenste membran geçirgenliği, membran proteinlerinin organizasyonu, protein sentezi ve lens proteinlerinin çözünürlüğü üzerinde etkilidir (Uğuz, 1993).

1.2.2. Lens proteinleri

Lens organizmanın proteince en zengin organıdır. Total ağırlığının yaklaşık %33'ü proteindir. Lens proteinlerinin en önemli görevi lensin şeffaflığının ve kırılma gücünün yüksek olmasını sağlamaktır (Bengisu, 1990).

Lens su veya serum fizyolojik ile homojenize edilip, santrifüj işlemi yapılırsa proteinlerin %85'i süpernatantta, %15'i ise çökeltide kalır. Süpernatantta kalan proteinler, suda çözünür proteinler olup kristalinler olarak adlandırılırlar. Kristalinler de kendi aralarında moleköl ağırlıklarına göre alfa kristalin (%15), beta kristalin (%55), gama kristalin (%15) olmak üzere üç gruba ayrılırlar. ökeltide kalan proteinler suda çözünmeyen proteinler olup albüminoidler olarak adlandırılırlar. Bunlar çözünmeyen, hücre iskeleti ve membran proteinleridir. Çözünmeyen proteinlerin büyük bir kısmı lens çekirdeğinde, çözünebilen proteinlerin büyük bir kısmı ise lens korteksinde bulunur (Davson, 1990).

Lens proteinleri ile ilgili çok sayıda kimyasal ve fizikokimyasal araştırmalar yapılmıştır. Suda özünür proteinlerin bazı karakteristik özellikleri Tablo 1.1'de gösterilmektedir.



Tablo 1.1. Kristalinlerin karakteristik özellikleri (Erdoğan, 1999).

ÖZELLİK	KRİSTALİNLER		
	ALFA	BETA	GAMA
İZOELEKTRİK NOKTA	pH:4.8-5.0	pH: 5.7-7.0	pH:7.4-8.4
MOLEKÜLER AĞIRLIK	5×10^5 üzeri	4.2×10^4	2×10^4
MOLEKÜLER FORM	Agregat	Agregat	Monomer
TİYOL GRUBU İÇERİĞİ	Düşük	Yüksek	Yüksek
AMİNOASİTLERİN N-TERMİNALİ	Kapalı	Kapalı	Açık (Glisin ve Alanin)

Alfa kristalinler çözünür lens proteinleri içinde en yüksek molekül ağırlıklı proteinlerdir. Molekül ağırlıkları 60-400 kDa civarındadır. Alfa kristalinler karışık makromoleküler agregatlar halinde bulunurlar. Epitelde, kortikal liflere göre daha hızlı sentez edilirler. Alfa kristalinler izoelektrik noktasına göre alfa A₁, alfa A₂, alfa B₁, alfa B₂ olmak üzere 4 alt üniteye ayrılabilir. Alfa A'lar iki asidik, alfa B'ler iki bazik polipeptidden oluşmuştur. Sadece alfa A zincirleri tiyol grubu içerir. Alfa kristallerini jel filtrasyonu veya ultrasantrifüjle yüksek ve düşük molekül ağırlıklı fraksiyonlara ayırmak mümkündür. Yüksek molekül ağırlıklı fraksiyon 90-400 kDa ağırlığında olup yaşla artar. Düşük molekül ağırlıklı alfa kristalinler ise yaşla azalmaktadır (Dilley and Harding, 1975).

Beta kristalinler çözünür lens proteinlerinin en büyük kısmını oluştururlar. Molekül ağırlıkları 20-40 kDa arasında değişmektedir. Beta kristalinler oksidasyonlara hassas oldukları için agregat oluşturmaya meyillidirler. Embriyonik dönemde alfa kristalinlere oranla daha düşük olan beta kristalinler doğumdan sonra artmaktadır (Davson,1990).

En düşük molekül ağırlıklı kristalinler gama kristalinleridir. Molekül ağırlıkları 20 kilodalton (kDa) civarında olup tek bir polipeptid zincirinden oluşmuşlardır. Lens çekirdeğinde, kapsüle oranla daha yüksek oranda bulunurlar. Lens epiteli gama kristalini içermez (Davson, 1990). Kortikal bölgedeki gama kristalinlerin nükleustakilerden farklı olması, gama kristalin sentezinin yaş ile birlikte farklılıklar gösterdiğini düşündürmektedir (Papacostas,1965).

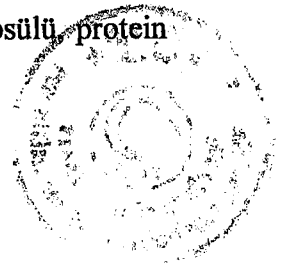
Çözünür olmayan lens proteinlerinin miktarı ve total proteine oranı yaşlanmaya paralel olarak artmaktadır (Tablo 1.2).



Tablo 1. 2. Çözünür ve çözünmez lens proteinlerinin lens içindeki oranlarının yaşla değişimi(Erdoğan, 1999).

Yaş grupları (Yıl)	Lens ağırlığı (mg)	Total protein (mg)	Protein içeriği mg/100 mg lens		Suda erirlik (%)
			Çözünebilen	Çözünemeyen	
0-10	122	64.00	61.00	2.60	96.30
10-20	122	63.00	59.00	3.80	91.10
20-30	140	62.80	57.30	5.50	91.10
30-40	153	57.60	51.70	5.90	90.20
40-50	170	55.60	49.70	6.60	89.20
50-60	212	50.70	43.30	7.60	84.90
60-70	230	49.70	39.50	10.30	79.40
70-80	245	47.00	37.00	10.00	78.60
>80	269	47.60	36.00	11.50	75.90

Lens proteinlerinin sentezi, korteksin derin tabakaları ve çekirdekten çok epitel hücrelerde ve korteksin dış tabakalarında meydana gelir. Yetişkin lens çekirdeğinde protein sentezi ya çok az olur ya da hiç olmaz. Yaşlanmayla lens proteinlerinin moleküler yapısında değişimler meydana gelir. Bu değişimler başlıca; yüksek moleküllü proteinlerin oluşumu, disülfid köprülerinin oluşumu, glutamin ve asparaginin deamidasyonu, polipeptid zincirlerinin kısmen yıkımı, nonenzimatik glikozilasyon ile glukoz bağlanması ve triptofanın oksidasyonudur. Bu değişimlerin sonucunda düşük moleküllü proteinler azalırken, yüksek molekül ağırlıklı protein agregatları giderek fazlaşır. Sülfhidril grupların oksidasyonu ile oluşan disülfid köprüleri proteinlerin agregat oluşturmaya neden olur. Asparagin ve glutamin amid grubunun karboksil grubuna dönüştüğü deamidasyon reaksiyonları ile proteinlerin (-) yükleri artar. Polipeptid zincirlerinin kısmen yıkımı da proteinlerin asitleşmesine neden olur. İki durumda artan asiditenin kristalinlerin agregat oluşturmada rol oynadığı düşünülmektedir. Nonenzimatik glikozilasyon ile glukoz molekülü proteinlerin amino gruplarıyla birleşerek yapısını ve fonksiyonunu değiştirmektedir. Triptofanın oksidasyonu da yüksek moleküllü protein agregatlarının meydana gelmesine neden olur(Türker, 1988). Normal lenslerde, lens liflerinin membranı ve lens kapsülü protein



moleküllerinin lensten kameralar sıvısına geçmesine izin vermez. Olgun bir katarakt geliştiğinde lens liflerinin membranlarının yapısı bozulur, kapsül daha geçirgen hale gelir ve proteinler lensten dışarı çıkabilir.

1.2.3. Lens lipitleri

Lensin kuru ağırlığının %3-5'ini lipitler oluştururlar. Lens lipitlerinin çoğu hücre zarıyla ilgili olduklarından, bunlar bir protein-lipit kompleksi halinde bulunurlar. İnsan lensindeki lipitlerin yaklaşık %50'sini kolesterol, %45'ini fosfolipitler, %5'ini ise glikosfingolipitler ve seramidler oluşturmaktadır. Lens lif membranının esas komponenti olan lipitlerin sentezlerindeki azalma veya yıkımlarında meydana gelen bir bozulma, lif membranlarında tahribata yol açar. Bu tahribat, lensin transport mekanizmalarını bozarak opaklaşmaya neden olur(Cotlier, 1987).

1.3. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus; başta karbohidrat metabolizması olmak üzere önemli metabolik bozukluklara yol açan insülin salgısı veya etkisinin yetersizliğinde hiperglisemi ve glikozüri ile kendini belli eden bir hastalıktır (Dingiloğlu, 1991). Diabette karbohidrat metabolizmasındaki bozukluklarla birlikte, yağ ve protein metabolizmasında da bozukluklar vardır (Akgül, 1996).

Diabetes mellitus, pankreasın cerrahi olarak çıkarılması sonucu doğal olarak oluşan ve insülin yokluğu gibi basit şekilde ifade edilebileceği gibi, Tip I ve Tip II diyabetteki gibi birden fazla sebep ve kompleks bir şekilde işleyen mekanizmalar olarak da açıklanabilmektedir. Ayrıca hayvanlarda streptozotosin ve alloksan gibi diyabetojenik ajanlar ile travma, cerrahi uygulama esnasında pankreas β hücrelerinin zarar görmesi sonucu da Diabetes mellitus oluşmaktadır (Üstündağ, 1996)

Diabetes mellitus; genel olarak Tip I Diabet (İnsülin Bağımlı Diabetes Mellitus: IDDM) ve Tip II Diabet (İnsülin Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus:NIDDM) olmak üzere iki gruba ayrılır (Yenigün, 1995).



1.3.1. Tip I diabetes mellitus (İnsülin Bağımlı Diabetes Mellitus: IDDM)

Diabetes mellitus'un bu tipinde, pankreasın langerhans adacıklarının β hücrelerinde gelişen harabiyete bağlı olarak insülin salgılanma bozukluğu meydana gelmektedir (Beales et al., 1994). Tip I diyabet, genellikle 30 yaşından önce ve tipik olarak 13-19 yaş arası dönemde başlayan ve sonuçta endojen insülin kaybıyla sonuçlanan; vasküler ve nörolojik komplikasyonlar ile karakterize bir diyabet türüdür (Rodger, 1991). Tip I diyabette pankreasın insülin rezervi çok az ve kanda insülin düzeyi çok düşük olarak bulunmaktadır. Diyabetik komplikasyonlar yüzünden Tip I diyabette yaşam süresi kısa olup, mikroanjyopatiye bağlı komplikasyonlar bu tip diyabette daha sık görülmektedir (Akgül, 1996).

1.3.2. Tip II diabetes mellitus (İnsüline Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus: NIDDM)

Genelde orta yaş grubunda başlayan Tip II diyabetin uzunca bir süre farkına varılmayabilir. Tip I diyabete göre pankreasın insülin rezervi nisbeten iyidir ve bir süre böyle devam edebilir; ancak zamanla azalış gösterir. Kan insülin düzeyleri de normale yakındır; ancak zamanla düşer. Bu tip diyabette dışarıdan verilen ekzojen insüline karşı direnç vardır (Akgül, 1996).

1.4. İnsülin Biyokimyası

Langerhans'ın β hücrelerinden salgılanan insülin birbirine iki adet disülfid bağı ile tutunmuş 21 aminoasitli A ve 30 aminoasitli B zincirlerinden oluşmuş bir polipeptittir. Plazmadaki yarı ömrü ortalama olarak ancak 6 dakika olan insülin, 10-15 dakika içinde dolaşımdan ayrılmaktadır. Kullanım dışı kalan insülin başlıca karaciğerde, daha az olarak da böbrekte parçalanmaktadır (Guyton and Hall, 1996).

İnsülinin en önemli etkisi karbohidrat metabolizması üzerinde olmaktadır. Beslenme ile birlikte kan dolaşımına karışan karbohidratlar, insülin mevcudiyetinde tüm vücut dokularınca (özellikle karaciğer, kas ve yağ dokusunda) hızla alınmakta, depolanmakta ve kullanılmaktadırlar. Beyin dokusu, diğer dokulardan farklı olarak



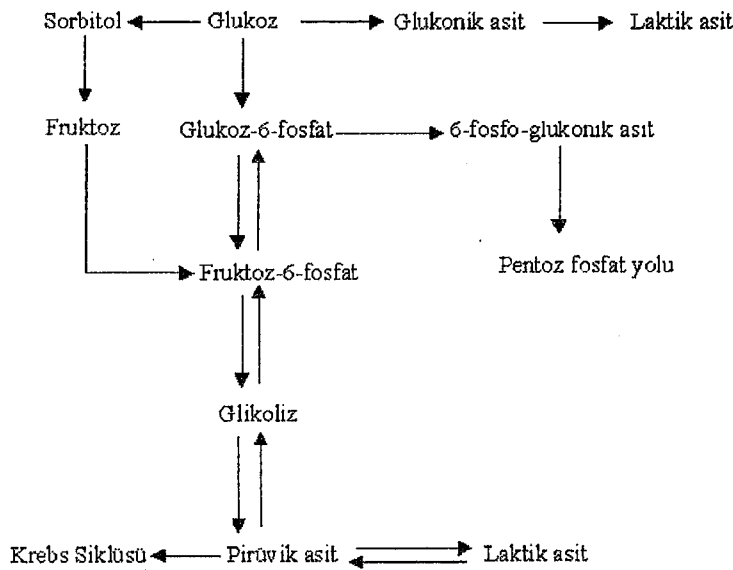
glukozu insülin aracılığı olmadan direkt bir şekilde kullanmaktadır. Beyin dokusu için kan glukoz değerinin kritik değerin üzerinde tutulması çok önemlidir (Guyton and Hall, 1996).

İnsülin vücut dokularında glukoz kullanımını arttırarak bir tür “yağ koruyucusu” gibi fonksiyon görmektedir. Karaciğerde yağ asidi sentezini arttıran insülin, yağ dokusunda da benzer şekilde etki göstermektedir. İnsülin eksikliğinde yağ metabolizması her yönüyle hızlanmakta ve bu olay diyabette, insülin salgısı çok düştüğünde daha da belirginleşmektedir (Guyton and Hall, 1996).

Karbohidrat ve yağların yanı sıra proteinler de sindirim sonrasında dokularda depo edilmektedir. İnsülin salgısı minimum seviyeye indiğinde protein depolanması tamamiyla durmakta ve protein katabolizmasında artış gözlenmektedir. Protein sentezinde duraklamanın yaşandığı ve fazlaca aminoasitin plazmaya boşaldığı bu durum, ağır diyabetin en ciddi etkilerinden biri olarak diyabetik hastalarda gözlenmektedir (Guyton and Hall, 1996).

1.5. Lens Glukoz Metabolizması

Glukozun lens içine girişi insüline bağımlı değildir. Glukoz lense kamaralar sıvısından difüzyonla girer. Lense giren glukoz 4 temel yolla metabolize olur (Şekil 1.2);



Şekil 1.2. Lenste glukoz metabolizması



1. Glikolitik yol
2. Krebs siklüsü (sitrikasit siklüsü)
3. Heksoz monofosfat (pentoz fosfat) yolu
4. Sorbitol yolu

Damar sisteminden yoksun olan lens, oksijeni kamaralar sıvısından aldığı için, oksijen miktarı diğer organlar kadar fazla değildir. Bu nedenle lens metabolik enerji ihtiyacını en fazla glikolizle (%80) sağlamaktadır. Glikolizle sağlanan enerji; makromoleküllerin sentezi, transport olayları ve elektrolit dengesi gibi bazı fizyolojik özelliklerin korunması, glutatyon ve proteinlerin devamlı sentezi için gereklidir. Glikolizin son ürünleri laktik asit, CO_2 ve H_2O 'dur. Laktik asit kamaralar sıvısına diffüze olur ve buradan sirkülasyon sıvısıyla uzaklaştırılır (Uğuz, 1993).

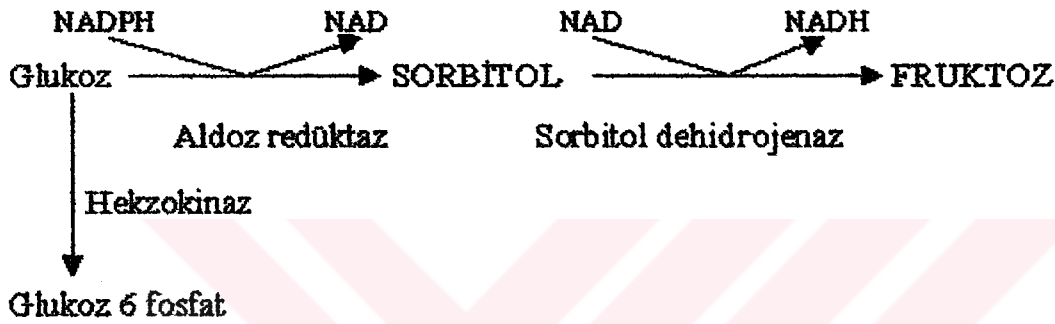
Lenste oldukça aktif olan pentoz-fosfat yolunda ATP üretilmez, fakat NADPH'lar ve ribonükleik asit sentezi için gerekli pentozlar üretilir. Üretilen NADPH'lar lens glutatyonunun indirgenmiş halde kalmasına ve lensin oksidatif hasara karşı korunmasına yardımcı olmaktadır (Uğuz, 1993).

Lenste pürivat karboksilasyonu için aktif bir mekanizma vardır. Bu mekanizma sonunda CO_2 ve asetaldehit meydana gelmektedir. Asetaldehit de lens aldehit dehidrojenaz ile metabolize edilir. CO_2 'in H_2O ile birleşmesi sonucunda oluşan HCO_3^- iyonları özellikle karbonik anhidrazın çok olduğu lens nükleusunda fazla iken lens korteksinde daha azdır (Cotlier, 1987).

Kandaki glukoz konsantrasyonunun uzun süre yüksek değerde kalması kamaralar sıvısında da glukoz konsantrasyonunun artmasına neden olur. Bu olay glukoz metabolizmasını düzenleyen hekzokinazı uyarır. Normalde lensteki glukoz miktarı düşük olduğundan aközdeki glukoz lense kolayca diffüze olur. Diyabette glukozun miktarı lenste daha da artmaktadır (Swamy et al., 1993). Hiperglisemi durumunda lens içine daha fazla glukozun girmesi ile de sorbitol yolu işlemeye başlar (Şekil 1.3).

Aldoz redüktaz enziminin aktive olmasıyla glukozun bir kısmı sorbitole dönüşür. Meydana gelen sorbitol, dehidrojenaz enzimi ile fruktoza dönüşür. Fakat lens glukozunun aşırı arttığı durumlarda enzimler yetersiz kalır ve lenste sorbitol birikir. Biriken sorbitol osmotik basıncı arttırarak su alımına ve hücrenin şişmesine, K^+ iyonlarının kaybına, aminoasitlerin azalmasına neden olur (Hatemi et al., 1983). Ayrıca ATP, miyoinozitol azalmasına ve dolayısıyla Na-K ATPaz aktivitesinin azalmasına

sebebi olur (Mitton et al., 1993). Aldoz redüktaz NADPH'ı kullandığından, sorbitol yolunun etkileşmesi ile hücrenin NADPH tüketimi artar. Lensin oksitleyici etkilere karşı korunmasında görevli olan, indirgenmiş glutatyonun (GSH) oluşumunu sağlayan glutatyon redüktaz da NADPH kullandığından, hiperglisemide mevcut NADPH için aldoz redüktaz ile glutatyon redüktaz rekabet ederler. Dolayısıyla hiperglisemide etkinliği artan sorbitol yolunun artan NADPH tüketimi, hücrenin oksitleyici etkilere karşı koruma gücünü azaltır. Lenste hiperglisemiye bağlı olarak meydana gelen bu değişimler, aldoz redüktaz inhibitörleri ile önlenabilmektedir (Gonzales et al., 1986).



Şekil 1.3. Sorbitol yolu

1.5.1. Glikozilasyon

Proteinlerin glikozilasyonu, glukoz ile proteinin amino grubu arasındaki direkt kimyasal reaksiyon sonucu meydana gelir. Protein glikozilasyonu, plazma membranının bütünlüğünün sağlanması ve proteinin ekstrasellüler boşluğa salınımının kolaylaştırılmasında kısmen önemlidir. Karbohidrat grubunun proteine bağlanması enzimatik veya nonenzimatik olmaktadır.

Diabetes Mellitus, insülinin β hücreleri tarafından salınmasında mutlak azalma sonucu oluşan hiperglisemi ve glikozüri ile kendini gösteren hem akut metabolik hem de kronik komplikasyonlarla seyreden bir hastalıktır. Komplikasyonları ile yaşam kalitesini etkileyen, kişide fiziksel değişiklikler yanında ruhsal ve sosyal sorunlara da neden olan diabetes mellitus, sürekli kontrol ve tedavi gerektirir. Diyabet süresi arttıkça komplikasyonların görülme sıklığı ve çeşitliliği de artar. Bu yüzden erken tanı ve tedavi çok önemlidir (Yarat, 1988).

Nonenzimatik glikozilasyon (enzimatik olmayan glikozillenme; NEG) sonucu proteinlerin yapı ve fonksiyonlarında meydana gelen değişmelerin diyabette görülen klinik komplikasyonlara neden olduğu düşünülmektedir. Diyabette özellikle glukozla özgül olan NEG'nin arttığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Swamy et al., 1993).

1.5.2. Lens proteinlerinin nonenzimatik glikozilasyonu

Glikozillenme; enzim aracılığıyla veya enzim olmadan proteinlerin amino gruplarına şekerlerin karbonil grubunun bağlanmasıdır. Proteinlerin enzimatik glikozillenmesi hücrede golgi kompleksi ve endoplazmik retikulumda gerçekleşir. Çeşitli glikoziltransferazlar bu aktivitede görev alır (Emekli, 1992). NEG ise bir post translasyon modifikasyonu olup glukozun proteinlere enzim aracılığı olmadan bağlanmasıdır (Yarat, 1988). Hiperglisemide ise insüline bağımlı olmayan dokularda glukoz birikerek fazla kullanılır. Gözün görme fonksiyonunu yapabilmesi lensin saydam olmasına bağlıdır. Lensin saydamlığı yapısında yüksek oranda bulunan proteinlerle sağlanır (Davson, 1990).

Diyabette hiperglisemi nedeni ile lenste artan glukoz lens proteinleri ile nonenzimatik olarak birleşerek yapı ve fonksiyonlarının bozulmasına ve hatta katarakta neden olmaktadır (Cotlier, 1987). Lenste glukoz düzeyi uzun süre yüksek kalınca sorbitol yolu da devreye girer. Lens lif hücrelerinde biriken sorbitol membrandan geçemediği için lensin şişmesine neden olur. Lensin düzenli yapısı bozularak kesiflikler oluşur ve sonuçta görme engellenir (Bengisu, 1990).

Lenste bulunan glutatyon (GSH) proteinlerin tiyol gruplarının indirgenmiş durumda kalmasını sağlar ve lensi oksidatif hasara karşı korur. Lenste glutatyondan başka diğer antioksidan faktörler askorbik asit, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutazdır (Cappiello et al., 1994). Hiperglisemi durumunda antioksidan sistemler de hasar görmekte ve fonksiyonlarını tam olarak yapamamaktadır. Diyabetikler ile yapılan çalışmalarda lens glutatyonunun azaldığı görülmüştür (Hothersall et al., 1992). GSH'un azalması ile proteinlerin tiyol grupları okside olarak proteinler arasında disülfid bağları meydana gelmekte ve sonuçta yüksek molekül ağırlıklı protein agregatları oluşmaktadır (Reddy, 1990).

Nonenzimatik glikozilasyonda (NEG) ilk önce irreversible aldiminin yapıları schiff bazı oluşur. Daha sonra bu bileşik amadori düzenlenmesi ile kararlı ketoamin yapıya dönüşür. NEG yiyecek endüstrisinde maillard reaksiyonu olarak bilinen reaksiyonun ilk basamağıdır. Bu reaksiyonun ikinci basamağı ise nonenzimatik kahverengileşmedir (Nonenzimatik Browning: NEB). NEB reaksiyonunda, glikozilasyon sonucu oluşan ketoamin bileşiği, çeşitli reaksiyonlar ile zaman içinde çok çapraz bağlı, çözünmeyen pigment durumunda kahverenkli floresans veren karbohidrat-protein polimeri haline dönüşür. Geriye dönüşümü olmayan bu ileri glikozilasyon ürünleri proteinlerin yaşam süresi boyunca birikime uğrar. Glikozilasyon özellikle kollajen ve lens proteinleri gibi yaşam süresi uzun olan proteinleri etkiler (Kaemi, 1992).

Lens proteinlerinin glikozilasyonunda şekerlerin karbonil grubu ile birleşen kısım lizin aminoasidinin ϵ -amino grubudur. Bu aminoasit glikasyon için ilk hedeftir (Ramakrishnan and Sulochano, 1993).

Glikasyon sonucunda başlıca fruktolizin, pentosidin ve N-karboksimetil lizin oluşur. Fruktolizin kararlı bir ketoamin bileşiği olup lens glukoz konsantrasyonu için ara dönem indikatörüdür. Pentosidin NEB sonucunda lizin ile arjinin aminoasitleri arasında çapraz bağların oluşması ile meydana gelen floresans özellikte bir üründür. *In vitro* deneylerde glikasyon ve kahverengileşme reaksiyonlarında çapraz bağların oluşumu arttıkça pentosidin miktarının da arttığı gösterilmiştir (Sell and Monnier, 1990). Bu yüzden pentosidin NEB'yi gösteren iyi bir biyolojik marker olduğu düşünülmektedir (Erdoğan, 1999). Karboksimetil lizin, glikozillenmiş proteinlerde fruktolizinin metalleri katalizlediği oksidatif yıkım ürünüdür. Karboksimetil lizin miktarının artışı, proteinlerin devamlı glikasyon ve oksidatif streslere maruz kaldığının bir göstergesidir (Lyons et al. 1991).

Katarakta lens proteinlerinin glikasyonu ve membran yapısı incelenmiş diyabette katarakt oluşum hızının arttığı ve yaşlılık kataraktı (senil) lenslerde sarı-kahverengi floresans veren çok çapraz bağlı ileri glikozilasyon ürünlerinin oluştuğu görülmüştür (Liang, 1993)(Şekil 1.4).

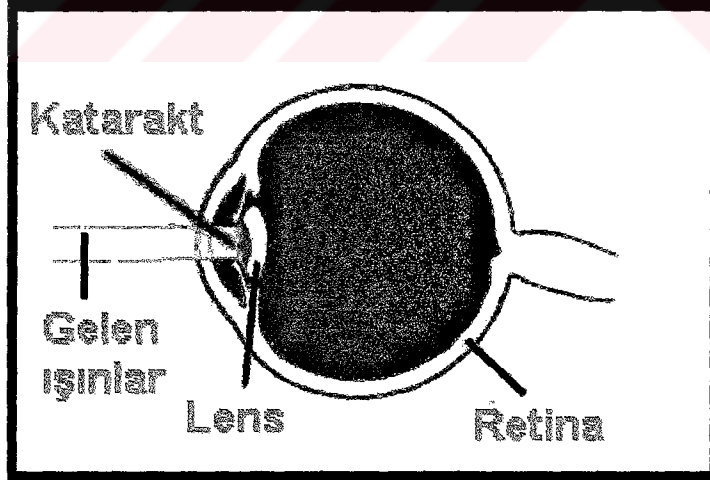
Lens proteinlerinin glikasyon sonucunda çözünürlüğünün azaldığı gösterilmiş, bunun da katarakt oluşumuna neden olabileceği ileri sürülmüştür (Kaemi, 1992). Glikasyonun katarakt oluşumundaki rolünü araştıran çeşitli çalışmalarda kristalinlerin

ayrı ayrı glikasyonu incelenmiş, kristalinlerin amino gruplarının modifiye olduğu, protein üzerindeki yük dağılımının değiştiği, proteinlerde meydana gelen yapısal değişikliğin de daha yüksek molekül ağırlıklı agregatların kümeleşmesine yol açtığı belirtilmiştir (Mota et al., 1994) (Şekil 1.5).

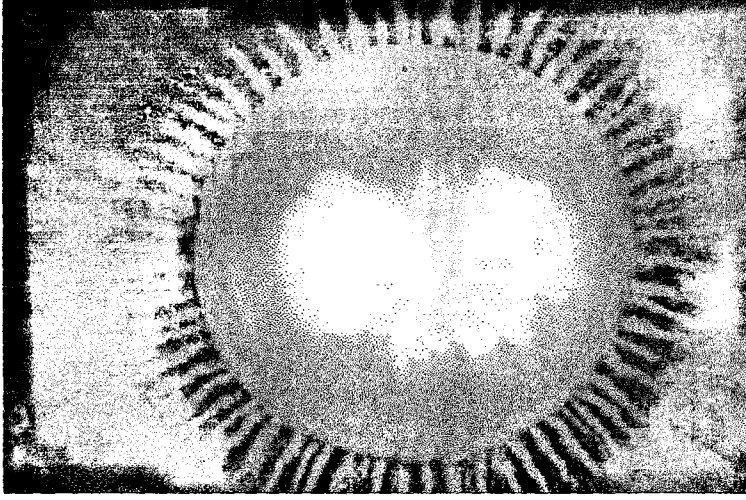
İnsan lens kristalinlerinden α kristalinlerin glikasyonunun diyabet ve yaşlanma ile arttığı, β ve γ kristallerinin glikasyonunda ise çok fazla artış olmadığı saptanmıştır (Van Boekel and Hoenders, 1992).

Yaşlanma ve katarakta kristalinlerin membrana nonkovalent bağlanmasının arttığı belirtilmiştir (Chandrasekher and Ceredella, 1995). Glukoz ile ilk karşılaşan lens proteinleri, lens membran proteinleridir. Bu yüzden intrinsik ve ekstrinsik membran proteinlerinin glikasyonu da incelenmiş, diyabetik ve kataraktlı lenslerde bu proteinlerde de glikasyonun arttığı gözlenmiştir. Buna bağlı olarak membran fonksiyonlarının etkilenebileceği ileri sürülmüştür (Liang, 1993).

Serbest lizin ve glisin aminositlerinin lens proteinlerinin glikasyonunu azalttığı, katarakt oluşumunu geciktirdiği bulunmuştur. Lizin ve glisinin fizyolojik pH'da glukoz ile reaksiyona girdiği ve glikasyonu önlediği belirtilmiştir (Ramakrishnan and Sulochano, 1993). Kataraktlı lenslerde lizin miktarına bakılmış ve normal lenslere oranla daha az olduğu bulunmuştur (Balaji and Sasikala, 1992).



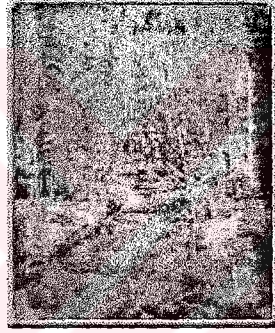
Şekil 1.4. Kataraktlı göz



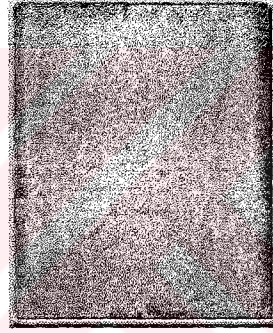
a



b



c



d

Şekil 1.5. a: Kataraktlı lens, **b:** Normal lenste objelerin görünümü **c:** Başlangıç kataraktlı lenste objelerin görünümü **d:** İleri kataraktlı lenste objelerin görünümü

NEG'un lens yapısında meydana getirdiği değişiklikleri inceleyen ve bunların önlenmesini veya geciktirilmesini araştıran çok çeşitli çalışmalar günümüzde de yoğun bir şekilde devam etmektedir.

1.6. Serbest Radikaller

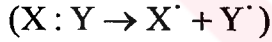
Serbest radikaller dış orbitalinde tek sayıda ortaklanmış elektron taşıyan, elektrik yüklü veya yüksüz olabilen atom veya moleküllerdir. Bu bileşikler organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında oluştuğu gibi, çeşitli dış etkenlerin etkisiyle de

oluşmaktadır. Çok kısa yaşam süreli, ancak yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok aktif yapılı olan serbest radikaller tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliği göstermektedir (Del Maestro, 1980; Kehler and Smith, 1994).

Oksijenle yaşayan tüm canlılarda, normal metabolik işlemler sırasında serbest oksijen radikalleri kaçınılmaz bir şekilde üretilmektedir. Bu nedenle normal metabolizma sırasında oksido-redüksiyon reaksiyonlarının ürünleri olan serbest oksijen radikallerinin oluşması biyolojik bir bozukluk olarak değerlendirilmemelidir. Organizmada serbest radikallerin zararlı etkilerini ortaya koymadan etkisizleştirilmesini sağlayan güçlü savunma sistemi bulunmaktadır. Serbest radikallerin oluşum hızı ile etkisizleştirilme hızı dengede olduğu sürece, organizma bu bileşiklerden etkilenmemektedir. Buna karşılık savunma azalır veya bu zararlı bileşiklerin oluşum hızı sistemin savunma gücünü aşarsa, bu denge bozulmakta ve serbest radikallere bağlı zararlı etkiler ortaya çıkmaktadır (Halliwell, 1996; Nakazawa et al., 1996).

Kararlı bir molekül genel olarak 3 yolla serbest radikal halini almaktadır:

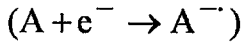
1. Homolitik parçalama:



2. Tek bir elektron kaybetme:



3. Tek bir elektron alma:



Biyolojik sistemlerde radikal üretimi daha çok elektron transferi ile olmaktadır (Cheeseman and Slater, 1993). İki serbest radikalın reaksiyonunda iki madde de radikal özelliklerini kaybetmekte, bir serbest radikalın radikal olmayan diğer bir yapıyla reaksiyonunda ise başka bir serbest radikal oluşmaktadır (Sies, 1993).

1.6.1. Serbest oksijen radikalleri ve reaktif oksijen türleri

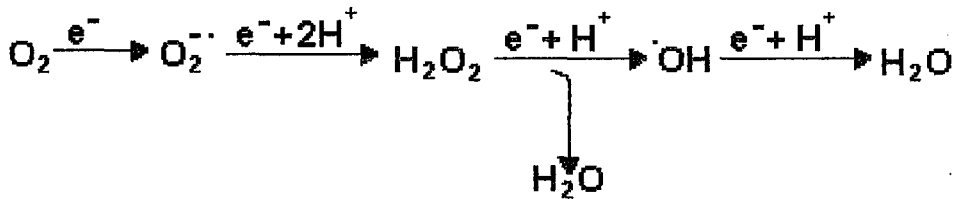
Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir (Tablo 1.3).

Bilindiği gibi, oksijen canlıların yaşamlarını sürdürmeleri için mutlak gerekli bir elementtir. Hücre içinde çeşitli reaksiyonlardan geçerek su haline dönüşmektedir. Bu

sırada hücre kendisi için gerekli enerjiyi sağlamaktadır. Fakat bu süreçte oksijenin %1-3'ü tam olarak suya dönüşmez, süperoksit anyonu ve hidroksil radikali oluşur (Southorn, 1988; Nakazawa et al., 1996) (Şekil 1.6).

Tablo 1.3. Organizmadaki temel serbest radikal reaksiyonları.

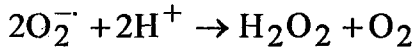
1. $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$ (süperoksit radikali)
2. $2O_2^{\cdot-} + H^+ \rightarrow 2HO_2$ (perhidroksil radikali)
3. $O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$ (hidrojen peroksit)
4. $O_2^{\cdot-} + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$ (hidrojen peroksit)
5. $2O_2 + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (hidrojen peroksit)
6. $2H_2O_2 + e^- + H^+ \rightarrow 2\cdot OH + OH^- + H_2O$ (hidroksil radikali)
7. $H_2O_2 + Fe^{++} \rightarrow \cdot OH + OH^- + Fe^{+++}$ (hidroksil radikali) (fenton reaksiyonu)
8. $H_2O_2 + O_2^{\cdot-} \rightarrow \cdot OH + OH^- + O_2$ (hidroksil radikali) (Haber-Weiss reaksiyonu)
9. $O_2^{\cdot-} + Fe^{+++} \rightarrow O_2 + Fe^{++}$
10. $RH + \cdot OH \rightarrow R\cdot + H_2O$ (alkil radikali)
11. $R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot$ (peroksil radikali)



Şekil 1.6. Oksijen molekülünün suya indirgenmesi sırasında serbest radikallerin oluşması.

1.6.1.1. Süperoksit radikali

Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest süperoksit radikal anyonu (O_2^-) meydana gelir. Süperoksit, bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak asıl zarardan sorumlu değildir. Asıl önemi, hidrojen peroksit'e kaynaklık etmesi ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (Deby and Pincemail, 1998). İki süperoksit radikali birbiri ile etkileşerek biri oksitlenirken diğeri ise indirgenir ve böylece H_2O_2 ve O_2 meydana gelir.



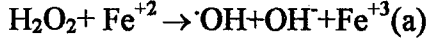
Süperoksit radikallerinin ortamdan temizlendiği bu tepkimeye dismutasyon tepkimesi denir (Fridovich , 1995). Çeşitli kimyasal bileşikler ve fiziksel etkenler canlılarda süperoksit radikali oluşumuna neden olurlar. Bazı koşullarda görünür bölge ışınları da dahil olmak üzere, özellikle bütün yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar oksijenli ortamda süperoksit radikali oluştururlar (Erenel et al. 1993).

1.6.1.2. Hidrojen peroksit

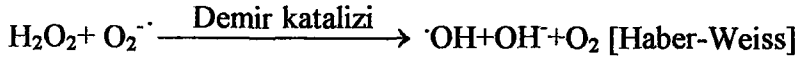
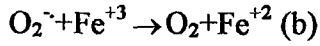
Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden 2 elektron alması veya süperoksitin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü 2 hidrojen molekülü ile birleşerek hidrojen peroksit (H_2O_2) meydana getirir. H_2O_2 membranlardan kolayca geçebilen, uzun ömürlü bir oksidandır. Aslında elektron yapısı nedeniyle radikal tanımına uymasa da güçlü bir oksidan ajan olması ve süperoksit veya demirle reaksiyona girerek hidroksil radikalının oluşmasına neden olmasından dolayı hidrojen peroksit, genellikle oksijen türevi serbest radikallerle birlikte anılmaktadır (Barber and Harris, 1994). Süperoksit ve hidrojen peroksit radikallerinin hasar oluşturma potansiyelleri oldukça azdır ve katalizör metallerin yokluğunda ortamdan derhal uzaklaştırılırlar (Cheesman and Slater, 1993).

1.6.1.3. Hidroksil radikali

Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$), hidrojen peroksitin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle meydana gelir. Bu dönüşümler Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları olarak bilinmektedir.



[Fenton]



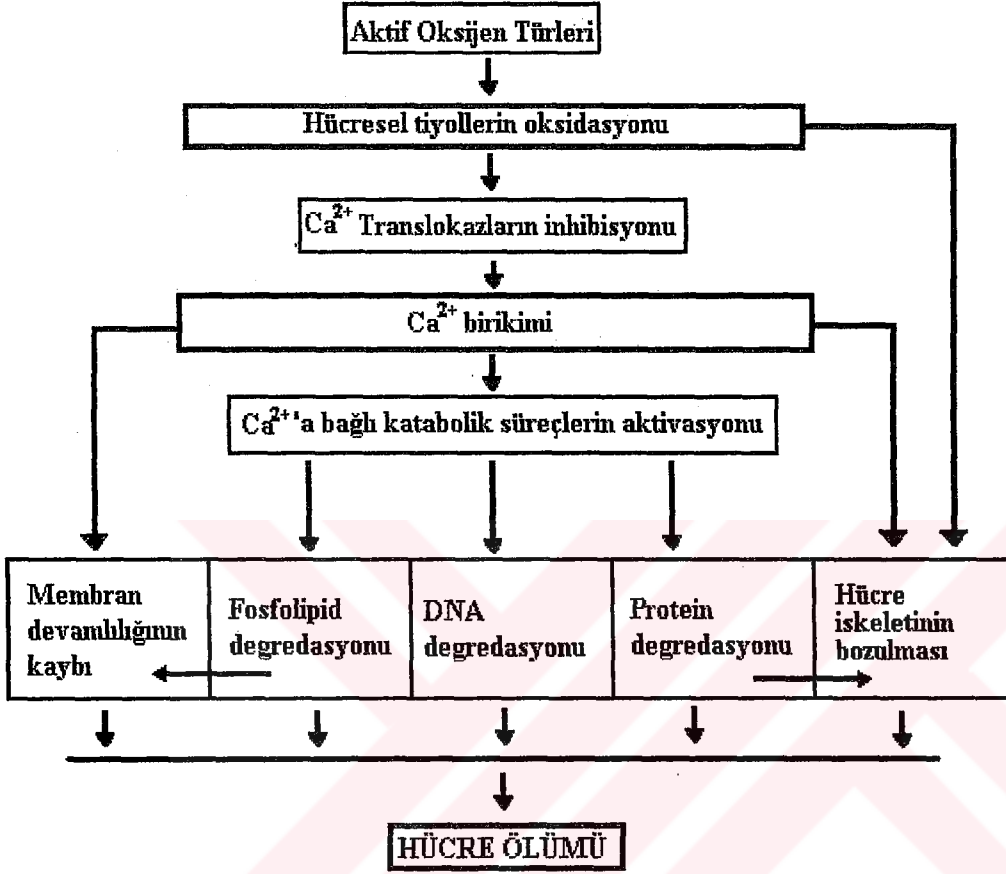
Canlı dokuda meydana gelen en reaktif radikal türlerinden biridir. Yarı ömrü oldukça kısa (10^{-6} - 10^{-9}) ve diffüzyonu kısıtlı olduğu için çok düşük miktarlarda tüm hücresel elemanlara büyük hasarlar verebilmektedir. Örneğin, membran lipitlerine etki ederek zar sisteminin bozulmasına neden olabilmektedir (Basaga, 1990; Halliwell, 1989).

1.6.2. Serbest radikallerin etkileri

Serbest radikallerin daima doku hasarlanmasına neden oldukları veya patolojik durumda rol aldıkları söylenemez. Nitekim, biyolojik faaliyetler için önemli görevler üstlenen serbest radikaller de mevcuttur. Serbest radikallerin organizmaya yararlı oldukları bazı durumlar; fagositoz olayında aktive nötrofillerden salınarak bakterilerin etkisiz hale getirilmesi, hücre bütünlüğünün korunması, mitokondriyal oksidasyon, hemoglobinin oksijen taşıması ve DNA replikasyonu şeklinde özetlenebilir (Akkuş, 1995; Keusch, 1993).

Birçok fizyolojik reaksiyonda rol oynayan serbest radikaller, aşırı miktarda üretildiğinde veya antioksidan savunma sistemleri yetersiz kaldığında biyomoleküller ve doku bileşenlerinde hasar meydana getirirler. Serbest radikaller, hücrenin lipid,

protein, DNA ve karbohidrat gibi tüm önemli yapılarına etki ederler (Reilly et al., 1991; Poli et al., 1993) (Şekil 1.7).



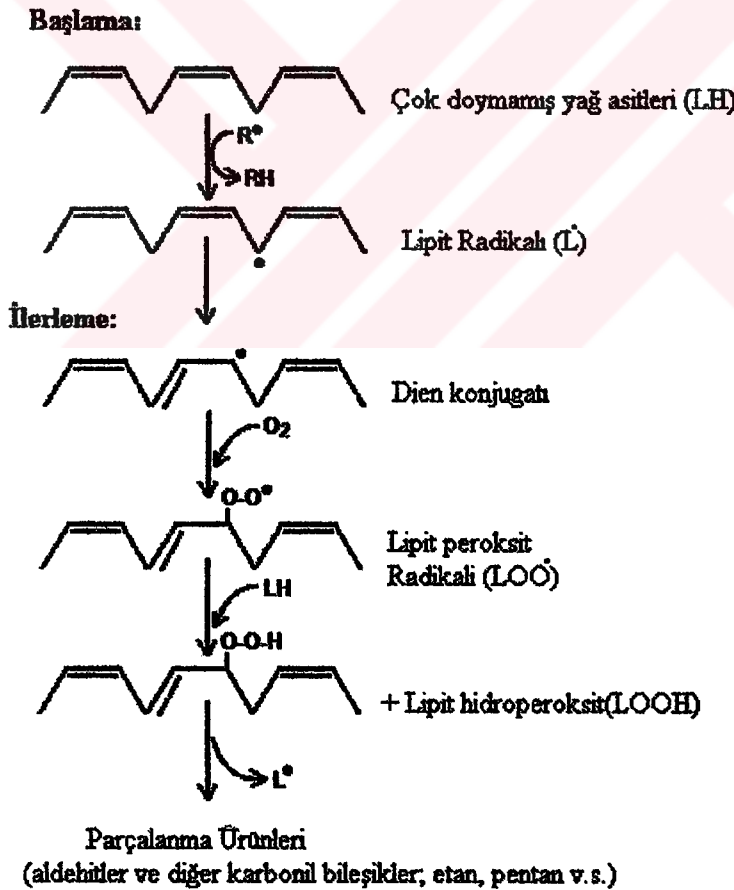
Şekil 1.7. Serbest radikallerin hücresel hasar yapma mekanizmaları.

1.6.2.1. Membran lipitlerine etkileri (Lipit peroksidasyonu)

Lipit peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan ve zar yapısındaki çok doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olay olarak tanımlanmaktadır (Halliwell, 1996; Halliwell and Chirico, 1993). Bu kimyasal olay organizmada oluşan kuvvetli oksitleyici bir radikalın zar yapısındaki çok doymamış yağ asidi zincirindeki α -metilen gruplarından hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır (Şekil 1.8). Biyolojik sistemlerde bu serbest radikalın süperoksit anyonu ve hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Bununla birlikte lipit peroksidasyonunun uyarılmasında asıl etkili radikalın hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) olduğu

bildirilmektedir. Bu radikal süperoksit radikalinden veya H_2O_2 'ten demirin katalizörlüğünde meydana gelmektedir. Bu reaksiyonlar Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları olarak adlandırılmaktadır.

Serbest radikal etkisi ile yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asidi zincirinin radikal niteliği kazanmasına neden olmaktadır. Böylece oluşan lipit radikali ($L^\cdot$) dayanıksız bir bileşik olup, bir dizi değişikliğe uğramaktadır. Öncelikle, molekül içi çift bağ aktarılması (rezonans) ile dien konjugatları oluşmaktadır. Daha sonra lipit radikalın moleküler oksijen ile reaksiyonlaşması sonucu lipit peroksit radikali ($LOO^\cdot$) meydana gelmektedir. Bu lipit peroksit radikalleri de zar yapısındaki çok doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumunu sağlamakta, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksitlerine ($LOOH$) dönüşmektedir. Böylece, reaksiyonun oto-katalitik bir biçimde yürümesi sağlanmaktadır (Halliwell and Chirico, 1993).



Şekil 1.8. Lipit peroksidasyonu reaksiyonları.

Lipit peroksidasyonu, lipit hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesi ile sona ermektedir. Bu bileşiklerden biri olan malondialdehit (MDA) miktarı, tiyobarbitürik asit testi ile ölçülmekte ve bu yöntem lipit peroksit düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra, peroksidasyon sırasında oluşan dien konjugatlarının ölçümü de *in vivo* lipit peroksitlerinin düzeyini yansıtmaya açısından giderek önem kazanmaktadır. Lipit hidroperoksitlerinin parçalanması ile oluşan etan, bütan ve pentan gibi gazların tayini de, son yıllarda lipit peroksidasyon göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Halliwell, 1996; Halliwell and Chirico, 1993).

Lipit peroksidasyonunun, zar yapısındaki değişiklikler nedeni ile zar işlevinin bozulması, oluşan serbest radikallerin enzimler ve diğer hücre bileşenleri üzerine etkisi, son ürünler olan aldehitlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden olduğu düşünülmektedir. Her üç olayında eşit derecede etkili olduğu veya birlikte yada birbirlerinin ardınca etkili oldukları ileri sürülmektedir. Bununla birlikte, aldehit yapıları bileşiklerin uzun yaşam süreli ve zarları geçebilme özelliğinde olması, lipit peroksidasyonunun hedef organlardaki etkilerinden bu bileşiklerin sorumlu olduğunu düşündürmektedir (Esterbauer, 1982).

1.6.2.2. Proteinlere etkileri

Proteinlerin serbest radikaller tarafından etkilenme dereceleri aminoasit kompozisyonuna bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallere duyarlılığı yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, methionin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana gelirler. Bu reaksiyonlar sonucu proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur. Proteinlerde kırılmalar, çapraz bağlanmalar ve agregasyonlar oluşabilir. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Nitekim, serum proteinlerinde, kataraktlı lens proteinlerinde ve inflamatuvar eklem hastalığı olan kişilerin sinoviyal sıvılarındaki IgG'lerinde serbest radikal hasarı tespit edilmiştir (Akkuş, 1995).

Serbest radikallerin proteinler üzerine etkileri çok güçlü olmadıkça, hasar yapabilme aktiviteleri oldukça düşüktür. Serbest radikallerin proteinler üzerine etkileri,

eğer hücre içinde birikiyorlarsa o zaman tehlikeli boyutlara ulaşır. Ancak radikallerin etkisi proteinlerin sadece spesifik bir bölgesinde kalıcı durumda ise, hücreler bundan fazlaca etkilenmeksizin gelişmeye devam edebilirler. Örneğin; metal iyonlarından bakır, proteinlerin histidin aminoasitlerine bağlanabilme özelliğine sahiptir ve bu noktada oluşacak herhangi bir hasar, söz konusu iyonun proteine bağlanmasını engeller. Bu durumda metal iyonları ile H_2O_2 , iyon-protein bağlantısının olacağı bölgede hidroksil radikallerini oluşturur. Bu radikaller metal iyonun bağlanma noktasında reaksiyona girer ve bu bölgede spesifik hasar meydana gelmiş olur (Akkuş, 1995; Tappel and Dillard, 1981).

1.6.2.3. Nükleik asitlere etkileri

Hücre çekirdeği ve nükleik asitler de serbest radikallerin etkisine oldukça duyarlıdır. İdrarda oksitlenmiş nükleobazların bulunması DNA'nın oksidatif hasara maruz kaldığını gösterir. Hem hidroksil radikali (OH) hem de tekil oksijen (O_2), nükleik asitlerde pürin yada pirimidin arasında ayırım yapmaksızın tepkimeye girerler. Hidroksil radikali, nükleik asitlerde doymuş karbon atomlarından hidrojen atomu çıkarır veya çift bağlara katılma tepkimeleri ile sonuçlanan reaksiyonlarda rol alırlar. Hidroksil radikallerinin pürin, pirimidin bazları ve pentozlarla tepkimeye girme hızı; sabit moleküllerin diffüzyon limitine yakındır. Bu nedenle nükleik asitlere yakın bir bölgede üretilen her hidroksil radikali, kolaylıkla tepkimeye girme yeteneğine sahiptir. Tekil oksijenin nükleik asitlerle tepkimeye girme yeteneği daha sınırlıdır. Tekil oksijen (O_2), güçlü bir oksitleyici olduğundan guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren moleküllerle daha kolay tepkimeye yol açarlar. Sitotoksiste büyük oranda nükleik asitlerdeki baz modifikasyonlarından meydana gelen DNA değişikliklerine bağlıdır (Akkuş, 1995).

1.6.2.4. Karbohidratlara etkileri

Serbest radikallerin karbohidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelirler. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere

bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece, kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar. Poliansatüre yağ asitleri ve karbohidrat oksidasyonunun bir ürünü olan glioksal'ın hücre bölünmesini inhibe ettiği kaydedilmiştir (Cerutti, 1994; Akkuş, 1995).

Bağ dokusunun önemli bir mukopolisakkariti olan hyalüronik asit, sinoviyal sıvıda da bol bulunur. Enflamatuvar eklem hastalıklarında sinoviyal sıvıya çok sayıda polimorf hücreler geçer ve muhtemelen immün komplekslerle aktivasyonları sonucu ekstrasellüler sıvıya H_2O_2 ve O_2^- salgırlar. Bu radikallerin *in vitro* hyalüronik asiti parçaladıkları gösterilmiştir. Gözün vitreus'unda da bol miktarda hyalüronik asit bulunur. Burada meydana gelen oksidatif hasar da katarakt oluşumuna katkıda bulunur (Bulkley, 1983).

Monosakkarit otooksidasyonunun, proteinlerde çapraz bağlanmalara neden olarak diyabetik katarakt gelişmesine ve mikroanjiyopati oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (Halliwell, 1994).

1.6.3. Serbest radikaller ve diyabet

Diyabette oksidatif aktivitenin (serbest radikal üretiminin) artışı, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersizliği, proteinlerin glikozilasyonu, özellikle kontrolsüz diyabetlilerde ateroskleroz, retinopati, nefropati, nöropati gibi diyabetik komplikasyonlara neden olur (Kalak et al., 1996).

Nonenzimatik glikozilasyon, otooksidatif glikozilasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yolu aktivitesi, enflamatuvar mediatörlerin düzeyleri ile antioksidan savunma sistemindeki değişiklikler, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan doku hasarı diyabette oksidatif stresi artıran mekanizmalardır (Baynes, 1991).

Serbest radikaller diyabetin daha sonraki komplikasyonlarında olduğu kadar, diyabetin oluşmasında da etkilidir. Serbest radikallerin etkisiyle oluşan pankreas beta hücresinin hasarı tip I diyabetin oluşumuna yol açar. Diyabetin başlamasında oksidasyonun rol oynadığına dair bulguların çoğu deney hayvanlarında diyabet oluşturan iki ilaç olan alloxan ve streptozotosin (STZ) ile yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Bu kimyasal maddelerin her ikisi de oksidan madde oluşturarak Langerhans

adacıklarını selektif olarak tahrip ederler. Bunlardan alloksan intrasellüler redüktanlar olan askorbat ve tiyoller ile reaksiyona girerek onların antioksidan etkilerini engeller ve böylece oksidan üretimine sebep olur. STZ'nin etki mekanizması ise daha az anlaşılmıştır. Alloksan toksisitesi *in vitro* ve *in vivo* metal şelatlayıcı ajanlar, süperoksit dismutaz, katalaz, hidroksiradikal parçalayıcıları ve lipitte çözünebilir antokisadanlar ile inhibe edilebilir (Wolff, 1993).

1.7. Katarakt Gelişim Mekanizması

Lens saydamlığının görme keskinliğini azaltacak derecede bozulmasına katarakt denir. Katarakt gelişiminde lensin yapısında belirgin bozulmalar ortaya çıkar. Lensin saydamlığı daha çok hücresel düzenleme ile ilişkili olduğundan yapısal olarak zarar gören böyle bir dokuda saydamlık değerlendirmesi kolaydır. Lensin saydamlığı, büyük ölçüde lens hücrelerinin makromoleküler komponentlerinin çok düzenli dizilim göstermelerine ve ışığı dağıtan komponentlerdeki kırıcılık indeksi farklarının çok küçük olmasına bağlıdır. Normalde lens tamamen saydam olmayıp ışığın yaklaşık %5'ini yansıtır. Bu yansıtmanın yaklaşık yarısı hücre membranlarına bağlıdır. Lens saydamlığı, protein yapının düzeni ve ilişkilerine bağımlı olduğundan bu yapılardaki küçük değişiklikler bile kesifleşmelere yol açabilir. Bu tip kesifleşmelere yol açabilecek değişiklikler, proteinlerde kümeleşme (agregasyon), doku hidrasyonu bozuklukları, hücre membranlarında yıkım olayları ve hücre iskeletindeki değişikliklerdir (Karel et al., 1997).

1.7.1. Senil katarakt

Yaşın ilerlemesiyle, katarakta neden olan çeşitli faktörlerin etkisinde artma ve lensin kendini koruma kapasitesinde azalma meydana gelir. Katarakta elektrolit ve su dengesinin bozukluğu gösterilmiştir. Lenste Na^+ ve Cl^- artışı karşısında K^+ miktarı düşerken lens içine Ca^{+2} birikimi olur. Bunun sonucunda hücre hidrasyonunda artış, lens hücrelerinde şişme ve gerilme sonucu yırtılma meydana gelir. Hücre membranındaki geçirgenlik artışı, iyon geçişini hızlandırır. Bu durumdan sadece iyonlar

değil küçük moleküller de etkilenir. Böylece lensten karbohidrat, aminoasit ve küçük peptidlerin kaybı olur (Lucas et al., 1986).

Kataraktlı lenste protein değişikliği en fazla suda çözünen kısımda meydana gelir. Yaşlanmayla yüksek molekül ağırlıklı protein agregatlarında, dolayısıyla lensin saydamlığını kaybetmesinde bir artış durumu görülür. Bu agregatların hücre membran yüzeyinde bulundukları yerler, muhtemelen erken oksidatif tahribatın başladığı yerlerdir (Paterson and Delamere, 1992).

1.7.2. Oksidatif tahribat ve katarakt

Lens içinde, oksidatif moleküller tahribattan sorumlu oksidan ajanların kesin tabiatı bilinmemektedir. Oksijen bunlardan biridir. Süperoksit, hidrojen peroksit ve hidrojen radikalleri de aynı gruptur. Bu oksijen radikalleri göz içinde fotooksidasyon ve iyonize radyasyon sonucu oluşabilir (Fridovich, 1984).

Aminoasitler, özellikle de hücre membranında yer alan methionin ve sistein, oksidasyona karşı hassastırlar. Oksidasyonla aminoasit grupları arasında disülfid bağları oluşmakta, bu da yüksek molekül ağırlıklı protein agregatlarının oluşmasına yol açmaktadır (Spector, 1984). Ayrıca kalsiyum yüksekliği protein agregasyonunu hızlandırmaktadır. Transport mekanizmasında yer alan enzimlerinde oksidasyonla direkt olarak tahrip olduğu düşünülmektedir. Na-K ATPaz'ın, hidrojen peroksitle inhibisyona uğradığı gösterilmiştir. Oksidasyon, Ca-ATPaz enziminde de tahribat yapmaktadır (Delamere et al., 1983).

1.7.3. Diyabetik katarakt

Diyabet iki tip katarakt gelişimine sebep olur. Tipik senil katarakt diyabette erken yaşta başlayarak hızlı bir ilerleme gösterir. Senil katarakt, diyabet varlığında 9.6 yıl daha erken matürleşir (Cotlier, 1981).

Gerçek diyabetik katarakt morfolojik olarak tipik, iki taraflı beyaz benekli veya kar tanesi görünümünde subkapsüller opasitelerle karakterizedir. Metabolik kontrolü iyi olmayan genç hastalarda hızla, bazen birkaç gün içinde olgunlaşır. Ani miyopiye sebep



olan bu opasiteler, erken safhada iyi metabolik kontrol sağlanırsa geri dönüşümlü olabilmektedir (Paterson and Delamere, 1992).

Diyabette artan glukoza bağlı olarak lenste bazı değişiklikler meydana gelir. Lense giren aşırı miktarda glukoz, glikolizin anahtar enzimi olan hekzokinazı uyarır. Bu da lens proteinlerinin aşırı glikozilasyonuna ve poliyol yolunun aktivasyonuna neden olur. Böylece lenste sorbitol/fruktoz oranı zamanla artar ve sorbitol birikimi olur. Hücre zarından kolayca geçemeyen sorbitol gibi poliyollerin birikimiyle ciddi ozmotik stres meydana gelir, su tutulumu artar ve hücrel bütünlük bozulur. Su tutulumu nedeniyle şişen lens fibrillerinde, membran geçirgenliği bozulur ve konsantrasyon gradiyentine karşı lenste yüksek düzeyde bulunan potasyum, aminoasit, glutatyon, inozitol ve ATP azalırken sodyum ve klor iyonları artmaya başlar. Sekonder ozmotik değişikliklerin de olaya katılmasıyla lens membranı tüm substratlara karşı geçirgen hale gelir. Diyabetik katarakta Na-K pompa fonksiyonu da bozulur ve Na-K ATPaz enzimi azalır (Brownlee et al., 1984; Kinoshita, 1974).

1.7.4. Ultraviyole ışını ve katarakt

Lens esas olarak güneş kaynaklı oldukça fazla miktarda uzun dalga boyundaki ultraviyole ışınlarına maruz kalmaktadır. Yapılan çalışmalarda güneş ışığına fazlaca maruz kalan ülkelerde ve bu tür mesleklerde çalışanlarda katarakt insidansı yüksek bulunmaktadır. Ultraviyole ışınlarının lenste yaptığı metabolik hasar tam olarak bilinmemesine karşın oksidatif olayların artımı ile oluştuğu sanılmaktadır. Ultraviyole ışınları katarakt gelişiminde risk faktörü olarak kabul edilmekte ve korunma önem kazanmaktadır (Karel et al., 1997).

1.8. Antioksidanlar

Organizmada serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Serbest radikallerle antioksidanlar arasındaki hassas denge korunamadığı takdirde hücre hasarına kadar giden birçok patolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır.

Antioksidanların ilk belirlenen etkileri zar yapısında bulunan lipidlerin peroksidasyonuna karşı korunması olmuştur. Bunun sonucu olarak, başlangıçta antioksidanlar lipid peroksidasyonunu engelleyen moleküller olarak tanımlanmışlardır. Günümüzde ise, antioksidanların tanımı lipidlerin yanı sıra, proteinler, nükleik asitler ve karbohidratlar gibi diğer hedef molekülleri koruyucu etkilerini de içerecek şekilde genişletilmiştir. Böylece, antioksidanlar hedef moleküllerdeki oksidan hasarı engelleyen veya geciktiren maddeler olarak tanımlanmakta ve bu tanımla bağlantılı olarak antioksidanların etkileri farklı şekillerde olabilmektedir (Yalçın, 1998).

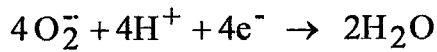
Başlıca antioksidan etki çeşitleri şunlardır:

- 1- Reaktif oksijen türlerinin enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla veya doğrudan temizlenmesi,
- 2- Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun baskılama yoluyla engellenmesi,
- 3- Metal iyonlarının bağlanması ve böylece radikal oluşum reaksiyonlarının engellenmesi,
- 4- Hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri veya temizlenmesi.

Antioksidanlar şu şekilde sınıflandırılabilirler:

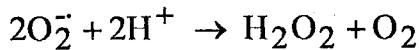
1.8.1. Enzimler

Sitokrom oksidaz: Mitokondrilerde solunum zincirinin en son basamağında yer alan ve bakır içeren bir enzimdir. Solunum zincirindeki görevini sürdürürken süperoksit radikalının suya dönüşümünü de sağlar.



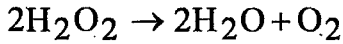
Ancak süperoksit radikallerinin oluşumu çoğu kez enzimin kapasitesini aşar ve diğer enzimlerin devreye girmesiyle süperoksit radikalının zararlı etkileri engellenir (Yalçın, 1998) (Şekil 1.9).

Süperoksit dismutaz: Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi, süperoksit radikalının hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar. Böylece hücre içindeki süperoksit radikali düzeylerini azaltır (Şekil 1.9).



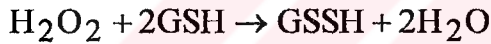
SOD'nin insanlarda iki izoenzimi vardır. Bunlar, sitozolde bulunan dimerik yapıdaki bakır ve çinko içeren Cu, Zn-SOD ile mitokondrilerde bulunan tetramerik yapıdaki Mn içeren Mn-SOD'dır. Bu iki enzimden Cu, Zn-SOD siyanürle inhibe olurken, Mn-SOD siyanürden etkilenmez. SOD'nin fizyolojik görevi, hücreleri süperoksit radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Oksijen kullanımı yüksek olan dokularda, SOD aktivitesi fazladır. Buna karşılık ekstrasellüler sıvılarda SOD aktivitesi çok düşüktür (Yalçın, 1998).

Katalaz: Katalaz enzimi hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalayan reaksiyonu katalizler (Şekil 1.9)

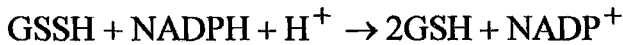


Katalaz enzimi peroksizomlarda yerleşmiş olup yapısında dört tane hem grubu bulunur. Peroksidaz aktivitesi de vardır ve hidrojen peroksit, metil hidroperoksit gibi küçük moleküllere etki ederken lipit hidroperoksitlerine etki etmez (Yalçın, 1998).

Glutatyon peroksidaz: Sitozolde yerleşik bir enzim olan glutatyon peroksidaz (GSH-Px), tetramer yapısındadır ve 4 selenyum atomu içerir. GSH-Px, hidrojen peroksitin ve organik hidroperoksitlerin (ROOH) indirgenmesini sağlar Şekil (1.9).



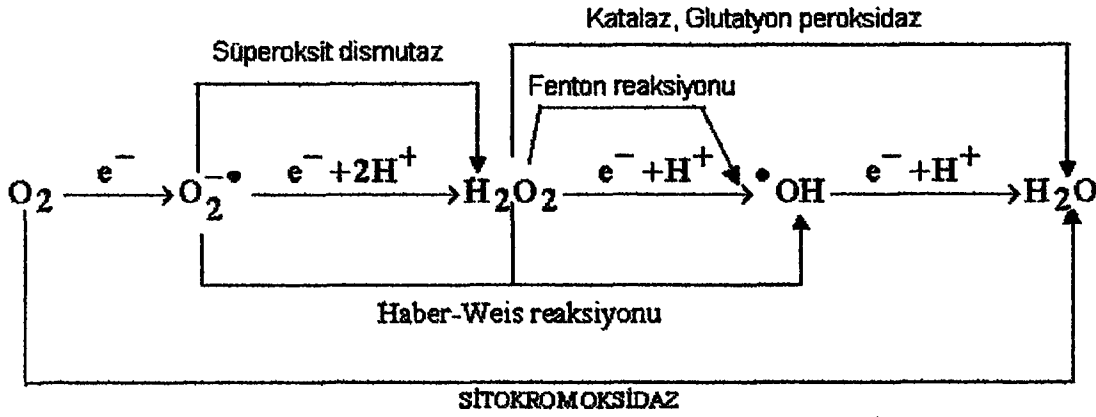
GSH-Px'nin iki substratı vardır. Substratlardan biri olan peroksitler alkole indirgenirken, diğer substrat olan glutatyon (GSH) yükseltgenir. Oluşan yükseltgenmiş glutatyon (GSSH), glutatyon redüktaz enziminin katalizlediği bir başka reaksiyon ile tekrar indirgenmiş glutatyona dönüşür (Yalçın, 1998).



Glutatyon transferaz: Dimerik yapıdadır. Esas olarak sitozolde bulunur, çok sayıda izoenzimi vardır. Yabancı maddelerin biyotransformasyonunda önemli rolleri olan



GSH-transferazlar çeşitli endojen ve eksojen bileşiklerin glutatyonla konjugasyonunu katalizler (Yalçın, 1998).



Şekil 1.9. Antioksidan enzim sistemi.

1.8.2. Küçük moleküller

Askorbik asit (C vitamini): Askorbik asit, suda çözünür vitaminlerdendir. İnsanlarda sentezlenmediğinden diyetle alınması gerekir. Özellikle yeşil renkli taze sebze, meyve ve turuncgillerde bol miktarda bulunur. İnce bağırsaklardan kolayca emilir. Isıtmaya dayanıksız, dondurulmaya dayanıklıdır. Dokularda ve plazmada askorbat iyonu şeklinde bulunur. Askorbik asitin organizma için önemi, indirgeyici gücünün yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Bu özelliği ile hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. Askorbik asit aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Süperoksit radikali, hidroksil radikali ve tekil oksijen ile kolayca reaksiyona girerek onları etkisizleştirir. Sulu fazda bulunmasına karşın lipid peroksidasyonunu başlatıcı radikalleri temizleyerek lipidleri ve zarları da oksidan hasara karşı korur. E vitamininin rejenerasyonunda da görev alan C vitamini tokoferoksil radikalının alfa-tokoferole indirgenmesini sağlar. Böylece E vitamini ile birlikte etkin bir şekilde LDL' yi oksidasyona karşı korur. Askorbik asit, ferri-demiri (Fe^{+3}) ferro-demire (Fe^{+2}) indirgeyen süperoksit radikali dışındaki tek hücre içi moleküldür. Bu etkisiyle, ferri-demiri indirger ve fenton reaksiyonunda H_2O_2 ile etkileşmeye uygun olan ferro-demire dönüştürür. Böylece süperoksit radikalının üretimine neden olur. Bu özelliği C vitamininin pro-oksidan etkisine neden olmaktadır (Biekalski et al., 1997).

Glutasyon: Glutasyon (GSH), başta karaciğer olmak üzere pek çok dokuda yüksek düzeylerde bulunan ve glutamat, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptiddir. Glutasyon aerobik hücrelerde önemli bir radikal temizleyici olarak bilinmektedir. Önemli bir suda çözünür antioksidan ve indirgeyici ajandır. Glutasyonun pek çok metabolik görevi vardır. GSH-peroksidaz, GSH-redüktaz ve GSH-tranferaz gibi enzimler için bir koenzim olarak görev alır. Glutasyon, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidan hasara karşı korur. Ayrıca, protein yapısındaki sülfhidril (-SH) gruplarını indirgenmiş halde tutarak pek çok proteinin ve enzimin inaktivasyonunu engeller. Aminoasitlerin membrandan transportunu sağlar. İndirgenmiş glutasyon (GSH) çeşitli reaksiyonlarla yükseltgenerek, yükseltgenmiş glutatona (GSSH) dönüştür. GSSH' un tekrar indirgenmesi NADPH' nin de kullanıldığı bir reaksiyonla olur. Bu şekilde dokularda GSH/GSSH oranı yüksek tutulur (Frei, 1994).Deneyisel diyabetik hayvan çalışmalarında GSH miktarında aşırı bir düşüş olduğu görülmüştür. Yapılan bu çalışmalarda GSH'ın düşüşüne paralel olarak MDA miktarında artış tespit edilmiştir(Lee and Chung, 1999).

E Vitamini: E Vitamini tokoferol ve tokotrienol türevlerini kapsayan bir vitamindir. Antioksidan aktivitesi en yüksek olan tokoferol alfa-tokoferol'dür. Yapısındaki fenolik hidroksil grubuna sahip olan aromatik halka, aktif kısmını oluşturur ve molekülün antoksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır. Bitkisel yağlar ve tohumlar, E vitamini bakımından zengin kaynaklardır. Diyetle alınan E vitamini yağda çözünmüş haldedir. Yağ sindirimi sırasında açığa çıkar ve emilir. Emilebilmesi için safra asiti düzeylerinin de normal sınırlarda olması gerekir. E vitamini herhangi bir taşıyıcı protein olmadan pasif diffüzyonla emilir. Güçlü bir antioksidan olarak, zarda bulunan fosfolipitlerin yapısındaki çok doymamış yağ asitlerini (poliansatüre yağ asitleri, PUFA) serbest radikallerin etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. Bir alfa-tokoferol molekülü 100 molekül PUFA'nın peroksidasyonunu engelleyebilir. E vitamini, süperoksit ve hidroksil radikallerini, tekil oksijeni, lipit peroksitlerini ve diğer radikalleri indirger, nitrik oksit ile de reaksiyona girebilir. E vitamini ile GSH-peroksidaz serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. GSH-peroksidaz oluşan peroksitleri ortadan kaldırırken, E vitamini peroksitlerin yapımını engeller. E vitaminin zincir kırıcı antioksidan olarak başlıca fonksiyonu, lipit peroksitlerini etkisizleştirerek peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktır. Bu

sırada oluşan tokoferoksil radikali stabil bir moleküldür, glukuronik asit ile konjuge olur ve safra yolu ile atılır (Biekalski et al.,1997).

Karotenoidler ve retinoidler: Karotenoidler havuç, domates, fasulye, portakal ve diğer narenciyelerde bulunan bitki pigmentleridir. Bu karotenoidlerden başlıcası, A vitaminin metabolik ön maddesi olan beta-karotendir. Retinoidler plazmada lipoproteinler ve retinol bağlayıcı protein aracılığıyla taşınırlar. Beta-karoten ve likopen gibi retinoidler LDL yapısında yer alır ve LDL'yi oksidasyona karşı korurlar. Karotenoidler, flavinler ve porfirinler gibi triplet uyarıcıların zararlı etkilerini baskılama, tekil oksijeni baskılama ve peroksil radikallerinin temizlenmesi gibi yollarla hücreleri oksidan strese karşı korurlar (Frei,1994).

Ubikinonlar: Ubikinonlar lipitlerde çözünen ve izoprenoid takı içeren kinon türevleridir. Soya yağı, et, balık gibi besinlerde ve bazı sebzelerde bulunurlar. İndirgenmiş şekilleri olan ubikinoller ubikinonlara kıyasla antioksidan olarak çok daha etkilidirler. İnsanlarda bulunan temel ubikinon, ubikinon-10 (Koenzim Q) dur. Esas görevi olan solunum zincirindeki redoks taşıyıcılığının yanında, oksijen kaynaklı radikaller ve tekil oksijen ile etkileşerek lipit peroksidasyonunun başlamasını ve biyomoleküllerin hasar görmesini engeller (Frei, 1994).

Flavonoidler: Lipitlerde çözünen antioksidanlar sınıfından olan flavonoidler bitkilerdeki kırmızı, mavi ve sarı renk pigmentlerini oluşturan polifenollerdir. Başlıca; elma, portakal, limon gibi meyveler ile patates, karnabahar gibi sebzelerde bulunurlar. Çay gibi bitkisel kaynaklı içecekler de yer alırlar. Flavonoidlerin farklı yollarla lipit peroksidasyonunu engellediği belirtilmiştir:

- a. Peroksidasyonu başlatan radikalleri tutarlar.
- b. Metal iyonlarını bağlarlar.
- c. Radikal oluşturucu enzimleri inhibe ederler.

Ancak, bazı flavonoidlerin metal iyonlarıyla etkileşerek pro-oksidan etki yaptığı da saptanmıştır (Frei,1994).

Melatonin: En zararlı radikallerden hidroksil radikalini ortadan kaldıran güçlü bir antioksidandır. Melatoninin hidroksil radikali ile reaksiyona girdikten sonra bir indolil katyon radikaline dönüştüğü ve bu radikalinde süperoksit radikalini tutarak antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Melatoninin bir diğer önemli özelliği lipofilik olmasıdır. Böylece hücrenin bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gibi

kan-beyin engelini de kolayca geçer. Bu nedenlerle çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite gösterir. Melatoninin yüksek dozlarda ve uzun süre kullanımında bile toksik etkisi gözlenmemiştir. Ayrıca bazı antioksidanlar gibi prooksidan aktivitesi de yoktur (Reiter, 1997).

Ürik asit: Ürik asit normal plazma konsantrasyonlarında antioksidan etki gösteren bir moleküldür. Antioksidan etkisinin çeşitli kaynakları vardır:

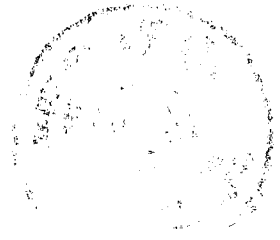
- Demir ve bakır iyonlarını bağlayarak etkisizleştirir.
- Tekil oksijen, hipoklorit, hidroksil, süperoksit ve peroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerini temizler.

Lipit radikalleri üzerine etkisi yoktur. Ayrıca C vitaminini oksidasyona karşı korur (Frei, 1994).

Albumin: Yapısında bulunan çok sayıdaki sülfhidril grubu aracılığıyla bakır iyonlarını bağlar ve lipit peroksidasyonunun başlamasını engeller. Bakır iyonlarının bağlanmasıyla protein yapısında hasar ortaya çıkar, ancak albümin yarı ömrü oldukça kısa olan bir protein olduğundan kolaylıkla yenilenebilmektedir. Böylece, bakır iyonlarının diğer proteinlerdeki sülfhidril gruplarına bağlanması ve proteinleri hasara uğratması engellenmiş olur. Albümin kanda serbest yağ asitlerinin ve bilirubinin taşıyıcısıdır. Bilirubinin lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği ve süperoksit ile hidroksil radikallerinin toplayıcısı olduğu bildirilmiştir (Yalçın, 1998).

1.8.3. Aspirin ve aminoguanidin ilaçlarının antioksidan etkileri

Aspirin ve aminoguanidinin diyabetik katarakt gelişmesini yavaşlatan antioksidan ilaçlar olarak rol oynadıkları tespit edilmiştir (Dilsiz et al., 1999). Bu ilaçların *in vitro* ortamda lens proteinlerinin glikasyonunu engellediği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda aminoguanidin, lipit peroksidasyonunun reaktif aldehit ürünleri ile reaksiyona girerek oksidatif hasara uğramış düşük dansiteli lipoproteinlerin alınımını engellediği bildirilmiştir. Aspirinin ileri glikozilasyon son ürünlerinin oluşumunda glukoz ile proteinlerin amino gruplarına bağlanmada yarıştığı ve bu ürünlerin akümüülasyonunu önlediği bildirilmiştir (Riley and Harding, 1993; Sugimoto and Yagihashi, 1997).



Aspirinin kullanılması ile katarakt oluşumunun durdurulmasına yönelik olarak epidemiyolojik çalışılmalar yapılmaktadır. Aspirinin düşük dozlarda da olsa alınımının katarakt riskini yarıya indirdiği bildirilmiştir (Riley and Harding, 1993). Bunlara ilave olarak kataraktın gelişmesindeki bazı değişik modellerin *in vitro* çalışmalarda elde edilen veriler aspirinin koruyucu etkisini göstermektedir. Aspirin lens proteinlerinin glikasyonunu engeller. Diyabetik sıçanlarda aspirinin katarakt oluşumunu engellediği görülmüştür (Riley and Harding, 1993). Bu çalışmamızda aspirinin bulunduğu ortamda MDA oluşumunun azaldığı görülmüştür. Lens proteinlerinin aspirin ile pre-inkübasyonunda MDA ve lens proteinleri arasındaki başlangıç reaksiyonlarının azaldığı ve buna ilave olarak aspirin ile inkübasyon sonucunda γ -kristalinin proteinlerinde disülfit olmayan kovalent bağlarının oluşumu azalır. Meydana gelen bu mekanizma tam olarak bilinmemektedir. Proteinlerin enzimatik olmayan karbamilasyonu üzerindeki çalışmalar aspirinin protein asetillenmesinde önemli bir koruyucu etkiye sahip olduğu sonucunu ortaya koymuştur. Aspirin hemoglobin ve albumininde içinde olduğu çeşitli proteinlerin amino gruplarının asetilasyonunda rol aldığı bildirilmiştir. Anti-inflamatuar ilaçların *in vivo* ortamda katarakta karşı koruyucu etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir. Aspirin trombositlerde prostaglandin sentezini engellediği gibi lense etkileyen MDA miktarının oluşumunu da azaltır (Riley and Harding, 1993).

Diğer taraftan bir nükleofilik hidrazin bileşiği olan aminoguanidin (AG) sadece ileri glikasyon son ürünleri (AGE) oluşumunu engellemez, aynı zamanda NO sentezini de engeller. STZ-Diyabetik sıçanlara tedavi amacıyla uygulanan AG, AGE birikimini engelleyerek periferik sinir yapı ve fonksiyon değişiklikleri iyileştirilmesinde veya endoneurial kan akışının düzenlenmesinde rol aldığı görülmüştür. Bununla birlikte STZ-Diyabetik sıçanlarda sinir dokusunda kan akışına paralel olarak endoneurial kılcal damarlarda spesifik yapısal değişikliklere maruz kalıp kalmadığını ve AG uygulamasının kılcal damar patolojisine nasıl etki ettiği tam olarak bilinmemektedir. Diyabetik sıçanlarda anormal endoneurial kılcal damar yapılarının AG ile iyileştirilmesi mekanizması henüz açık değildir. Bir düşünceye göre AG etkili olarak AGE birikimini engeller ve endoneurial kılcal damarlardaki kollajenlerin kros reaksiyon oluşumunu önleyerek korur. AG, NO sentaz (iNOS)'ın bir inhibitörü olarak da görev aldığı unutulmamalıdır (Sugimoto and Yagihashi, 1997).



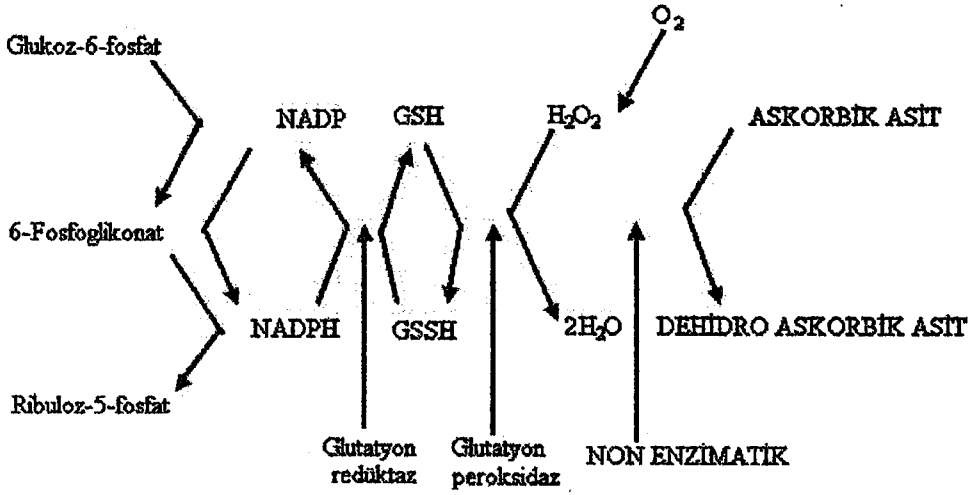
1.9. Lensde Oksidan ve Antioksidan Faktörler

Lens, oksidatif faktörlerden ışık ve oksijene devamlı maruz kalır. Oksijeni kamaralar sıvısından alır. Oksijen indirgenirken, süperoksit anyonu, hidroksil radikali, lipit peroksit gibi toksik oksijen radikalleri ve reaktif oksijen metabolitleri oluşur (Biobizhavey and Costa, 1994). Oksijenden başka çeşitli ksenobiotikler, naftalin ve kinon gibi maddeler de lenste serbest radikaller oluşturulabilirler (Bhuyan and Bhuyan, 1991). Bu radikal ve reaktif metabolitler membran fosfolipitlerinin ve proteinlerin oksidasyonuna sebep olmaktadır. Tüm bunlar lensin opaklaşmasına ve katarakt oluşmasına neden olur (Mizuno et al., 1992).

Lipit peroksidasyon (LPO), serbest radikaller tarafından başlatılan ve membrandaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan, hücre ölümü(apoptosis) ile sonuçlanan patofizyolojik bir olaydır. LPO sonucu oluşan Malondialdehit (MDA) gibi ürünlerin hücre içindeki çeşitli bileşiklerin fonksiyonel grupları (proteinlerin amino grupları, nükleik asitlerin bazları, fosfolipitlerin azotlu bazları ve sülfhidril gruplarının -SH grupları gibi) ile reaksiyona girerek membran hasarına ve enzim inaktivasyonuna neden olduğu ileri sürülmektedir (Biobizhavey and Costa, 1994).

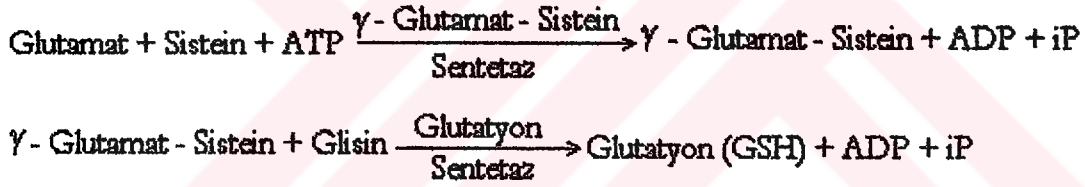
Lensi bu oksidan maddelere karşı çok iyi koruyan çeşitli enzimatik sistemler ve serbest radikaller ile savaşan çeşitli endojen maddeler mevcuttur. Başlıca enzimatik sistemler; süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz olup, endojen maddeler ise GSH, vitamin C (askorbik asit) ve vitamin E (tokoferol)' dir (Lerman, 1992).

Lenste bulunan askorbik asit serbest oksijen radikallerinin giderilmesini sağlar (Şekil 1.10). Dehidroaskorbat/askorbat redoks çifti ise pentoz-fosfat yolu ile lensin glukoz kullanımını hızlandırır (Varma et al., 1987). Askorbik asitin *In vitro* katarakt oluşumunu önlediği, GSH' daki azalmayı ve LPO' daki artışı engellediği belirtilmiştir (Uğuz, 1993).



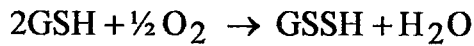
Şekil 1.10. Glutatyon ve askorbik asitin antioksidan etkileri.

Glutatyon lens içinde sentezlenen bir tripeptittir. Glisin, sistein ve glutamik asitten oluşur (Şekil 1.11). Total lens ATP üretiminin %7.8' i GSH sentezi için kullanılır (Mitton et al., 1993).



Şekil 1.11. Glutatyon sentezi.

Glutatyonun çoğu indirgenmiş haldedir. %6.8 ise okside durumdadır. GSH ve GSSH arasında;



dengesi bulunur. GSH lenste en çok epitel, sonra kortekste, en az da nükleusda mevcuttur. Aköz humorda ise miktarı oldukça azdır. Lens GSH düzeyleri 2-17 $\mu\text{mol/g}$ değerleri arasında değişir (Saxena et al., 1992).

GSH'nun lenste başlıca iki önemli görevi vardır. Bunlardan ilki, lens proteinlerinin tiyol gruplarının indirgenmiş formda tutulmasıdır. Bunu sülfhidril

gruplarının yerine kendini okside olarak önler. Böylece kristalinlerin çapraz bağlanmalarını engeller ve çözünmeyen yüksek moleküllü proteinler oluşmaz. GSH'un ikinci önemli fonksiyonu ise membranda katyon transportu için önemli olan –SH gruplarını korumaktır. Bu gruplar katyon transportunda Na-K ATPaz pompası için gereklidir. Yüksek molekül ağırlıklı membran proteinlerinin –SH gruplarının oksidasyonu ile katyonlar için geçirgenlik artarken, Na-K ATPaz'ın –SH gruplarının oksidasyonu ile bu katyonların aktif transportu azalır. Bu da lens içi elektrolit dengesizliğine ve osmotik hasara neden olur (Uğuz, 1993). Oksidan maddelerin en önemlisi olan hidrojen peroksit (H_2O_2) lenste glutatyon(GSH), glutatyon peroksidaz ve pentoz fosfat yolu reaksiyonları ile detoksifiye edilir. Lenste H_2O_2 miktarı radyo izotop yöntemi ile çeşitli deney hayvanlarında çok düşük olarak tespit edilmiştir (Devamonoharan et al., 1991). Bu fizyolojik sınırlar aşıncı pentoz-fosfat yolu aktivitesi azalır, GSH düzeyi normal halde tutulamaz ve oksidatif hasarlar meydana gelir.

Glutatyon düzeyi kataraktın bütün çeşitlerinde azalır. Lens GSH'u azaldıkça protein tiyollerı okside olur. Pentoz fosfat yolu aktivitesi ve NADPH/ NADP oranı azalır. Protein tiyollerı okside olarak proteinler arasında disülfid bağları oluşur (Xie et al., 1991).

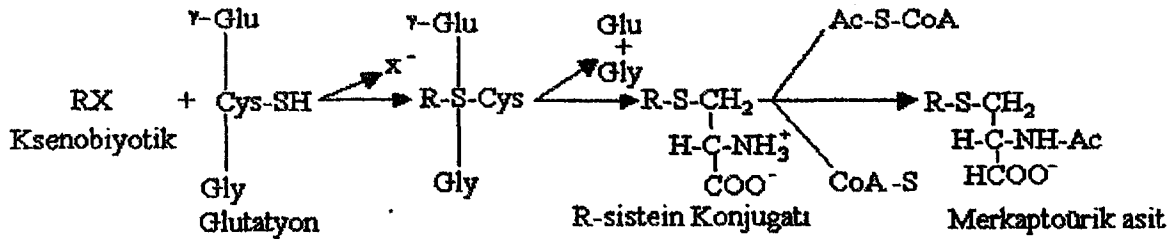
Lenste GSH azalmasının sebepleri şunlardır:

- a. Total protein tiyollerının kaybı,
- b. Glikolitik ATP üretiminin inhibisyonu,
- c. Mitokondri ve hücre membranlarının lipit peroksidasyonu ,
- d. Mitokondrial transmembran potansiyelinin azalmasıdır (Mitton et al., 1993).

Lenste GSH miktarının yaşlanma ve diyabete paralel olarak azaldığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Yarat et al.,1993).

GSH'ın diğer bir önemli fonksiyonu da ksenobiotiklerin detoksikasyonunda rol almasıdır. Lens ve diğer oküler dokularda merkaptörik aside dönüştüğü ve lens dışına atıldığı belirtilmiştir (Cherian and Rwal, 1991).

Glutatyon-ksenobiotik konjugatları atılmadan önce metabolize olurlar. Glutatyonun glutamil ve glisinil grupları spesifik enzimlerle koparılır ve asetil grubu (asetil CoA)’ndan geride kalan sisteine bağlanır. Bu oluşan madde merkaptöürik asittir yani L-asetilsisteinin bir konjugatıdır. Lenste merkaptöürikasit yolunda glutatyon-S-transferaz enziminin aktivitesi diğerlerinden daha fazladır (Robert and Murray, 1990)(Şekil 1.12).



Şekil 1.12. Merkaptöürik asit yolu.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Deney Hayvanları

Deneylerde kullanılan Wistar-Albino cinsi sıçanlar, Elazığ Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi. Penceresinde havalandırma tertibatı bulunan odada özel olarak hazırlanmış kafeslerde bakıma alınan sıçanların, deneysel uygulama yapılacak safhaya ulaşıncaya kadar bakımlarına devam edildi.

2.2. Deney Hayvanlarının Beslenmesi

Deney hayvanlarının beslenmesinde kullanılan yem, Elazığ Yem Fabrikasında özel olarak yaptırıldı. Elazığ Yem Fabrikasından temin edilen yemin bileşiminde bulunan katkı maddeleri, Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Deney hayvanlarına verilen yemin bileşimi.

Yem Maddeleri	Yüzdesi (%)
Buğday	10
Mısır	21
Arpa	14
Kepek	8
Soya Küspesi	25
Balık unu	8
Et-Kemik unu	4
Melas	4
Tuz	4
Vitamin Karması	1
Mineral karması	1

2.3. Deneysel Uygulamalar

Deneysel çalışmalara başlamadan önce, çıkabilecek aksaklıkların asgariye indirilmesi amacıyla ön çalışma yapıldı. Mevcut laboratuvar şartlarımızda, deneysel diyabet oluşumunun kaçınıcı günlerde meydana geldiğini gözlemleyerek; kontrol, STZ, STZ+ Aminoguanidin ve STZ+Aspirin olmak üzere toplam 4 grup oluşturulup deneysel uygulama başlatıldı.

1.Grup: Kontrol grubu (n=6)

2.Grup: STZ grubu (n=8)

3.Grup: STZ+Aminoguanidin (n=8)

4.Grup:STZ+Aspirin (n=8)

Çalışmada vücut ağırlıkları ortalama 200 g olan 30 adet Wistar-Albino türü erkek sıçanlar kullanıldı. Her 4 grupta bulunan sıçanlar aynı laboratuvar ortamında tutuldu. 12 saat aydınlık, 12 saat karanlıkta kalacak şekilde kafeslere konuldu. Tüm gruplara aynı standart sıçan yemi verilerek yiyecek alımları sağlandı ve hayvanların günlük takipleri yapıldı. Tüm sıçanların kuyruk veninden kan örnekleri alınarak bazal glukoz düzeylerine bakıldı. Çalışmanın başlangıcında ve her hafta düzenli bir şekilde ağırlık artışları kaydedildi.

1.Grup: Kontrol Grubu: 6 adet sıçandan oluşan bu grubun 6 hafta sonra lensleri alınarak lens proteinlerinde glikasyon oluşumuna bakıldı. Gruptaki sıçanların bazal ve 6 hafta sonra örneklerin alınması öncesinde olmak üzere toplam 2 kez kan şekerlerine bakıldı.

2.Grup: STZ Grubu: 8 adet sıçandan oluşan bu gruba, 60 mg/kg olacak şekilde tek doz STZ (Sigma Chemical Co., St.Louis, USA) 0.1 M Fosfat-Sitrat tamponunda (pH:4.5) çözündürülerek, intraperitoneal olarak uygulandı. Bir hafta sonra, kuyruk veninden alınan kanın glikometre cihazındaki ölçümü sonucu açlık kan glukozu 250 mg/dl'yi geçen sıçanlar, diyabetik olarak kabul edildiler. Deneklerin açlık kan glukoz düzeylerini saptamak için, kan örnekleri 12 saatlik açlık sonrasında sabah saat 9.00 – 10.00 arasında alındı. Haftada iki kez kan glukozuna bakılan hayvanlara, hergün aynı saatte (sabah saat 10.00 – 11.00 arası) uygun dozda insülin (Insulatard) enjeksiyonu subkutan olarak yapıldı. Sıçanların hiperglisemik durumlarını kontrol altına almak için Tor ve ark.'nın (1995) belirttiği şekilde insülin dozu ayarlanmıştır (Tablo 2.2).

3.Grup:STZ+Aminoguanidin Grubu: İkinci grupta olduğu gibi, diyabetik hale getirilen 8 adet sıçanın haftada iki kez düzenli olarak kan glukozuna bakılarak hergün aynı saatte insülin enjeksiyonu yapıldı. Aminoguanidin (Sigma Chemical Co.,St.Louis, USA) hergün 25 mg/kg dozunda 500 ml musluk suyunda çözülerek verilmek suretiyle uygulandı.

4.Grup:STZ+Aspirin Grubu: İkinci grupta olduğu gibi diyabetik hale getirilen 8 adet sıçanın haftada iki kez düzenli olarak kan glukozuna bakılarak hergün aynı saatte

insülin enjeksiyonu yapıldı. Aspirin (Sigma Chemical Co.,St.Louis,USA) hergün 25 mg/kg dozunda 500 ml musluk suyunda çözülerek verilmek suretiyle uygulandı.

Tablo 2.2. Deneysel diyabette sıçanlar için önerilen ağırlık ve glisemi düzeyine göre insülin dozu.

Ağırlık	Kan glukoz miktarı			
	180-250 (mg/dl)	250-350 (mg/dl)	350-400 (mg/dl)	450-600 (mg/dl)
150-175 gr.	0.8 Ü	1.0 Ü	1.2 Ü	1.4 Ü
175-200 gr.	1.0 Ü	1.2 Ü	1.4 Ü	1.6 Ü
200-225 gr.	1.2 Ü	1.4 Ü	1.6 Ü	1.8 Ü
225-250 gr.	1.4 Ü	1.6 Ü	1.8 Ü	2.0 Ü
250-275 gr.	1.6 Ü	1.8 Ü	2.0 Ü	2.2 Ü

2.4. Lens Örneklerinin Alınması

Eter koklatılarak bayıltılan sıçanların gözleri ameliyat sehpasında operasyonla alındı. Operasyonla alınan gözler ince uçlu bir pensle filtre kağıdı üzerine konulduktan sonra bistüri bıçağı ile lens korneadan ayrıldı. Lensler, darası alınmış olan eppendorf tüplerde ağırlıkları rapor edildikten sonra -70°C 'de analiz edilinceye kadar bekletildi.

2.5. Protein Analizi

2.5.1. SDS-poliakrilamid jel elektroforezis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE elektroforez jel sisteminde akrilamid monomerlerinden yararlanılır. Amonyum persülfat (APS) gibi bir serbest radikal ile TEMED gibi stabilizatörü sağlayıcı ortamda akrilamid monomerleri uzun zincirler oluşturacak şekilde polimerleşmekte ve daha sonra oluşan bu uzun zincirler arasında yanal bağlantılar oluşarak jel meydana gelmektedir. SDS-PAGE analizinde jelin yapısında yer alan sodyum dodesilsülfat (SDS) deterjanın bulunması ile proteinler kendilerini oluşturan monomer alt birimlerine ayrılmaktadır. Böylece protein agregasyonu önlenmektedir. SDS moleküllerine bağlanan denatüre polipeptidler negatif yük kazanırlar. SDS

bağlantılı polipeptid kompleksleri, molekül ağırlıklarına bağlı olarak jel içerisinde hareket ederler. Hareket eden moleküllerin ağırlıkları; aynı jel üzerinde bulunan bir standartla karşılaştırılarak tespit edilir. Mutasyon geçirmiş veya çeşitli olumsuz çevre faktörleri sonucunda canlı organizmanın bir kısım proteinlerinden normale göre parça kopması veya parça ilavesi yada bazı proteinlerin yeterince sentezlenmemesi gibi özellikler bu jel sisteminde tespit edilmeye çalışılır.

Protein moleküllerinin hareketi güç kaynağından gelen elektrik akımına göre negatif (-) kutuptan pozitif (+) kutuba doğru olur. İncelenecek protein molekülleri şayet 0-43 kDa aralığına tekabül ediyorsa akrilamidin konsantrasyonu %15, 40 kDa'dan yukarı ise akrilamidin konsantrasyonu %10 veya daha aşağı düşürülür. Diğer bir ifade ile molekülün ağırlığı arttıkça akrilamidin konsantrasyonu düşürülür. Akrilamid konsantrasyonunun artışı jel içerisindeki ara boşlukların daha sık olmasına sebep olmaktadır. Dolayısıyla protein moleküllerinin hareket hızı da azalmaktadır (Laemmli, 1970).

2.5.1.1. Kullanılan çözeltiler

1. 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8.)
2. 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8.)
3. % 10 Sodyum dodesilsülfat çözeltisi (SDS)
4. %30 Akrilamid/Bisakrilamid çözeltisi
5. %10 Amonyum persülfat çözeltisi (APS)
6. N, N, N', N', -tetrametil-ethilendiamin (TEMED)
7. Gliserin
8. 2-β-merkaptoethanol
9. %0,05 Bromofenol blue çözeltisi
10. Boyama çözeltisi (Stain solusyon/100 ml):
 - %0.1 Coomassie blue R-250
 - %45 Metanol
 - %10 Glasiyal asetik asit
 - %45 Distile su



11. Boya çıkarma çözeltisi (Destain solusyon/100ml):

%45 Metanol

%10 Glasiyal asetik asit

%45 Distile su

12. Tank solusyonu (Running buffer, pH 8.3):

Tris base 9.0 gr.

Glisin 43.0 gr.

Distile su 600 ml.

2.5.1.2 . SDS-PAGE için jellerin hazırlanması

Separating (ayırma) jelinin hazırlanması (%12)	Miktar
Distile su	3,35 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 ml
% 10 SDS	100 µl
Akrilamid /Bis (%30)	4.0 ml
Amonyum persülfat (%10)	50 µl
TEMED	5 µl
Toplam	10.0 ml.

Stacking jelin hazırlanması (%4)	Miktar
Distile su	6.1 ml
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2.5 ml.
SDS (%10)	100 µl
Akrilamid-Bis (%30)	1.3 ml
Amonyum persüfat (%10)	50 µl
TEMED	10 µl
Toplam	10.0 ml



Örnek solusyonların hazırlanması	Miktar	Son konsantrasyon
1 M Tris-HCl (pH6.8)	1.25 ml	0.125 M
% 10 SDS	1.6 ml	%4
%0.05 bromofenol blue	0.2 ml	%0.002
Gliserol	0.8 ml	% 20
2- β -merkaptoethanol	0.4 ml	%10
Distile su	3.75 ml	-
Toplam	8.0 ml	-

2.5.2. Lens örneklerinin hazırlanması

Lensler protein analizleri için 1:10 w/v oranında TE solusyonunda (Tris-HCl 5 mM, pH 8.0 ; β -merkaptoethanol, 5 mM; EDTA, 1 mM ve Sodyum azit %0.05), +4 °C' de homojenize edildi. Homojenat 30.000 x g 'de oda sıcaklığında 30 dakika süre ile santrifüj edildi. Süpernatant kısım serbest proteinler olarak yeni tüplere aktarıldı. Serbest olmayan proteinlerin (membran ve agregasyona uğrayan proteinler) oluşturduğu pelet ise iki kez TE solusyonunda yıkanıp santrifüj edildi. Peleti oluşturan bu proteinler %1'lik SDS içerisinde oda sıcaklığında 20 dakika süre ile bekletilerek serbest hale dönüşümleri sağlanmıştır.

2.5.3. Lens proteinlerinin SDS-PAGE ile analizi

Serbest ve serbest olmayan protein örnekleri Laemmli (1970) tarafından belirtildiği şekildi hazırlanan SDS-PAGE ile incelendi.

Jel oluşturmak için uygun bir pozisyonda tutturulan iki cam arasına yerleştirilmek üzere 10 ml' lik separating jel solusyonu hazırlandı. Hazırlanan bu jel solusyonu iyice karıştırıldı ve uygun bir otomatik pipet yardımıyla belirli kısımlardan sıkıştırılarak kaset haline getirilen iki cam levha arasına aktarıldı. İki cam levha arasına jel ilave edilirken üst kısımda tarak dişlerinin yüksekliği kadar ($\approx$ 1cm) bir boşluk bırakıldı. Hazırlanan kaset şeklindeki bu iki cam levha arasındaki jel yaklaşık olarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek aralarındaki akrilamid monomerlerinin polimerleşmesi sağlandı. Daha sonra iki cam levhanın üst kısmına örnek sayısına uygun sayıda dişe sahip tarak yerleştirildi.

Tarak dişlerinin aradolgu maddesi olarak ifade edilen stacking jel 10 ml kadar hazırlandı. Hazırlanan bu jel solusyonu iyice karıştırıldı ve uygun bir otomatik pipet yardımıyla, jel kasetine yerleştirilmiş olan tarak dişleri arasındaki boşluklar dolduruldu. Bu dolgu iki camın en üst seviyesine kadar tamamlandı. Stacking jel çok çabuk polimerize olduğundan işlemlerin kısa sürede yapılmasına dikkat edildi. 25-30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek polimerleşme sağlandı. Tarak, polimerleşmesi tamamlanan jelden çıkarıldı. Bu işlem sırasında jel de meydana gelen ve örneklerin bırakılacağı yuvaların bozulmamasına dikkat edildi. Cam levhalardan oluşan kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Protein çözücü solusyonu; 0,125 M Tris (pH 6.8), %2'lik SDS, %0.002 oranında Bromofenol mavisi, %20'lik gliserol, %10'luk merkaptioethanol şeklinde hazırlandı. Yaklaşık olarak 150 μ l olarak alınan her bir protein örneğine eşit oranda çözücü solusyondan ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Tarak dişinin genişliğine bağlı olarak, hazırladığımız karışımdan 10-20 μ l kadar transfer edildi. Tank içerisine yeterli miktarda tank solusyonu ilave edildi.

Güç kaynağından önce düşük bir voltajla (150 V) akım elektroforeze verildi. 5-10 dakika sonra voltaj değeri yükseltildi (180-200 V). Çıplak gözle izlenilebilen mavi boya bandı jelin alt kısmına gelince elektroforez cihazı kapatıldı.

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra kaseti oluşturan iki cam birbirinden ayrılarak aradaki jel çıkarıldı. Protein bantlarının görünür hale gelebilmesi için bu jel % 1.25'lik Coomassie blue boya ortamına alındı. Burada en az yarım saat en çok bir gece boyunca oda sıcaklığında bekletildi.

Boya solusyonundan alınan jel boyayı giderici solusyon (destain solusyon) ortamına alındı. Arasına çalkalanarak protein bantlarının dışındaki boya maddesi uzaklaştırıldı. Boya giderici solusyonda 5'er dakika bekletildi ve solusyon döküldü. Jel tekrar boya giderici ortama alındı ve bu işlem 2-3 kez tekrarlandı. Böylece jel üzerinde bulunan protein bantlarının dışındaki boya giderilmiş oldu. Jel üzerinde görünür hale gelen protein bantlarının fotoğrafları bir kamera yardımıyla çekildi.

2.5.4. Lens örneklerinde protein miktar tayini

Örneklerdeki protein miktarı modifiye edilmiş Lowry (1951) yöntemine göre; Protein Assay Kit (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)'i kullanılarak ölçüldü. Bu

yöntemin ilkesi; proteinlerin alkali ortamda Folin-Fenol ayıracı ile mavi bir renk oluşturmalarıdır. Ortama sodyum dodesil sülfat ilave edilerek serbest olmayan lipoproteinlerin serbest duruma getirilmesi sağlanmıştır. Protein konsantrasyonları kalibrasyon kurvesi esas alınarak değerlendirilmiştir.

Yöntem:

1. Standart için hazırlanmış mikrosantrifüj tüplerine, değişik protein konsantrasyonlarında hazırlanmış protein standart solusyonlarından 1'er ml alındı.
2. Kör için hazırlanmış mikrosantrifüj tüpüne 1 ml distile su alındı.
3. Örnekler için hazırlanmış mikrosantrifüj tüplerine, TE solusyonu ile 1/10 w/v oranında homojenize edilmiş lens örneklerinden 0,1 ml alındı ve distile su ile 1 ml'ye tamamlandı.
4. Standart, kör ve örnek tüplerinin herbirine 0,1 ml sodium deoxycholate solusyonundan ilave edildi, vorteksle karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
5. Standart, kör ve örnek tüplerinin herbirine 0,1 ml TCA ilave edildi ve vorteksle iyice karıştırıldı.
6. Solusyonların pelet ve süpernatant kısımlarının ayrılması için tüpler 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
7. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısım döküldü ve pelet üzerinde işlemlere devam edildi.
8. Tüplere 1 ml Lowry ayıracı ilave edildi ve pelet bu solusyonda iyice çözüldükten sonra 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı.
9. Daha sonra, pelet süspansiyonunun alındığı tüp 1,5 ml distile su ile yıkandıktan sonra ilk süspansiyonun konulduğu tüpe aktarıldı ve iyice karıştırıldı.
10. Solusyonlar oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi.
11. Daha sonra herbir tüpe 0,5 ml Folin-Fenol ayıracı ilave edildi ve iyice karıştırıldı.
12. Renk oluşumu için oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi.
13. Daha sonra standart ve örnek absorbansları 740 nm'de köre karşı okundu.

14. Değişik konsantrasyonlarda hazırlanmış protein standartlarının absorbansları ile bir kalibrasyon kurvesi çizildi ve elde edilen formüle göre örneklerdeki protein miktarları hesaplandı.

2.6. Lens Örneklerinde Lipit Peroksit Ölçüm Yöntemi

Lens örneklerinde lipit peroksit ölçümü, Ohkawa ve ark.'nın (1979) geliştirdikleri yöntemle yapıldı.

Prensip: Doku MDA tayini, aerobik şartlar altında ve pH:3.5'te lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'nın TBA ile oluşturduğu pembe renkli kompleksin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü prensibine dayanır.

Homojenat hazırlanması: Sıçanlardan alınan lenslerin tartımları yapıldı. Net ağırlıkları belirlenen lensler, her gram başına 9 ml % 1.15'lik KCl olacak şekilde sulandırıldı ve +4°C'de homojenize edildi.

Ayırıcılar:

1. % 8.1'lik Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)
2. %20'lik Glasiyal Asetik Asit (GAA, NaOH ile pH 3.5'e ayarlanır.)
3. % 0.8 Tiyobarbitürik asit (TBA) (Günlük hazırlanır.)
4. n-Bütanol/Piridin (15:1, v/v)
5. Stok standart (1,1,3,3 tetrametoksipropan)



Yöntem:

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Standart	-	0.2	-
Homojenat %10	-	-	0.2
SDS %8.1	0.2	0.2	0.2
GAA %20	1.5	1.5	1.5
TBA (sulu) %0.8	1.5	1.5	1.5
Saf su	0.8	0.6	0.6

95°C'deki su banyosunda 1 saat bekletildikten sonra soğuk su altında soğutuldu.

Tüplere;

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

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

Hesaplama:

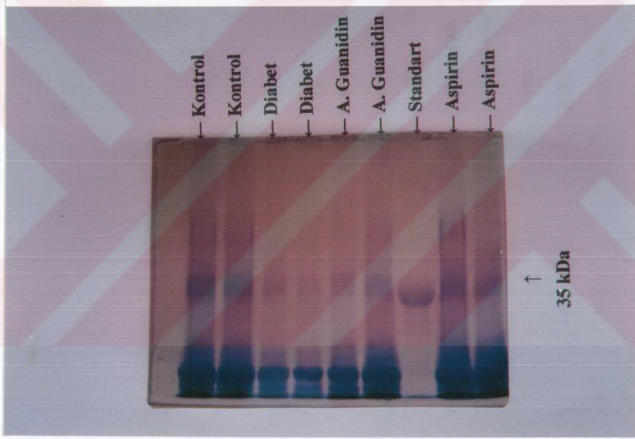
$$\text{MDA}(\text{nmol/gr yaş doku}) = \frac{\text{Örnek absorbanı}}{\text{Standart absorbanı}} \times \text{Standart konsantrasyonu}$$

3. SONUÇLAR

3.1. Protein Analiz Sonuçları

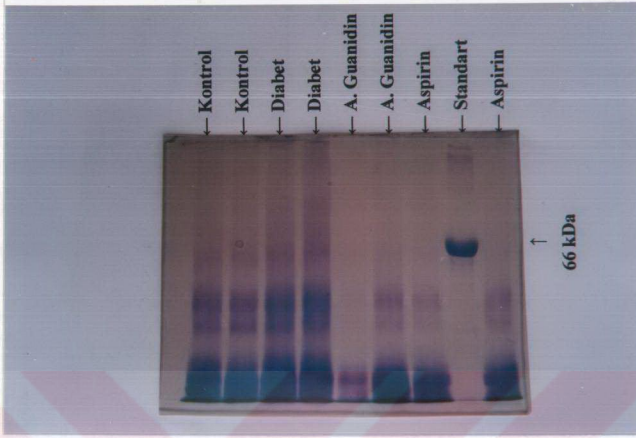
3.1.1. SDS-PAGE elektroforez ile sıçan lens örneklerinin protein analiz sonuçları

Lens örneklerinin SDS-PAGE elektroforez ile yapılan protein analizinde genel olarak kontrol serbest protein fazında protein artışı, diyabetik lens örneklerinde ise bir azalma görülmüştür. Diğer taraftan antioksidan ilaçlardan aspirin ve aminoguanidin uygulanan diyabetik sıçan lenslerinin serbest protein bantlarındaki yoğunluk kontrole yakın bir durum göstermiştir (Fotoğraf 3.1).



Fotoğraf 3.1. Sıçan lens örneklerinin serbest protein fraksiyonları.

Buna karşılık fotoğraf 3.2’de görüldüğü gibi diyabetik sıçan lensinde serbest olmayan protein yoğunluğunun kontrole göre belirgin bir şekilde fazla olduğu ve ayrıca yüksek molekül ağırlıklı protein bantlarında (agregasyon) da artış olduğu tespit edilmiştir.



Fotoğraf 3.2. Sıçan lens örneklerinin serbest olmayan protein fraksiyonları.

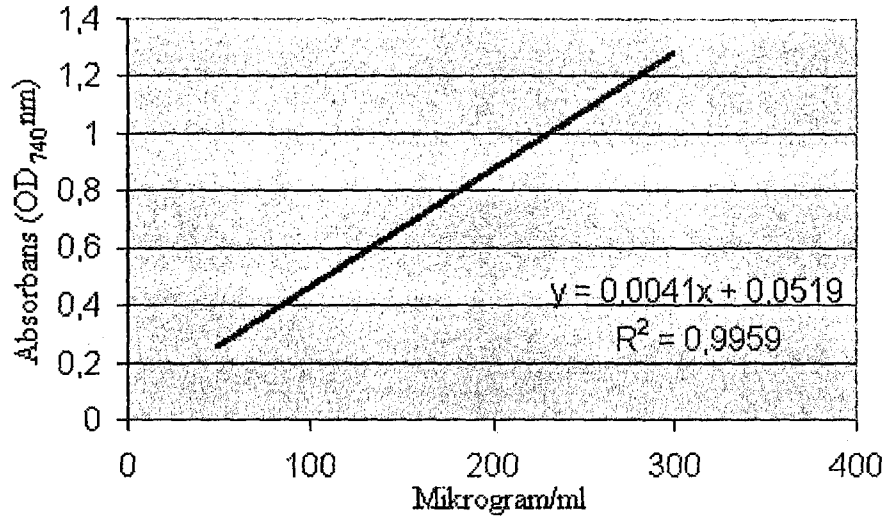
3.1.2. Sıçan lens örneklerinde protein miktar tayini sonuçları

Lens örneklerinin modifiye edilmiş Lowry metodu ile yapılan protein miktar tayininde, Tablo 3.1’de görüldüğü gibi hazırlanan standartlardan okunan absorpsiyon değerleri ile bir kalibrasyon kurvesi elde edilmiştir. Örneklerden elde edilen absorpsiyon değerleri standart kurvede belirtilen formüle uygulanarak protein miktarları tespit edilmiştir (Şekil 3.1).

Tablo 3.1. Standart absorpsiyon değerleri

Standartlar	Konsantrasyon mikrogram/ml	Absorpsiyon OD _{740nm}
1	50	0,264
2	100	0,475
3	200	0,83
4	300	1,306





Şekil 3.1. Standart absorbans değerleriyle elde edilen kalibrasyon kurvesi.

Protein miktarı, aspirin ve aminoguanidin uygulanan gruplarda diyabetli gruba göre kontrole yakın bir durum göstermiştir (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Lens örneklerinden elde edilen protein miktarları.

	100 mg lensteki toplam protein miktarı (mg)	Proteinin lense oranı (%)
Kontrol (n=6)	33,45	%33
Diyabet (n=8)	25,98	%26
Aspirin (n=8)	28,06	%28
Aminoguanidin (n=8)	27,15	%27

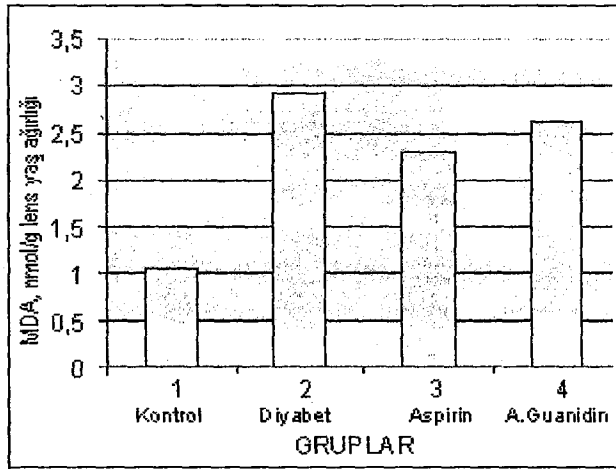
3.2. Lens Dokularındaki MDA Düzeyleri

Sıçan lens dokularından elde edilen MDA değerleri Tablo 3.3'te gösterilmiştir.

Tablo 3.3. Sıçan lens dokularında MDA değerleri

	Kontrol/MDA nmol/g doku yaş ağırlığı	Diyabet/ MDA nmol/g doku yaş ağırlığı	Aspirin/ MDA nmol/g doku yaş ağırlığı	Aminoguanidin /MDA nmol/g doku yaş ağırlığı
1. Örnek	1,056	2,86	2,47	2,29
2. Örnek	1,041	3,01	2,07	2,62
3. Örnek	1,052	2,93	2,36	2,97
4. Örnek	1,059	2,84	2,43	2,60
5. Örnek	1,053	3,02	2,17	2,76
6. Örnek	1,051	3,07	2,28	2,47
7. Örnek	-	2,70	2,21	2,81
8. Örnek	-	3,04	2,41	2,42

Sonuçlar SPSS istatistik programı ile değerlendirilmiş ve kontrol grubunun lens dokusundaki MDA düzeyi $1,052 \pm 0,006$ nmol/g doku yaş ağırlığı, Diyabet grubunun lens dokusundaki MDA düzeyi $2,933 \pm 0,05$ nmol/g doku yaş ağırlığı, Diyabet+Aspirin grubunun lens dokusundaki MDA düzeyi $2,300 \pm 0,12$ nmol/g doku yaş ağırlığı, Diyabet+Aminoguanidin grubunun lens dokusundaki MDA düzeyi ise $2,617 \pm 0,14$ nmol/g doku yaş ağırlığı olarak ölçülmüştür (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Sıçan lens dokularında MDA sonuçları

Sıçan lens dokularındaki MDA değerleri, Aspirin ve Aminoguanidin uygulanan diyabetik sıçanlarda kontrol grubuna göre kısmen arttığı halde ($p < 0,05$); antioksidan ilaç uygulanmamış diyabetli grupta kontrol grubuna göre belirgin düzeyde yüksek ($p < 0,001$) bulunmuştur.

Sıçan lens dokularındaki MDA değerlerinin Aspirin ve Aminoguanidin uygulanan gruplarda diyabet grubuna göre önemli düzeyde azaldığı ($p < 0,01$) belirlenmiştir (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. Sıçan lens dokularında ortalama MDA değerleri

	Kontrol (n = 6)	Diabet (n = 8)	Aspirin (n = 8)	Aminoguanidin (n = 8)
MDA nmol/g doku yaş ağırlığı	1,052 ± 0,006	2,933 ± 0,05 ^b	2,300 ± 0,12 ^a	2,617 ± 0,14 ^a

a: Kontrol grubuna göre; $p < 0,05$

b: Kontrol grubuna göre; $p < 0,001$

4. TARTIŞMA

Oksidatif stresin biyolojik yapılar üzerindeki zarar verici potansiyeli bilinmektedir. Glukoz, poliansatüre yağ asitleri gibi düşük molekül ağırlıklı yapılar, *in vivo* ortamda geçiş metallerinin katalizörlüğündeki oksidasyon sonucu hidrojen peroksit ve lipit peroksitleri oluşturarak, oksidatif strese katkıda bulunmaktadır. Özellikle iyi kontrol edilemeyen diyabette, oksidatif aktivitenin artışı, serbest radikal oluşumunu ve protein glikozillenmesini artırır (Wolff, 1993).

Daha önceki çalışmalarda diyabetik hayvanların plazma, eritrosit, böbrek, retina, lens ve siyatik sinirlerinde lipit peroksidasyon ürünlerinin düzeylerinde artış kaydedilmiştir (Riley and Harding, 1993). Son yıllarda dikkatler kronik hastalıklar ve yaşlılığa *in vivo* olarak serbest radikallerin aracılık ettiği membran hasarı ve antioksidan durum üzerinde toplanmış bulunmaktadır (Halliwell, 1994; Biekalski et al., 1997).

Serbest radikallerin en önemli etkisinin poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu olduğu kabul edilmektedir (Halliwell, 1996). Bu şekilde meydana gelen lipit peroksitleri kolaylıkla yıkılarak, en önemlisi MDA olan, reaktif karbonil bileşiklerini meydana getirirler. Bu nedenle TBA reaksiyonu ile MDA miktarının ölçümü, dokulardaki lipit peroksidasyonunun derecesini yansıtmaktadır (Halliwell and Chirico, 1993).

Aspirin ve aminoguanidinin katarakt gelişmesini yavaşlatan antioksidan ilaçlar olarak rol oynadıkları ileri sürülmüştür. Bu ilaçların *in vitro* ortamda lens proteinlerinin glikasyonunu engellediği tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda aminoguanidin, lipit peroksidasyonunun reaktif aldehit ürünleri ile reaksiyona girerek oksidatif hasara uğramış düşük yoğunluklu lipoproteinlerin alınımını engellediği bildirilmiştir. Aspirin ileri glikozilasyon son ürünlerinin oluşumunda glukoz ile proteinlerin amino gruplarına bağlanmada yarıştığı ve bu ürünlerin akümüülasyonunu önlediği bildirilmiştir (Riley and Harding, 1993; Sugimoto and Yagihashi, 1997).

Çalışmamızda sıçan lens dokularındaki MDA değerleri, aspirin ve aminoguanidin uygulanan diyabetik sıçanlarda kontrol grubuna göre kısmen arttığı halde ($p<0,05$); antioksidan ilaç uygulanmamış diyabetli grupta kontrol grubuna göre belirgin düzeyde yüksek ($p<0,001$) bulunmuştur. Sıçan lens dokularındaki MDA değerlerinin aspirin ve aminoguanidin ilaçları uygulanan

diyabetik gruplarda ilaç uygulanmayan diyabet grubuna göre önemli düzeyde azaldığı ($p<0,01$) görülmüştür.

Çalışmamızda sıçan lens dokusundaki protein miktarı, aspirin ve aminoguanidin uygulanan gruplarda, diyabetli gruba göre kontrole yakın bir durum göstermiştir.

Lens proteinlerinin sentezi, korteksin derin tabakaları ve çekirdekten çok epitel hücrelerde ve korteksin dış tabakalarında meydana gelir. Yetişkin lens çekirdeğinde protein sentezi ya çok az olur ya da hiç olmaz. Protein sentezinde uzun bir süre sonra, yaşlanmayla çeşitli biyokimyasal etkiler protein moleküllerinde değişmelere neden olur. Postsentetik değişimler; yüksek moleküllü proteinlerin oluşumu (agregasyon), disülfid köprülerinin oluşumu, glutamin ve asparagin köklerinin deamidasyonu, polipeptid zincirinin kısmen yıkımı, nonenzimatik glikozilasyonu ve triptofan oksidasyonudur. Kataraktlı olgularda suda çözünen proteinler azalırken, çözünmeyenler hızla artar. Sülfhidril gruplarının oksidasyonu ile oluşan disülfid köprüleri proteinlerin agregat oluşturmaya neden olur. Asparagin ve glutamin amid grubunun karboksil grubuna dönüştüğü deamidasyon reaksiyonları ile proteinlerin (-) yükleri artar. Polipeptid zincirlerinin kısmen yıkımı da proteinlerin asitleşmesine neden olur. Son iki durumda artan asidite, kristalinlerin agregat oluşturmada rol oynayabilir. Nonenzimatik glikozilasyon ile glukoz molekülleri proteinlerin amino grubu ile birleşir ve sonuçta schiff bazı oluşturur. Uzun ömürlü lens kristalin proteinlerinde oluşan ileri glikasyon ürünleri yaşlanma ile birikime uğramaktadır. Bu ürünlerin glikatif ve oksidatif stres varlığında oluşumları ve birikimleri hızlanmakta ve şeffaf olan lensin kahverengileşmesine sebep olmaktadır (Türker, 1988; Brownlee et al., 1984).

Çalışmamızda lens örneklerinin SDS-PAGE elektroforez ile yapılan protein analizinde genel olarak kontrol serbest protein fazında protein artışı, diyabetik lens örneklerinde ise bir azalma görülmüştür. Diğer taraftan antioksidan ilaçlardan aspirin ve aminoguanidin uygulanan diyabetik sıçan lenslerinin serbest protein bantlarındaki yoğunluk kontrole yakın bir durum göstermiştir. Buna karşılık diyabetik sıçan lenslerinde serbest olmayan protein yoğunluğunun kontrole göre belirgin bir şekilde fazla olduğu ve ayrıca yüksek molekül ağırlıklı protein bantlarında da artış olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, antioksidan etkileri bilinen aspirin ve aminoguanidinin hayvanlarda deneysel olarak oluşturulan diyabetik kataraktı önlemede rol aldığını düşünmekteyiz.



KAYNAKLAR

- AKGÜL, E., 1996. Tip II Diabetes Mellituslu Hastalarda Oksidan ve Antioksidan Mekanizmaların İncelenmesi. **Uzmanlık Tezi**, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Elazığ.
- AKKUŞ, İ., 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, 3-95, Konya.
- BALAJI, M. and SASIKALA, K., 1992. Quantitative estimation of amino acids in senile cataract lens. **J. Tamil Nadu Ophthalmic Association**, 30; 49-50.
- BARBER, D.A. and HARRIS, S.R., 1994. Oxygen free radicals and antioxidants. **A.M. Pharm. N.S.**, 34 (9); 26.
- BASAGA, H.S., 1990. Biochemical aspects of free radicals. **Biochem. Cell Biol.**, 68 (7-8); 989.
- BAYNES, J.W., 1991. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, 40; 405-412.
- BEALES, P.E., WILLIAMS, A.J.K., ALBERTINI, M.C. and POZZILLI, P., 1994. Vitamin E Delays Diabetes Onset in the Non-Obese Diabetic Mouse. **Horm. Metab. Res.**, 26; 450-52.
- BENGİSU, Ü., 1990. **Göz hastalıkları**, 3. Baskı, Beta Basım Yayın Dağıtım A.Ş., S.10, 208; 118-132.
- BHUYAN, K.C. and BHUYAN, D.K., 1991. Free radical enhancer xenobiotic is an inducer of cataract in rabbit. **Free Radic. Res. Commun.**, 13(2); 609-620.
- BIEKALSKI, H.K., BOHLES, H., ESTERBAUER, H., FURST, P., GEY, F., HUNSDORFER, G., KASPER, H., SIES, H. and WEISBURGER, J., 1997. Consensus stament: Antioxidant Vitamins in Prevention. **Clin. Nutr.**, 16; 151-155.
- BIOBIZHAVEY, A.M. and COSTA, B.E., 1994. Lipid peroxide and reactive oxygen species generating systems of the crystalline lens. **Biochemica et Biophysica Acta**, 1225(3); 326-337.

- BROWNLEE, M., VIASSARA, H. and CERAMI, A., 1984. Non-enzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. **Ann. Intern. Med.**, 101;527-537.
- BULKLEY, G.B., 1983. The role of oxygen free radicals in human disease process. **Surgery**, 94(3): 407-411.
- CAPPIELLO, M., VALTARELLI, M., GIANNESSE, M., CECONI, I., CAMICI, G., MANAO, G., DEL CORSO, A. and MRA, U., 1994. Glutathione dependent modification of bovine lens aldose reductase. **Exp. Eye Res.**, 58; 4, 491-501.
- CERUTTI, P.A., 1994. Oxy-radicals and cancer. **Lancet**, 844-862.
- CHANDRASEKHER, G. and CERDELLA, R.J., 1995. Protein associated with human lens native membrane during aging and cataract formation. **Exp. Eye Res.**, 6 (6); 707-17.
- CHEESEMAM, K.H. and SLATER, T.F., 1993. An introduction to free radical biochemistry. **Br. Med. Bull.**, 49 (3); 481-93.
- CHERIAN, M. and RWAL, U.M., 1991. Glutathione and glutathione-related enzymes in bisulfan treated rat lens. **Indian J. Exp. Biol.**, 29(5);452-455.
- COTLIER, E., 1981. Senil cataracts evidence for acceleration by diabetes and deceleration by salicylate. **Can. J. Ophthalmol.**, 16;113-118.
- COTLIER, E., 1987. The lens. **Adler's physiology of the eye**, The C.V. Mosby Company, Saint Louis, 268-290.
- ÇAKINEL, T., 1992. Suda eriyen dana lensi proteinleri üzerine kalsiyum ve glukozun etkileri. **Doktora Tezi**, İ.Ü., Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- DAVSON, H., 1990. The lens. **Davson's physiology of the eye**, Mc. Millan press, London, 139-192.
- DEBY, C. and PINCEMAIL, S., 1988. Oxygen toxicity, free radicals, and defence mechanisms. In; Fünfgeld, E.W.(edi). **Rökan Gingkobiloba. Recent results in pharmacology and clinic.**, Berlin, Springer-Verlag,57.
- DEL MAESTRO, R.F., 1980. An Approach to Free Radicals in Medicine and Biology. **Acta Physiol. Scand**, 492; 153-168.
- DELAMERE, N.A., PATERSON, C.A. and COTTON, T.R., 1983. Lens cation transport and permeability changes following exposure to hydrogen peroxide. **Exp. Eye Res.**, 37; 45-53.

- DEVAMONOHARAN, P.S., RAMACHANDRAN, S. and VARMA, D.S., 1991. Hydrogen peroxide in the eye lens: Radioisotopik determination. **Curr. Eye Res.**, 10(9);831-838.
- DILLEY, K.J. and HARDING, J., 1975. Changes in proteins of the human lens in development and aging. **Biochemica et Biophysica Acta**, 386; 391-408.
- DİLSİZ, N., BAYDAŞ, G., ÜSTÜNDAĞ, B. and TUZCU, M., 1999. Aspirin ve Aminoguanidin Diabetik Katarakt Üzerindeki Etkileri. **25. Ulusal Fizyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı)**, 6-10 Eylül, Elazığ.
- DİNGİLOĞLU, N., 1991. Diabetes Mellitusda Plazma ve Eritrosit Lipit Peroksitleri, Eritrosit Glutasyon, Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz ve Plazma Total Yağ Asidi Düzeyleri. **Uzmanlık Tezi**, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İzmir.
- EMEKLİ, N., 1992. Diabet ve Hemostaz İlişkisine Enzimatik ve Nonenzimatik Glikozilasyon Yönünden Bakış. **Year Book of Turkish Diabetology**, 9; 116-133.
- ERDOĞAN, T.G., 1999. Göz lensinde meydana gelen yapısal değişikliklerin incelenmesi ve katarakt tedavisine yönelik çalışmalar. **Yüksek Lisans Tezi**, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- ERENEL, G., ERBAL, D. and ARICIOĞLU, A., 1993. Free radicals and antioxidant systems. **Mater. Med. Pol.**, 25 (1); 37.
- ESTERBAUER, H., 1982. Aldehydic Products of Lipid Peroxidation. In: MC BRIEN DCH. SLATER TF. (Eds). **Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer**, London; Academic press, 101-128.
- FREI, B., 1994. **Natural Antioxidants in Human Health and Disease**, San Diego: Academic Press.
- FRIDOVICH, I., 1984. Oxygen aspects of its toxicity and elements of defense. **Curr. Eye Res.**, 3; 1-12.
- FRIDOVICH, I., 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Ann. Rev. Biochem.**, 64; 97-112.
- GONZALES, A.M., SOCHOR, M., HOTHERSALL, J.S. and MALEAN, P., 1986. Effect of aldoz reductase inhibitör (sorbini) on integration of polyol pathway pentase phosphate pathway and glycolytic route in diabetic rat lens. **Diabetes**, 35; 1200-1205.

- GUYTON, A.C MD. and HALL, J.E., 1996. İnsülin, Glukagon ve Diabetes Mellitus. **Tıbbi Fizyoloji**, Dokuzuncu Baskı. Editör: Çavuşoğlu, H.(W.B.Saunders Company). Yüce Yayım, Nobel Tıp Kitabevi, Bölüm 2, 78:16, 971-83.
- HALLIWELL, B., 1989. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: A critical evaluation with special reference to athero sclerosis. **Br. J. Exp. Path.**, 70; 737.
- HALLIWELL, B., 1994. Free radicals, antioxidants and human disease: Coriosity, cause, or consequence? **Lancet**, 344; 721-724.
- HALLIWELL, B., 1996. Oxidative stress, Nutrition and Health. Experimental Strategies for Optimization of Nutritional Antioxidant Intake in Humans. **Free Radical Res.**, 25; 57-74.
- HALLIWELL, B. and CHIRICO, S., 1993. Lipid Peroxidation: Its mechanism, measurement and significance. **Am. J. Clin. Nutr.**, 57; 715-725.
- HATEMİ, H., BOYAR, F. and KORUGAN, Ü., 1983. **Diabetes Mellitus**. Birinci Baskı, Dergah Yayınları, 1-13, İstanbul.
- HOTHERSALL, S.T., MUIRHEAD, P.R., TAYLAUR, E. and JONES, H.V.R., 1992. Antioxidant status in an *in vitro* model for hyper glycemic lens cataract formation: Competition for available nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate between glutathione reduction and the polyol pathway. **Biochem. Int.**, 27 (5); 945-952.
- KAEMI, A., 1992. Glycation and insolubility of Human lens protein. **Chem. Pharm. Bull.**, 40 (10); 2787-2791.
- KALAK, S., AKKUŞ, İ., ÇAĞLAYAN, O., CAN, G. and ZEREN, E.M., 1996. Diabetes Mellitus ve Serbest Radikaller. **T. Klin. Tıp Bilimleri**, 16; 206-211.
- KAREL, F., IŞIKÇELİK, Y. and TAKMAZ, T., 1997. The lens metabolism and mechanism of cataract formation. **T. Clin. Ophthalmol.**, 6; 50-56.
- KEHRER, J.P. and SMITH, C.V., 1994. Free Radicals in Biology: Sources, Reactivities and Roles in the Etiology of Human Diseases. In: Frei B. Editor. **Natural Antioxidants in Human Health and Disease**, San Diego; Academic Press, 25-62.
- KEUSCH, G.T., 1993. Antioxidants in infection. **J. Nutr. Sci. Vitaminol**, 23; 39.

- KINOSHITA, J.H., 1974. Mechanism initiating cataract formation. **Invest Ophthalmol**, 13;713-724.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. **Nature**, 227;680-685.
- LEE, A.Y.W. and CHUNG, S.S.M., 1999. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. **FASEB J.**, 13: 23-30.
- LERMAN, S., 1992. Free radical damage and defence mechanism in the ocular lens. **Lens Eye Toxic. Res.**, 9(1); 9-24.
- LIANG, J.N., 1993. Nonenzymatic advanced glycation in the lens membranes. **Exp. Eye Res.**, 57 (1), 45-49.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J., 1951. Protein Measurements with the Folin Fenol Reagent. **J. Biol. Chem.**, 193-265.
- LUCAS, V.A., DUNCAN, G. and DAVIES, P., 1986. Membrane permeability characteristics of perfused human senile cataractous lenses. **Exp. Eye Res.**, 42; 151-162.
- LYONS, J.T., SILVESTRI, G., DUNN, A.J., DYER, G.D. and BAYNES, W.J., 1991. Role of glycation in modification of lens crystallins in diabetic nondiabetic senile cataracts. **Diabetes**, 40 (8); 1010-1015.
- MITTON, P.K., DEAN, W.A., OZIALOZYNYZ, T., HAUXIONG, SANFORD, E.S. and TREWITCHICK, R.J., 1993. Modelling cortical cataractogenesis 13. Early effects on lens ATP/ADP and glutathione in the streptozotocin rat model of the diabetic cataract. **Exp. Eye Res.**, 56(2); 187-198.
- MIZUNO, A., SHUMIYA, S., TOSHIMA S. and NAKANO, T., 1992. Alteration of lens disulfide bonds in newly developed hereditary cataract rat. **Jpn. J. Ophthalmol.**, 36(4); 417-425.
- MOSES, R.A., 1975. **Adler's physiology of the eye**, application ed, 6th ed. The C.V. Mosby Company, Saint Louis, 275-97.
- MOTA, M.C., CORVOLHO, N.P., RAMALHA, J.S., CARDOSO, E., GASPAR, A.M. and ABREV, G., 1994. Protein glycation and *in vivo* distribution of human lens fluoresce, **Int. Ophthalmol.**, 18 (14); 187-93.
- NAKAZAWA, H., GENKA, C. and FUJISHIMA, M., 1996. Pathological Aspects of Active Oxygens / Free Radicals. **Japan J. Physiol.**, 46; 15-32.

- OHKAWA, H., OHISHI, N. and YAGI, K., 1979. Assay For Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. **Anal. Biochem.**, 95; 351-358.
- PAPACANSTANTINO, J., 1965. The γ crystallins of adult bovine, calf and embryonic lenses. **Biochemica et Biophysica Acta**, 107; 81-90.
- PATERSON, C.A. and DELAMERE, N.A., 1992. The lens. Hart WM. ed. **Adler's physiology of the eye**. Ninth ed. Missouri, Mosby Year Book, 348-90.
- POLI, G., ALBANO, E. and DIANZANI, M.U., 1993. **Free Radicals: From Basic Science to Medicine**. Birkhauser, Basel (Switzerland), 47.
- RAMARKKRISHNAN, S. and SULOCHANO, N.K., 1993. Decrease in glycation of lens proteins by lysine and glycine by scavenging of glucose and possible mitigation of cataractogenesis. **Exp. Eye Res.**, 57 (5), 623-628.
- REDDY, N.V., 1990. Glutathione and function in the lens. **Ann. Overview Exp. Eye Res.**, 50; 771-778.
- REILLY, P.M., SCHILLER, H.J. and BULKLEY, G.B., 1991. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. **Am. J. Surg.**, 161(4); 488.
- REITER, R.J., 1997. Antioxidant Actions of Melatonin. **Adv. Pharmacol.**, 38;103-117.
- RILEY, M.R. and HARDING, J.J., 1993. The reaction of malondialdehyde with lens proteins and the protective effects of aspirin. **Biochemica et Biophysica Acta**, 1158;107-112.
- ROBERT, K. and MURRAY, M.D., 1990. Metabolism of xenobiotics. In: **Harper's Biochemistry**, Murray, R.K., Mayes, P.A., Granner, D.K., Rodwell, Victor, W.(eds), Twenty-second edition, Prentice-Hall International Inc., 647.
- RODGER, W., 1991. Insulin-Dependent (Type I) Diabetes Mellitus. **Can. Med. Assoc. J.**, 145 (10); 1227-37.
- SAXENA, M., SINGHAL, S.S. and AWASTHI, C.Y., 1992. A specific, sensitive and rapid method for the determination of glutathione and its application in ocular tissues. **Exp. Eye Res.**, 55(3); 461-468.
- SELL, D.R. and MONNIER, V.M., 1990. End-stage renal disease and diabetes catalyze the formation of a pentose derived crosslink from aging human collagen. **J. Clin. Invest.**, 84; 380-84.
- SIES, H., 1993. Strategies of antioxidant defence. **Eur. J. Biochem.**, 215 (2); 213.

- SOUTHORN, P.A., 1988. Free Radicals in Medicine. I. **Chemical Nature and Biological Reactions**. Mayo Clin. Proc., 63; 381-389.
- SPECTOR, A., 1984. The search for a solution to senile cataracts. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, 25; 130-139.
- SUGIMOTO, K. and YAGIHASHI, S., 1997. Effects of aminoguanidine on structural alterations of microvessels in peripheral nerve of streptozotocin diabetic rats. **Microvascular Res.**, 53;105-112.
- SWAMY, M.S., TSAI, C., ABRAHAM, A. and ABRAHAM, E.C., 1993. Glycation mediated lens crystallin aggregation and cross-linking by various sugars and sugar phosphates *in vitro*. **Exp. Eye Res.**, 56(2); 177-185.
- TAPPEL, A.L. and DILLARD, C.J., 1981. *In vivo* lipid peroxidation: Measurement via exhaled pentane and protection by vitamin E. **FASEB J.**, 40; 174-178.
- TOR, H., DANACI, M., KÜÇÜKARDALI, Y., GÜL, S., YILDIRIM, Ş., ELBÜKEN, E. and HAKSEVER, N., 1995. Streptozotosin ile diyabetik hale getirilmiş ratlarda hiperbarik oksijen tedavisinin terapötik etkinliği. **Ulusal Endokronoloji Dergisi**, 5; 249-260.
- TÜRKER, G., 1988. **Lens hastalıkları**, ders notları, 1-22.
- UĞUZ, Z., 1993. Kısa süreli akut diyabet oluşturmuş sıçanlarda lens glutasyonu, lens proteinlerinin non-enzimatik glikozilasyonu ve önemi. **Yüksek Lisans Tezi**, M.Ü., Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- ÜSTÜNDAĞ, B., 1996. Deneysel Diabetes Mellitus Oluşturulmuş Ratlarda Renin-Anjiotensin- Aldosteron Sisteminin İncelenmesi. **Uzmanlık Tezi**, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Elazığ.
- VAN BOEKEL, M.A. and HOENDERS, J.H., 1992. Glycation of crystallins in lenses from aging and diabetic individuals. **Febs. Lett.**, 314 (1); 1-4.
- VARMA, S.D., BAVER, S.A. and RICHARDS, R.D., 1987. Hexose monophosphate shunt in rat lens stimulation by vitamin C. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, 28; 1164-1169.
- WOLFF, S.P., 1993. Diabetes Mellitus and free radicals. **Br. Med. Bull.**, 49(3); 642-652.

- XIE, P.Y., KANAI, A., KITAHARA, S., OHTSU, A. and FUJII, K., 1991. Glutathione and Glutathione-related enzymes in human cataractous lenses. **Ophthalmologic Res.**, 23(3); 133-140.
- YALÇIN, A.S.,1998. Antioksidanlar. **Klinik Gelişim II**, 342-346.
- YARAT A., YANARDAĞ, R., ÖZÇELİK, F., ÖZSOY, Ö., BAPÇUM, A. and EMEKLİ, N., 1995. The effect to vitamine B₆ on lens antioxidant system and on lens proteins of STZ induced diabetic rats. **35th IUPAC Congress**, 14-19 August, Abstract 1, Sections 1-3, 784.
- YARAT, A., 1988. STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlardan elde edilen dişeti bağ dokusu ve kuyruk tendon kollagenlerinin non-enzimatik glikozilasyonunun incelenmesi ve glikozillenmiş hemoglobin ile karşılaştırılması. **Doktora Tezi**, M.Ü., Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- YENİGÜN, M., 1995. **Her yönü ile Diabetes Mellitus**. Editör, Yenigün M., Haseki Hastanesi Vakfı, 3-45, 547-737, İstanbul.