

105590

T. C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇEŞİTLİ ANTİOKSİDANLARIN KOBAYLARDA OLUŞTURULAN
RETİNAL İSKEMİ-REPERFÜZYON ÜZERİNE ETKİSİ

İhsan EKİN

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ELAZIĞ

2002

T. C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEŞİTLİ ANTİOKSİDANLARIN KOBAYLARDA OLUŞTURULAN
RETİNAL İSKEMİ-REPERFÜZYON ÜZERİNE ETKİSİ**

İhsan EKİN

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

109990

Bu Tez,..... Tarihinde Aşağıda Belirtilen Jüri Tarafından
Oybirliği / Oyçokluğu ile Başarılı / Başarısız Olarak Değerlendirilmiştir.

(İmza)

Danışman

Doç. Dr. Nihat DİLSİZ

(İmza)

(İmza)

ÖZET**Yüksek Lisans Tezi****ÇEŞİTLİ ANTİOKSİDANLARIN KOBAYLARDA OLUŞTURULAN
RETİNAL İSKEMİ-REPERFÜZYON ÜZERİNE ETKİSİ****İhsan EKİN****Fırat Üniversitesi****Fen Bilimleri Enstitüsü****Biyoloji Anabilim Dalı****2002, Sayfa: 42**

Bu çalışma, çeşitli vitamin E formlarının, kobay retinalarında iskemi-reperfüzyon (İ-R) sırasında oluşan serbest oksijen radikallerine karşı muhtemel rolünü göstermektedir. Hayvanlar rast gele seçilerek beş gruba ayrıldılar. Bunlar, 1. grup (kontrol), 2. grup (İ-R), 3. grup (İ-R+alfa tokoferol), 4. grup (İ-R+gama tokoferol) ve 5. grup (İ-R+vitamin E-TPGS) olarak adlandırıldı. Deneyde kobayların sağ gözleri iskemi-reperfüzyon için kullanıldı. 3, 4 ve 5. gruplara 24 saatlik reperfüzyon sırasında üç defa subkutan enjeksiyon ile alfa tokoferol, gama tokoferol ve vitamin E-TPGS verildi. 24 saatlik reperfüzyondan sonra hayvanlar kesildi. Daha sonra, retinalar malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) ölçümü için izole edildi.

Bu deneyin sonunda, iskemi-reperfüzyon grubu ile kıyaslandığı zaman bu üç maddenin (alfa tokoferol, gama tokoferol ve vitamin E-TPGS) MDA oluşumuna karşı istatistiksel olarak önemli derecede koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir. Buna ilave olarak örneklerdeki GSH miktarı belirlenmiş ve elde edilen sonuçlara göre 4. grubun GSH seviyesi 2. gruba yakın, 3 ve 5. grupların GSH seviyeleri ise 1 ve 2. gruplardan yüksek olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, vitamin E formlarından olan alfa tokoferol, gama tokoferol ve vitamin E-TPGS peroksidasyon ürünü olan MDA oluşumunu engellediği ve antioksidan olan GSH miktarını koruduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: İskemi-Reperfüzyon, Serbest Oksijen Radikalleri, Antioksidan, Glutatyon, Malondialdehit, Kobay, Vitamin E, Retina

ABSTRACT**Master Thesis****EFFECT OF SOME ANTIOXIDANTS ON RETINAL
ISCHEMIA-REPERFUSION FORMED IN GUINEA PIGS****İhsan EKİN****Firat University****Graduate School of Natural and Applied Sciences****Department of Biology****2002, Page: 42**

This study shows the possible role of various forms of vitamin E on free oxygen radicals which formed during ischemia-reperfusion (I-R) in guinea pig retina. The animals were randomly divided into the five groups. These were named as group 1 (control), group 2 (I-R), group 3 (I-R+alpha tocopherol), group 4 (I-R+gamma tocopherol) and group 5 (I-R+vitamin E+TPGS). In the experiment, the right eyes of guinea pigs were used for ischemia-reperfusion. Group 3, 4 and 5 received three subcutaneous injections with alpha tocopherol, gamma tocopherol and vitamin E -TPGS during the reperfusion period of 24 hours. The animals were sacrificed after 24 hours of reperfusion. Then, retinas were isolated and processed for the quantification of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels.

At the end of this experiment, all the three substances (alpha tocopherol, gamma tocopherol, vitamin E-TPGS) showed statistically significant protection against the formation of MDA when compared to I-R group. In addition, quantity of glutathione in samples was determined and according to the results, GSH level in group 4 was found close to the group 2 and GSH levels in group 3 and 5 were found higher than group 1 and 2.

As a result, vitamin E forms; alpha tocopherol, gamma tocopherol and vitamin E-TPGS prevent formation of peroxidation substrat MDA and protect quantity of antioxidant GSH.

Key Words: Ischemia-Reperfusion, Free Oxygen Radicals, Antioxidant, Glutathione, Malondialdehyde, Guinea Pig, Vitamin E, Retina

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Nihat DİLSİZ ve Araştırma Görevlisi Mehmet TUZCU'ya teşekkürlerimi borç bilirim.

İhsan EKİN



İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET.....	II
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	VII
KISALTMALAR LİSTESİ....	VIII
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Gözün Genel Yapısı	3
2.1.1. Retina.....	4
2.1.2. Retina Hastalıkları.....	5
2.1.3. Retina ve İskemi Reperfüzyon.....	6
2.2. Serbest Radikaller	8
2.3. Antioksidanlar	17
3. MATERYAL ve METOT	22
3.1. Hayvanların Hazırlanması	22
3.2. İskemi ve Reperfüzyon Oluşturulması	23
3.3. Retina Örneğinin Hazırlanması.....	24
3.4. Glutasyon (GSH) Ölçümü.....	24
3.5. Malondialdehit (MDA) Ölçümü	26
4. RETİNADA GSH ÖLÇÜM SONUÇLARI	28
5. RETİNADA MDA ÖLÇÜM SONUÇLARI	31
6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	35
7. TARTIŞMA.....	36
KAYNAKLAR.....	39

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Konu	Sayfa No
1.	Gözün yapısı.....	3
2.	Retinanın yapısı	4
3.	İskemi ve reperfüzyon ile süperoksit radikallerinin oluşması.....	7
4.	İskemik zedelenmedeki olaylar dizisi	7
5.	Biyolojik sistemlerde antioksidan mekanizmaları.....	15
6.	Hücrelerde moleküler oksijenden su ile H ₂ O ₂ oluşumu.....	16
7.	Vitamin E formu olan alfa tokoferolün moleküler yapısı.....	20



TABLolar LİSTESİ

Tablo	Konu	Sayfa No
1	Kontrol grubunda GSH seviyesi.....	28
2	İ-R grubunda GSH seviyesi.....	28
3	İ-R+gama tokoferol grubunda GSH seviyesi.....	28
4	İ-R+vitamin E-TPGS grubunda GSH seviyesi.....	29
5	İ-R+alfa tokoferol grubunda GSH seviyesi.....	29
6	Kontrol grubunda MDA seviyesi	31
7	İ-R grubunda MDA seviyesi	31
8	İ-R+gama tokoferol grubunda MDA seviyesi.....	31
9	İ-R+vitamin E-TPGS grubunda MDA seviyesi	32
10	İ-R+alfa tokoferol grubunda MDA seviyesi	32



KISALTMALAR

AMP	adenozin monofosfat
ATP	adenozin trifosfat
CAT	katalaz
CPK	kreatin fosfokinaz
DNA	deoksiribonükleik asit
DTPA	dietilentriamin pentaasetik asit
EDTA	etilendiamin tetra asetik asit
EGPx	ekstra-sellüler GPx
ER	endoplazmik retikulum
GAA	glasial asetik asit
GSH	glutasyon
GSSG	yükseltgenmiş glutasyon
GPx	glutasyon peroksidaz
H ₂ O ₂	hidrojen peroksit
HO ₂	perhidroksi radikali
LDL	düşük yoğunluklu lipoprotein
LOO.	peroksil radikali
LOOH	hidroperoksit
LPO	lipit peroksidasyonu
µM	mikromolar (10 ⁻⁶ M)
MDA	malondialdehit
MPO	myeloperoksidaz
NADP	nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH	nikotinamid adenin dinükleotid fosfat redükte formu
OSR	oksijen serbest radikalleri
PO ₂	yüksek parsiyel oksijen
PUFA	poliansatüre yağ asitleri
RNA	ribonükleik asit
RPE	retina pigment epiteli
SDS	sodyum dodesil sülfat
SOD	süperoksit dismutaz
TBA	tiyobarbitürik asit

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Oksijen zehirlenmesinin altında yatan temel bozukluk, dokularda oksijen konsantrasyonunun artması sonucu konsantrasyona bağımlı bir biçimde hücre içinde aşırı miktarda reaktif (serbest) oksijen radikallerinin oluşması ve bunların sitotoksik nitelikleri nedeniyle hücreleri zedelemesidir. Serbest radikallerin; inflamasyon, hemokromatozis, karsinogenezis, yaşlanma, arterosklerozis, ilaç toksisitesi, karaciğer travması, katarak oluşumu, retinal degridasyon ve radyasyon hasarı ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir. Kanda lipid hidroperoksitlerinin düzeyi, bir çok klinik bozukluğun ve hastalığın gelişiminde iyi bir gösterge olarak kabul edilmektedir.

Poliansatüre yağ asitleri (PUFA) membran lipidlerinin en önemli komponentlerinden biridir. Bu moleküller serbest radikal etkilerine karşı çok duyarlıdır ve yağ asiti hidroperoksitlerine dönüşürler. Retinanın özellikle fotoreseptör tabakası yüksek konsantrasyonda yağ asitleri içerir. Retina aynı zamanda yüksek oksijen içeren bir dokudur. Literatürlerde aşırı oksijenin lipid peroksidasyonunu başlatarak retinada hücresel elemanların tahribine yol açtığını gösteren çalışmalar vardır. Retinal hücre zarlarında meydana gelen oksidatif hasar gözün fizyolojisini etkilemekte ve görme ile ilgili hastalıkların oluşmasına neden olmaktadır.

Retinal hasara sebep olan oksijen radikallerinin, iskemi-reperfüzyon ile oluşabileceği bir çok klinik deneylerle açıklanmıştır. Bir saati geçen iskemilerde geri dönüşümü olmayan retinal hasarların olduğu ispatlanmıştır. Geri dönüşsüz hücre zedelenmesinde hücre membran zedelenmesinin temel etken olduğuna dair bir çok kanıt vardır. İskemik dokuda artan oksijen radikalleri, kan akımı düzeldikten sonra reperfüzyon doku zedelenmesine neden olur. Serbest oksijen türevlerinin büyük ölçüde reperfüzyon sırasında iskemi alanında infiltre olan polimorfonükleer lökositler tarafından yapıldığı düşünülmektedir. Genel olarak, reperfüzyon inflamatuvar mediatörlerin oksijen kökenli serbest radikallerin ve lipid mediatörlerinin oluşumunu teşvik etmektedir. Nonenzimatik glikolizasyon, otooksidatif glikolizasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yolu aktivitesi, inflamatuvar mediatörlerin düzeyleri ile antioksidan savunma sistemindeki değişiklikler ve hipoksi, iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan lokalize doku hasarını artıran mekanizmalardır.

Canlılar serbest radikallerin oluşumunu engelleyen ve onların hasarlarını azaltan antioksidan savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Gözde yüksek konsantrasyonlarda antioksidan enzimler, serbest radikal tutucuları ve süperoksid üretimi inhibitörleri bulunur. Vitamin E ve vitamin C gibi antioksidanlar gözde yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar. Gözün retinal pigment tabakasında yüksek konsantrasyonda bulunan vitamin E ve vitamin C lipit peroksidasyonunu engelleyen antioksidan olarak bilinmektedir. Kobaylara uygulanan iskemiden sonraki reperfüzyon sırasında vitamin E seviyesi gittikçe düştüğü gözlenmiştir.

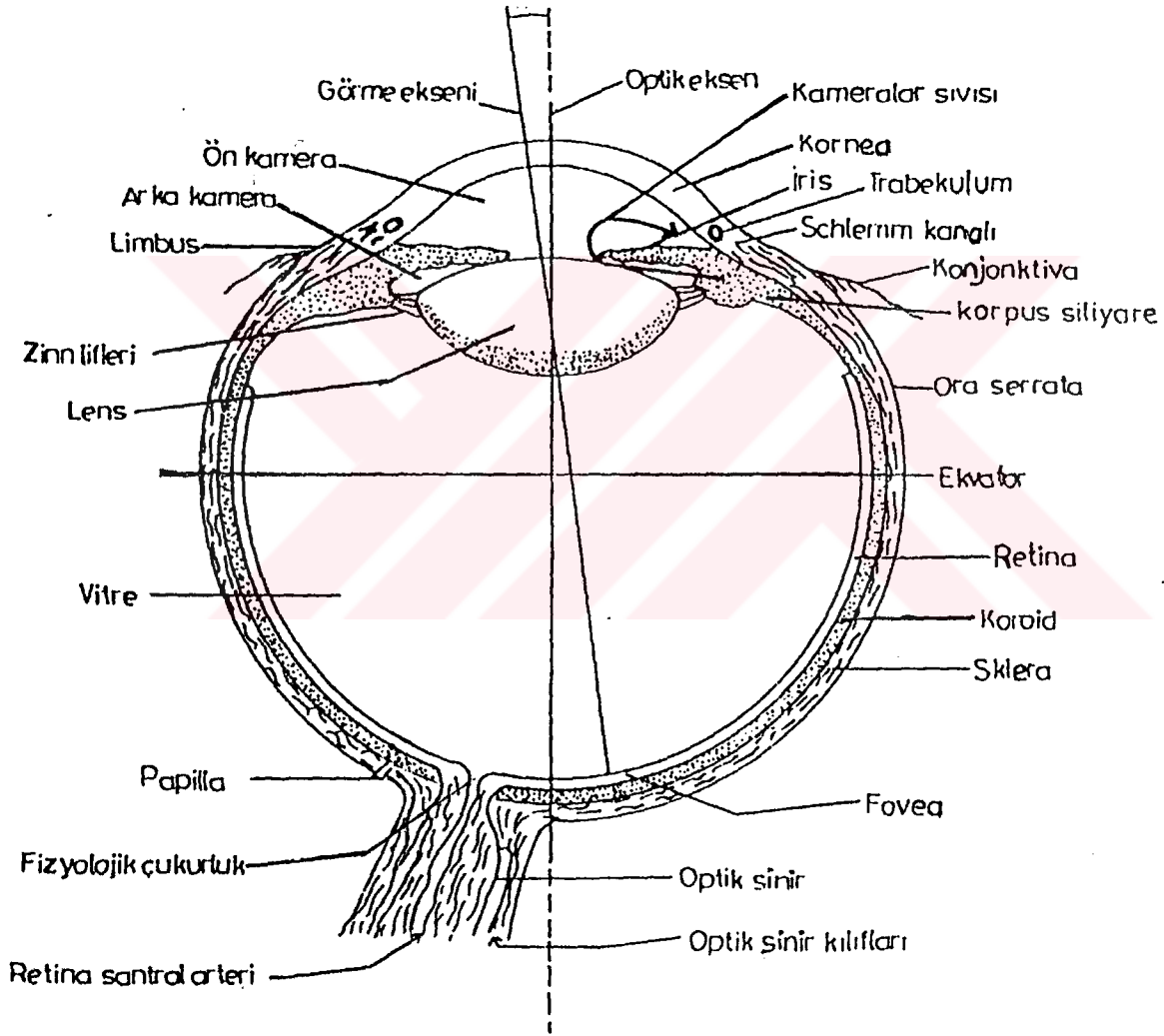
Bu çalışmanın amacı , retinal iskemi-reperfüzyon ile oluşturulan serbest radikallerin meydana getirdiği hasarı tespit etmek ve değişik vitamin E formlarının bu hasarı ne şekilde önlediğini kanıtlamaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Gözün Genel Yapısı

Göz, kafatası içinde koruyucu kemik yapılarda (orbita) yer alan fotosensitif bir organdır. Her göz, şeklini koruyan dayanıklı fibröz bir küreden, görüntüyü odaklayan bir mercek sisteminden ve merkezi sinir sistemine görüntü bilgisini toplayan, işleyen ve nakleden hücre ve sinir sisteminden oluşur. Göz iç içe üç tabakadan oluşur; dışta sklera ve kornea, ortada koroid (korpus siliyare ve iristen oluşan vasküler tabaka), içte ise iki kattan oluşan retina denilen sinir dokusu tabakası vardır (Junqueira, et al., 1992).

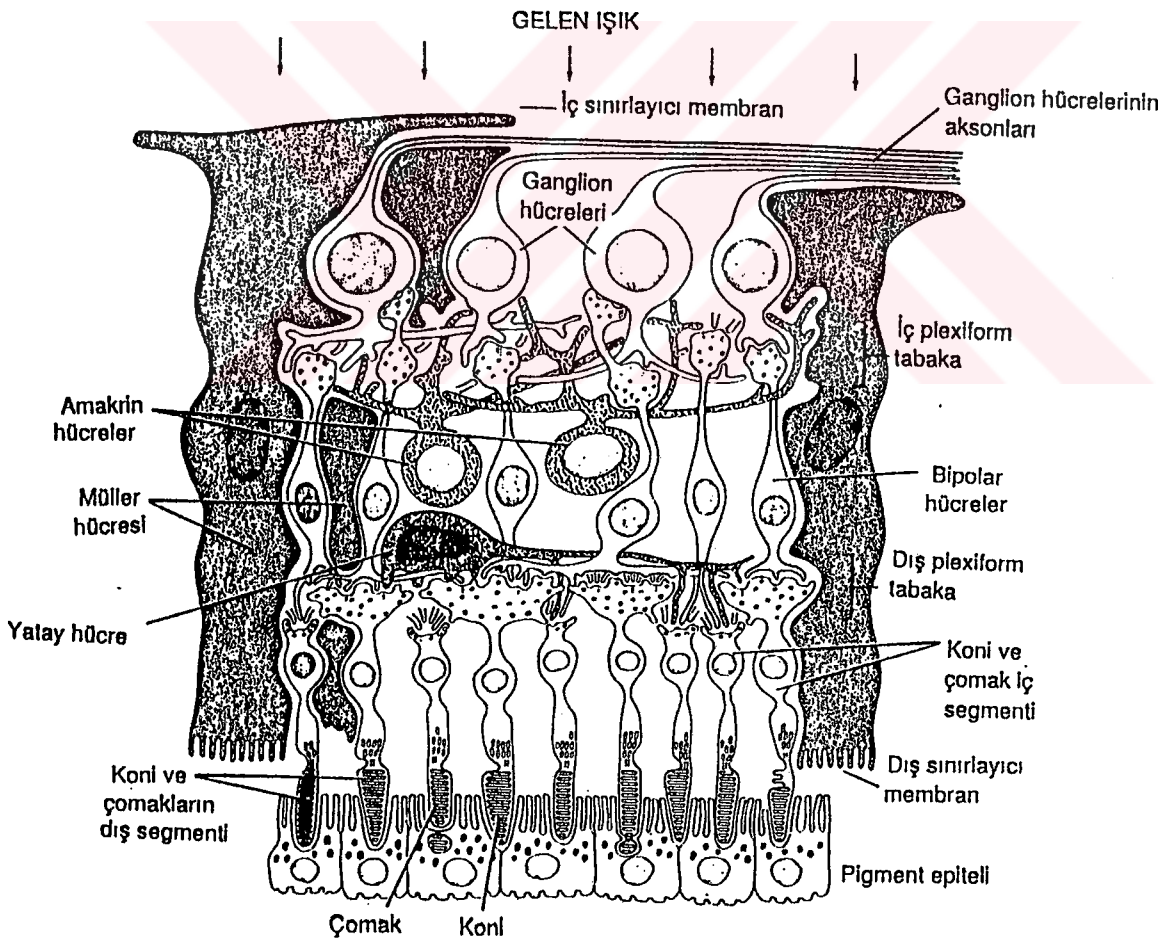


Şekil-1: Gözün yapısı. Yukarıdaki şekilde gözün genel kısımları gösterilmiştir. Sklera, koroid ve retina gözün en önemli katmanlarındandır.

Göz merceği (lens) çift dışbükey bir yapıdır, bulunduğu yere, liflerden oluşan dairesel bir sistem "zonula" ile tutturulmuştur. Bu sistem mercekten orta tabakaya, silier cisim ile uzanır ve arka bölümünde camı sıvı ile komşudur. Merceğin ön yüzünde orta tabakanın opak pigmentli bir uzantısı olan iris vardır. İrisin ortasındaki yuvarlak delik pupilla (göz bebeği) olarak ifade edilir(Junqueira,et al., 1992).

2.1.1. Retina

Sklera ve koroidden sonra retina, göz küresinin en içteki üçüncü katmanıdır. Retina, pigmentli retina ve saydam bir zar olan sensoriyal retinadan oluşmuştur. Retina optik sinirden ora serrataya kadar uzanır, içte vitre ve dışta koroid (damar tabaka) ile komşudur. Dış kattan retina pigment epiteli, iç kattan da sensoriyal retina gelişir. Pigment epiteli tek katlı kalmasına karşılık, sensoriyal retinada, mitozlar sonucu fotoreseptörler, bipolar ve gangliyon hücreleri, bağlantı hücreleri olan amakrin, yatay hücreler ve destek hücreleri olan müller hücreleri oluşmuştur (Bengisu , 1990).



Şekil-2: Retinanın yapısı.Yukarıdaki şekilde retina katmanlarında bulunan hücreler gösterilmiştir.

Retina beslenmesini pigment epiteli aracılığıyla koroidin koryokapillerisinden sağlar. Retinanın 1. nöronunun bulunduğu nöroepitel katı damarsızdır ve koroidin koryokapillerisinden beslenir. Retina damarları 2. ve 3. nöronların bulunduğu nöroserabral katın beslenmesinde rol oynarlar. Retina arter ve venaları sinir lifleri katındadır (Bengisu, 1990).

2.1.2. Retina Hastalıkları

Doğuştan retina anomalileri, damar hastalıkları, makula hastalıkları, retina distrofileri, periferik retina dejenerasyonları, yaralanmaları ve tümörleri şu ana kadar görülen en önemli retina hastalıklarıdır. Retina damar hastalıklarından olan neovaskülarizasyonlar 1948'den bu yana iskemik retina hücreleri tarafından vasoproliferatif bir maddenin sentezinin yapıldığı ve salgılanmalarının oluşturduğu bir hastalık olarak bilinmekteydi. 1994 yılından bu yana yapılan laboratuvar deneyleri retina iskemisinin bir polipeptit olan "damar endoteli büyüme faktörü" üreterek angiogenesise ve retina, optik sinir ile iriste neovaskülarizasyonların oluşmasına neden olduğu görülmüştür. Damar endoteli büyüme faktörü, deney hayvanlarında, damar proliferasyonları dışında, diyabet retinopatisinde ve diğer iskemik retina hastalıklarında görülen kanama, ödem, venalarda boğumlanmalar ve kapiller tıkanıklıklara yol açtığı görülmüştür (Bengisu, 1990).

Diyabetik retinopati gelişiminde gerçek mekanizma bilinmemekle birlikte birçok teori ileri sürülmektedir. Diyabet gelişmesinde hiperglisemi önemli bir rol oynamaktadır. Komplikasyonların gelişmesinde birçok biyokimyasal yol (Glukoz-otooksidasyonu, poliol yolu, prostanooid sentezi, protein glikozilasyonu) hiperglisemi ile yakından ilişkilidir. Tüm bunlar serbest radikal oluşumunu artıran olaylardır (Barnet, 1993; Giugliano, et al., 1996; Baynes, 1991). Bazal membran kalınlaşması, kapiller endotelyal hücre hasarı ve proliferasyonu, kırmızı kan hücrelerindeki değişiklikler ve sonuçta oksijen transportunda bozulma ve artmış trombosit agregasyonu kapiller kapanmada etkili olduğu düşünülen faktörlerdir. Bunlar retinal kapiller non-perfüzyon ve retinal iskekiye neden olarak sonunda retinal hipoksiye yol açarlar (Kanski, 1994).

2.1.3. Retina ve İskemi-Reperfüzyon

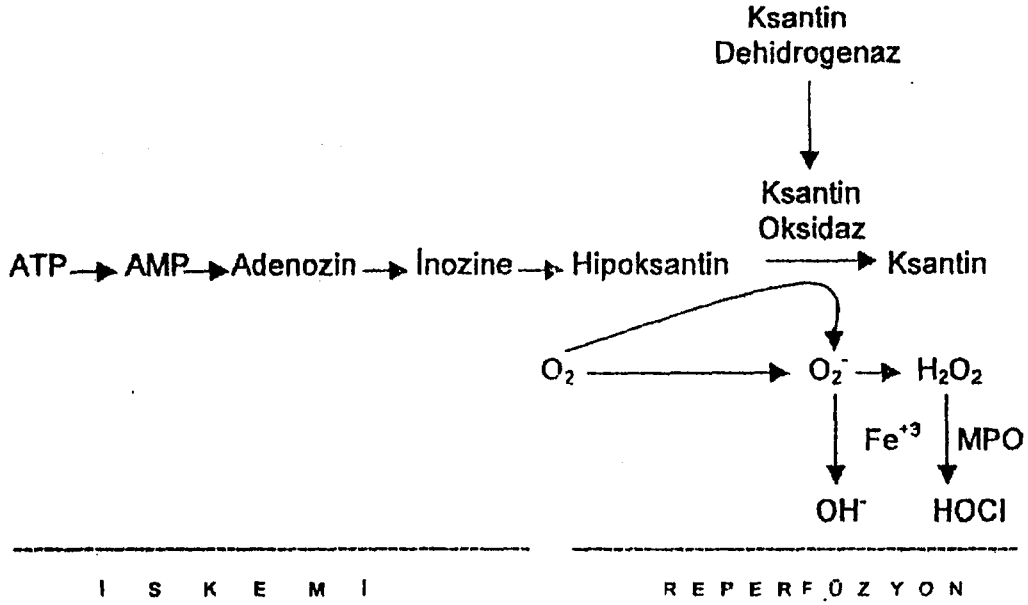
İskemi, kan akımı yetersizliği nedeniyle dokuların ihtiyacı olan oksijen ve metabolik substratların karşılanamadığı patolojik bir olaydır. Post-iskemik resirkülasyon ya da reperfüzyon, iskemik dokunun oksijenlenmiş kan ile perfüze edilmesiyle enerji desteğinin sağlanması ve hücrel homeostazinin yeniden restorasyonu demektir (Köksel, 1998). İskemi esnasında ATP üretimi başlangıçta kreatin fosfatın parçalanmasından meydana gelir. Bir süre sonra kreatin fosfat depoları tükenir ve bundan sonra ATP üretimi kas glikojenin metabolizması sonucu oluşur. İskemi sırasındaki hücrel ATP seviyesindeki bu düşüş daha sonra oluşan kas nekrozu ile sıkı bir ilişki içerisinde. Doku iskemisi sırasında meydana gelen hasarın büyük bir bölümü moleküler oksijenin dokuya girdiği reperfüzyon esnasında oluşmaktadır. Reperfüze iskemik dokularda, en az üç tane aktif oksijen radikali üretim kaynağı bulunur.

1-) Aktif fosfolipaz, hücre membran fosfolipitlerinden araşidonik asidi serbestleştirir.

2-) Ksantin dehidrojenaz, ksantin oksidaza dönüşür. Daha sonra ksantin oksidaz, ksantin ve hipoksantin ürik aside dönüştürüldüğü reaksiyonu katalizler. Bu reaksiyonda substrat olarak reperfüzyon esnasında gelen oksijen kullanılır ve yan ürün olarak toksik süper anyonlar oluşur.

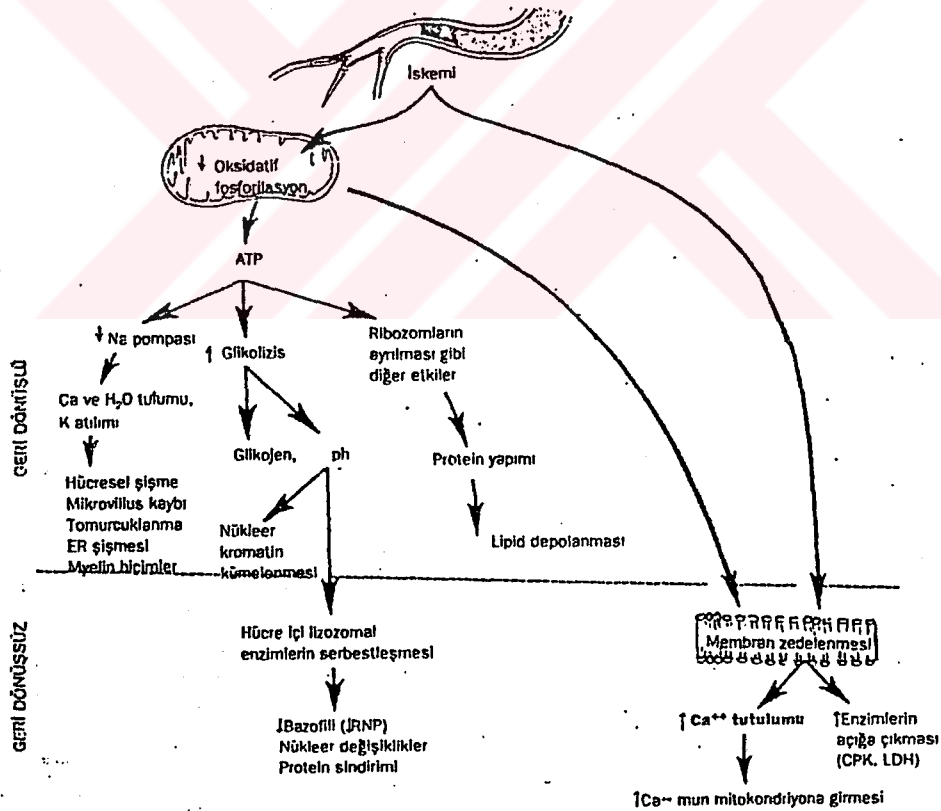
3-) İskemi, kompleman sistemini ve kemotaktik faktörlerinin oluşumunu aktive eder. Sonuçta bu bölgede toplanan nötrofiller, NADPH oksidaz enzimi sayesinde süperoksit üretirler (Akkuş, 1995; Köksel, 1998).

İskemi sırasında yüksek enerjili fosfat içeren ATP' nin yıkımı sonucu hipoksantin ve ksantin gibi pürin metabolitleri birikirken bir ön enzim olan ksantin dehidrojenaz ksantin oksidaza çevrilir. Reperfüzyon sırasında sisteme aniden ve çok miktarda oksijen dahil olur. Sisteme giren oksijen, pürinleri çok süratli bir şekilde okside ederek ürat ve süperoksit anyonu oluşumuna neden olur. Oluşan süperoksit anyonu endotelde demir tarafından katalize edilen reaksiyonlar ile toksisitesi yüksek hidroksil radikali üretimine neden olur (Barry and Grace, 1997).



Şekil-3: İskemi- reperfüzyon ile süperoksit radikallerinin oluşması.

MPO: myeloperoksidaz. HOCl:hipoklorik asit.



Şekil-4: İskemik zedelenmedeki olaylar dizisi. İskemi ana hatları verilen mekanizmalarla doğrudan membran hasarına yol açmaktadır.

2.2. Serbest Radikaller

Oksijen, canlıların yaşamsal fonksiyonlarını sürdürebilmesi için mutlak gerekli bir elementtir. Bu özelliğin yanı sıra bazen canlılar için toksik olabilen bir yapıya sahiptir. Bundan dolayı oksijen canlılar için bir yüzü "iyi" diğer yüzü "kötü" diye nitelendirilebilen iki yüzlü bir bileşiktir. Oksijenin tam olmayan indirgenmesi ile oluşan toksik ürünlerine karşı canlılar koruma mekanizmasına sahip olmakla birlikte, bu koruma pek çok koşulda aşılabilmekte ve yetersiz kalabilmektedir. Moleküler oksijen kendi başına hiçbir canlıda toksik değildir. Ancak, hücrede metabolize edilirken bazı toksik ara ürünlere dönüşür. Moleküler oksijen tek elektron ile tam olmayan indirgenmesi sonucu oksijenin reaktif ürünleri olan oksijen radikalleri oluşur ve bu radikaller oksijenin toksik etkilerinin tamamından sorumludurlar (Kılınç, 1985-1986).

Serbest radikaller bir yada daha çok sayıda eşleşmemiş elektron içeren molekülerdir. Eşleşmemiş iki elektron nedeni ile kararsız yapıda olan moleküler oksijenin indirgenmesi yada uyarılması, süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH^\bullet$) ve tekli (singlet) oksijen (1O_2) gibi serbest oksijen radikallerini oluşturmaktadır. Oksijen serbest radikalleri (OSR) içerdikleri çiftleşmemiş elektronları nedeni ile yüksek reaktivite gösterirler ve bu nedenle lipid, protein ve DNA molekülü ile reaksiyona girme yeteneğine sahiptirler (Köse ve Doğan, 1992).

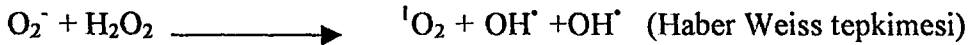
Serbest radikaller oksijenle yaşayan tüm canlılarda, normal metabolik işlemler sırasında kaçınılmaz bir şekilde üretilmektedir. Bu nedenle normal metabolizma sırasındaki oksido-redüksiyonların ürünleri olan serbest oksijen radikallerinin oluşması, biyolojik bir bozukluk olarak değerlendirilmemelidir. Ancak hiperoksi, inflamasyon, iskemi, radyasyon ve antibiyotik tedavisi gibi bazı hücrel metabolik durumlarda büyük oranda üretilen OSR, membranlar, enzimler, nükleik asitler ve polisakkaritler üzerinde toksik etkiler yaparak çeşitli doku hasarlarına neden olmaktadır. Normal fizyolojik şartlarda, aerobik organizmalar hücrel oksijenin yaklaşık %98'ini sitokrom a_3 ile kullanmaktadır. Sitokrom a_3 bilindiği gibi mitokondrideki solunum zincirinin son basamağıdır. Bununla beraber nadiren oksijenin küçük bir miktarı (%1-2) sitokrom a_3 tarafından tüketilemez. Bunlar tek veya çift elektron alıp, ya süperoksit anyon radikaline yada hidrojen peroksite indirgenirler (Kılınç, 1985; Köse ve Doğan, 1992; Reiter, et al., 1993).

Süperoksit Radikali (O_2^-): Normal koşullarda canlılarda oluşan temel oksijen radikali süperoksit radikalidir (O_2^-). Moleküler oksijenin tek elektron alıp indirgemesi ile oluşur ve oksijen metabolizmasında en sık karşılaşılan radikal tipidir. Süperoksit radikali; başta hem, flavin veya demir sülfür merkezleri içeren proteinler olmak üzere pek çok enzimatik tepkimelerde, mitokondride elektron taşınımı sırasında, çeşitli biyolojik molekülerin otooksidasyonunda ve fagositozda olduğu gibi hücresel metabolizmanın normal bir ürünü olarak sürekli üretebilen bir oksijen metabolitidir. Oldukça reaktif olan süperoksit radikali hücrelerin birçok biyokimyasal komponentini etkileyebilir. Mitokondrinin elektron taşıma zincirinde O_2^- üreten iki bölgenin bulunduğu gösterilmiştir. Bunlardan birincisi bir flavoprotein olan NADH dehidrogenazdır ve mitokondri zarından üretilen süperoksit radikallerinin üçte biri bu bölgeden kaynaklanır. İkinci bölge ise koenzim Q-sitokrom b bölgesi olup, ubikinonun oksidasyonu, ETZ'de üretilen süperoksit radikallerinin üçte ikisini oluşturur (Kılınç, 1985; Adachi, et al., 1994; Karwatowska, et al., 1992).

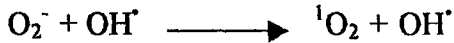
Eğer süperoksit radikali olduğu anda ortamdan uzaklaştırılmaz ise kendisinden çok daha reaktif ve toksik radikallerinin oluşması kaçınılmaz olur. Ortamda biriken süperoksit radikalının, çeşitli tepkimeler ile oluşturabildiği radikaller aşağıdaki gibi özetlenebilir.

1-) Ortamdan bir proton alarak perhidroksit radikali (HO_2) oluşturabilir.

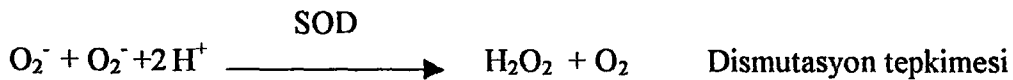
2-) H_2O_2 ile tepkimeye girerek hidroksil radikali ($OH^\bullet$) ve tekli (singlet) oksijen (1O_2) oluşturabilir.



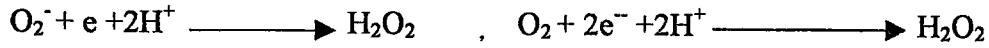
3-) Hidroksil radikali ile tepkimeye girerek tekli (singlet) oksijen oluşturabilir.



Oksijen radikalleri hücrede hangi nedenle üretilmiş olursa olsun toksik etkilidirler ve anında ortamdan uzaklaştırılmaları gerekir. Süperoksit radikallerinin ortamdan temizlendiği tepkimeye dismutasyon tepkimesi denir. Bu tepkime süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından iki süperoksit radikali kendi aralarından etkileşerek biri oksitlenirken diğeri indirgenir ve böylece H_2O_2 ve O_2 meydana gelir (Kılınç, 1985-1986).



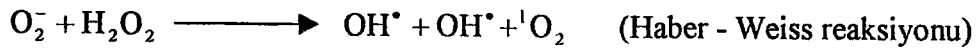
Hidrojen Peroksit (H₂O₂): Moleküler oksijenin çevresindeki molekülerden 2 elektron alması veya süperoksit radikalinin bir elektron alması sonucu peroksit radikali oluşur. Peroksit radikali 2 hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksit (H₂O₂) meydana getirir (Akkuş, 1995).



Hücre içinde en önemli üretim yeri mitokondri olan hidrojen peroksitin kendisi bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri içine girer. Bunun nedeni en reaktif ve zarar verici OSR olan hidroksil radikalini oluşturabilmesidir. Geçiş metallerinin veya uygun şelatların varlığında hidroksil radikali oluşturarak proteinleri parçalar veya yapılarında değişikliklere yol açar. H₂O₂, katalaz (CAT) veya glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleri ile oksijen ve suya metabolize olmaya yatkındır. Bununla birlikte geçiş metallerinin varlığında (özellikle Fe²⁺) hızlıca hidroksil radikaline dönüşürler (Fenton reaksiyonu) (Akkuş, 1995; Wolff, et al., 1986; Reiter, et al., 1993).



Hidroksil Radikali (OH[•]): 1934 yılında Haber ve Weiss hidrojen peroksitin O₂⁻ ile indirgenmesi sonucunda hidroksil radikalinin oluşabileceğini göstermişlerdir (Kılınç, 1985).

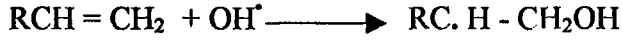


Son derece reaktif bir oksijen radikali olan hidroksil radikalinin yarılanma ömrü çok kısadır ve oluştuğu yerde büyük hasara neden olur. Bu radikal bir çok moleküle hızla bağlanarak reaksiyona girer ve lipitlere, proteinlere, nükleik asitlere karşı direkt etki gösterip, yapısal parçalanmalar ile modifikasyonlara neden olarak sonuçta onarılmaz hücre hasarı oluşturur. Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) gibi bazı şelatlayıcı ajanlar hidroksil radikal oluşumunu Haber-Weiss reaksiyonu yoluyla artırırken, dietilentriamin pentaasetik asit (DTPA) gibi maddeler ise OH[•] oluşumunu azaltırlar (Richard, et al., 1991; Wolff, et al., 1986).

Hidroksil radikalinin katıldığı başlıca tepkimeler üç grupta toplanabilir:

1-) Hidrojen çıkarma tepkimeleri $R-H + OH^{\bullet} \longrightarrow R + H_2O$ böylece organik radikal oluşumuna neden olur.

2-) Katılma tepkimeleri ile çift bağ içeren aromatik bileşiklere katılır, aromatik aminoasitlerin hidroksilasyonuna neden olur.

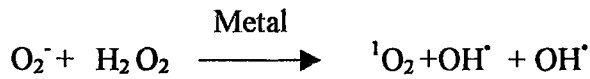


Aromatik halkaya katılma tepkimeleri ile hidroksilasyonların yanı sıra, toksik etkili aldehytlerin oluşumuna da neden olur (Kılınç, 1985).

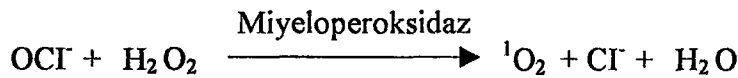
3-) Organik ve inorganik bileşiklerde elektron transfer tepkimelerine neden olur. Aynı etkiyi $O_2^{\bullet -}$ radikali de gösterir.

Tekli (Singlet) Oksijen (1O_2): Tekli (singlet) oksijen (1O_2), ortaklanmamış elektron içermediği için radikal olmayan reaktif bir oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olur. Hidroksil radikali gibi çok reaktif ve çok düşük konsantrasyonlarda bile bütün canlılar için toksik etkilidir. Tekli (singlet) oksijen, uyarılmış elektronların daha düşük enerji seviyelerine inmesiyle ışık yayar. Tekli (singlet) oksijenin kimyasal bir bileşik ile etkileşimi sonucu kemiluminesans meydana gelmesi ve bunun ölçülmesiyle OSR'lerin tayini yapılabilir (Kılınç, 1986; Wolff, et al., 1986).

Haber-Weiss tepkimesi ile



Fagositoz yapan hücrelerde fagositoz sırasında H_2O_2 ve halojen bağımlı miyeloperoksidaz enzimi ile tekli (singlet) oksijen üretilmektedir.



Yukarıdaki tepkimelerde görüldüğü gibi tekli (singlet) oksijen ve hidroksil radikallerinin üretimi tümüyle ortamda $O_2^{\bullet -}$ ve H_2O_2 'nin birikmesine bağlıdır. Bu iki

bileşiğın anında uzaklaştırlmadığı durumda, iki molekülün birbirine rastlaması $^1\text{O}_2$ ve $\text{OH}^\bullet$ üretimi için yeterlidir (Kılınç, 1985-1986).

Serbest Radikal Kaynakları

Biyolojik kaynaklar: Antineoplastik ajanlar, radyasyon, alkol, uyuşturucu madde, hiperoksi, sigara dumanı, solventler, anestezikler, aromatik hidrokarbonlar ve stres olarak sıralanabilir.

İntrasellüler kaynaklar: Tioller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, antibiyotik gibi molekülerin otooksidasyonu, enzimler ve proteinler (ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, hemoglobin) mitokondrial elektron transportu, lipooksijenaz, prostoglandin, NADPH oksidaz, iskemi, travma, oksidazlar ve flavoproteinler bilinen serbest radikal oluşturan kaynaklardır (Akkuş, 1995).

Serbest Radikallerin Etkileri

Membran Lipitleri Üzerine Etkileri: Lipit peroksidasyonu (LPO), membranda bulunan poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA), OSR tarafından peroksitler, alkoller, aldehytler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur (Köse ve Doğan, 1992).

Biyolojik membranlarda serbest radikallerle indüklenen lipit peroksidasyonu; başlama, yayılma ve sonlanma reaksiyonları şeklinde incelenebilir (Köse ve Doğan, 1992; Holley and Cheeseman, 1993).

Başlama: Reaktif serbest radikallerin, PUFA' dan bir hidrojen atomu çıkarması ile başlar. Demir ve bakır gibi eşleşmemiş elektronlara sahip olan geçiş metal iyonlarının varlığı, peroksidasyonun başlaması için gereklidir.

Hidrojen atomunun zincirinden çıkarılması, karbon atomu üzerinde eşleşmemiş bir elektron bıraktığından karbon merkezli radikal ($\text{L}^\bullet$) oluşumuna yol açar. Bu lipit radikalının birçok akıbeti vardır. Fakat aerobik hücrelerde en sık görülen olay, bu radikalın moleküler düzenleme ile konjuge diene çevrildikten sonra, moleküler oksijenle reaksiyona girerek peroksil radikalini ($\text{LOO}^\bullet$) üretmesidir.

Yayılma: Oluşan lipit peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de membrandaki komşu yan zincirinden açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak, lipit hidroperoksitlerine (LOOH) dönüşürler. Peroksidasyon bir kere başladıktan sonra otokatalitik olarak yayılabilmekte veya yüzlerce yağ asidi zincirleri lipit hidroperoksitlerine çevirebilmektedir. Membrandaki protein oranı artıkça radikal ile etkileşim artar ve zincir uzar. Membrandaki PUFA içeriğinin artması peroksidasyona olan duyarlılığı artırmaktadır. Halbuki kolesterol varlığı peroksidasyonu baskılar.

Sonlanma: Lipit peroksil ve konjuge dienler bozularak; alkanlar, alkenler, hidroksialkenler, malondialdehit (MDA) ve uçucu hidrokarbonlar gibi bir takım ürünlere dönüşürler.

Lipit peroksidasyonun etkileri arasında; biyomembranların fizyokimyasal yapılarında değişiklikler, kalsiyum homeostosisinde bozulma ve spesifik reseptör-enzim komplekslerindeki değişimler sayılabilir. Kısa zincirli bir aldehit olan MDA, lipit peroksidasyonunda yükselen bir parametredir ve PUFA'ların oksidasyonunda bir ara ürün olarak sentezlenir. Membran lipitlerinin oksidasyonu hücre membranlarında bir permeabilite artışına yol açar. Sonuçta lipit peroksidatif reaksiyonu zinciri lipozomal ve hücrel membran bütünlüğünü bozabilir. LPO' nun bir diğer önemli zararı, yeni radikal oluşturarak toplam radikal sayısını artırmasıdır. Bu yeni oluşan radikaller, protein ve DNA gibi başka makromoleküllerle reaksiyona girerek hasarın gelişmesine neden olurlar. Aynı zamanda lipit peroksidasyon ürünleri, glikoz -6- fosfat aktivasyonunu direkt olarak inhibe edebilir veya DNA hasarına neden olabilir (Tsai, et al., 1993; Paul, et al., 1993; Giardini, et al., 1984).

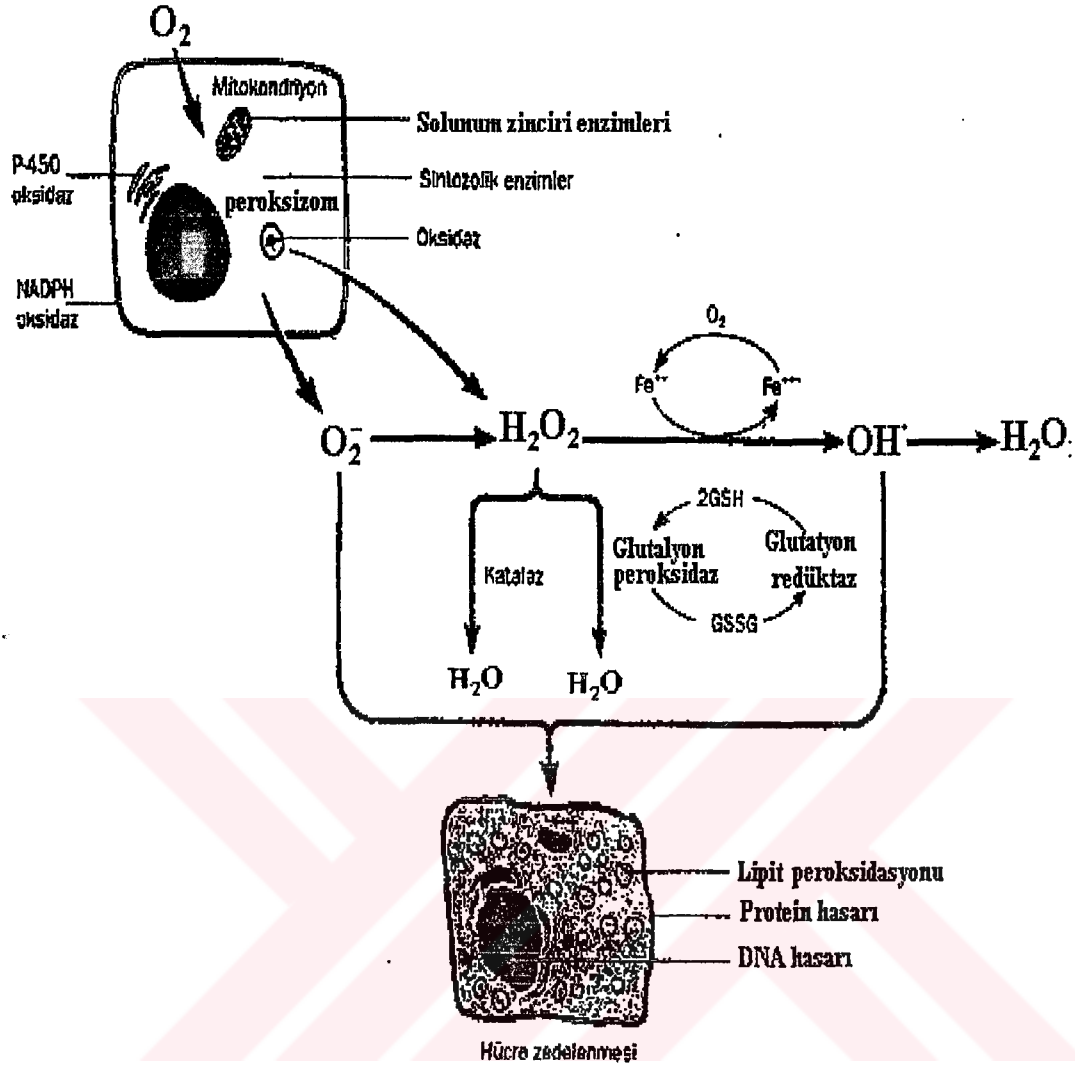
MDA, membran komponentlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmalarına neden olabilir. Ayrıca deformabilite, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzeyindeki determinantların agregasyonu gibi iç membranın bazı özelliklerini değiştirmektedir. Difüze olabildiğinden DNA' nın nitrojen bazlarıyla reaksiyona girebilir. Bu özelliklerinden dolayı MDA, mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşiktir (Köse ve Doğan, 1992).

Proteinlere Etkileri: Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme dereceleri amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden

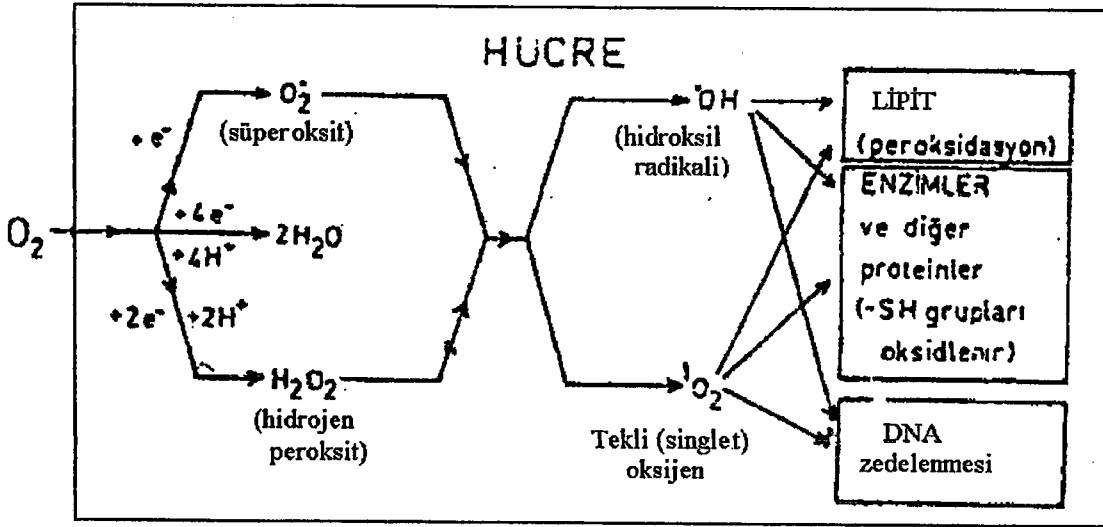
moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin ve sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana gelir. Bu reaksiyonlar sonucu immünoglobülin G ve albümin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunan proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Hemoglobin proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görmektedir. Özellikle oksihemoglobinin O_2^- ve H_2O_2 ile reaksiyonu methemoglobin oluşumuna sebep olur (Akkuş, 1995).

Nükleik Asitlere Etkileri: Radyasyonun toksik etkisinin en önemli nedeninin canlılarda oksijen radikallerinin oluşumuna neden olmasından ileri geldiği bilinmektedir. İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Sitotoksiste, büyük oranda, nükleik asitlerdeki mutasyon bozukluklarına bağlıdır. Hidroksil radikali, deoksiriboz şekeri ve azotlu bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Hidrojen peroksit, membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına hatta hücre ölümüne yol açabilir (Kılınç, 1985; Akkuş, 1995).

Karbonhidratlara Etkileri: Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehidler meydana gelir. Bunlar diyabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklar gibi patolojilerde önemli rol oynarlar. Okzoaldehidler, DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında önemli bir etki gösterirler. Bağ dokusunun önemli bir mukopolisakkaridi olan hyalüronik asit sinoviyal sıvıda bol bulunur. Enflamatuar eklem hastalıklarında sinoviyal sıvıya çok sayıda polimorf hücreler geçer ve muhtemelen immün komplekslerle aktivasyonları sonucu ekstrasellüler sıvıya H_2O_2 ve O_2^- salgırlarlar. Bu radikallerin *in vitro* hyalüronik asiti parçaladıkları gösterilmiştir. Hyalüronik asit parçalanması enflamatuar eklem hastalıklarında sinoviyal sıvının karakteristik bir özelliğidir (Akkuş, 1995).



Şekil-5: Yukarıdaki şekilde biyolojik sistemlerde antioksidan mekanizmaları ve oksijen türevlerinin oluşumu görülmektedir. Oksijen; ER, mitokondriyon plazma membranı ve sitozolde oksidatif enzimlerle süperoksit radikallerine dönüşür. Peroksizomlarda ise oksijen H_2O_2 'ye dönüşerek potansiyel bir tehlike oluşturur. Serbest radikallerin lipitleri, proteinleri ve DNA'yı hasarlamasıyla çeşitli hücre zedelenme biçimleri görülmektedir. Ana oksidan enzimler: SOD, katalaz ve glutasyon peroksidazdır.



Şekil-6: Hücrelerde moleküler oksijenden süperoksit, su ile hidrojenperoksit oluşumu ve süperoksitin hidrojenperoksit ile reaksiyona girmesi sonucu sitotoksik hidroksil radikali ve tekli (singlet) oksijen meydana gelmesi gösterilmiştir.

Göz ve Serbest Radikaller: Göz, aşırı miktarda serbest radikal etkisine maruz kalan bir organdır. Çünkü retina oksijen bakımından zengin olup büyük miktarda doymamış yağ asidi içerir. Retina pigment epitel (RPE) hücreleri sürekli olarak her gün bir çok fotoreseptör dış segmentini degrade ve fagosite etmektedir. RPE lokalizasyonu, fotik reaksiyonlar ve koriokapillaristen difüze olan yüksek parsiyel oksijen (PO_2) seviyesi ve buradaki yüksek metabolik aktivite sonucu serbest radikal üretimi ve bunların etkisine maruz kalma riski artmaktadır (Braquet and Doly, 1986; Yeh and Ashton, 1990).

Göz bu radikallerin etkisine yatkın olduğu gibi yeterli miktarda antioksidan savunma sistemlerine de sahiptir. Gözde yüksek konsantrasyonda antioksidan enzimleri, serbest radikal tutucuları ve süperoksit üretimi inhibitörleri bulunur. Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz gibi enzimlerle, askorbat, karotenoidler, vitamin E gibi antioksidanlar gözde yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Lenste, katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, vitamin E ve askorbik asit mevcut olup oksidatif hasarlara karşı koruyucudurlar (Braquet and Doly, 1986; Yeh and Ashton, 1990; Kador, et al., 1994; Spector, et al., 1995).

Işığa maruz bırakılmış kurbağa retinasında serbest radikallerin arttığı ve bunun ışığın değişik dalga boylarında da arttığı saptanmıştır. Lipit peroksidasyonundan,

başlıca fotoreseptör hücre membranlarının sorumlu olduğu, fakat rodopsinin de sensitize edici bir rolünün olabileceği kanaatine varılmıştır (Kagan, et al., 1973).

Sıçanlarda iskemi ve reperfüzyona bağımlı retinal hasarı araştıran bir çalışmada ise iskeminin süresi ile orantılı histolojik değişiklikler izlenmiştir. 90 dakikalık bir iskemiden sonra reperfüzyon sonucu retinada ileri derecede ödem, nötrofil ve lökosit infiltrasyonu görülmüştür. Bu çalışmada sıçanlara süperoksit dismutaz ve Ginkgo biloba ekstresi tedavi amaçlı verilmiş ve her iki antioksidanın da belirgin şekilde retinal ödemi ve lökosit infiltrasyonunu azalttığı görülmüştür (Szabo, 1991).

Yaşa bağlı makula dejenerasyonunda da serbest radikallerin rol oynayabileceği düşünülmektedir. İnsan RPE hücrelerinde katalaz aktivitesinin yaşla birlikte, makula dejenerasyonu olan olgularda istatistiksel olarak önemli oranda azaldığı gösterilmiştir. Bu azalış, katalaz geni ekspresyonunda azalma, inaktif katalaz komplekslerinin azalması veya demir, çinko, bakır gibi gerekli katyonların eksikliği ile açıklanmaktadır. Vitamin C, E, karotenoid, selenyum çinko, oksidatif strese rol oynayan bir çok antioksidan vitamin, mineral ve enzimin faydalı etkisi olabilmektedir. Bir çok hayvan çalışmalarında, yüksek antioksidan diyet ile beslenen hayvanların antioksidan diyetten yoksun olan hayvanlara göre daha az retinal dejenerasyon geliştirdiği gösterilmiştir. Başka bir çalışmada da yaşla birlikte oküler dokularda antioksidanların azaldığı ve bazı besinlerin ilavesi ile bunların aktivitelerinin tekrar uyarıldığı gösterilmiştir (Braquet and Doly, 1986; Seddon, 1994; West, et al., 1994).

Yeni bir serbest radikal giderici olan Ginkgo biloba ekstresinin üveitte artmış retina lipid peroksidasyonunu azalttığı ve üveitte düşmüş glutatyon peroksidaz değerlerini arttırdığı saptanmıştır (Bilgihan, 1992).

2.3. Antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği biyolojik etkileri önlemek için vücutta bir çok savunma mekanizması oluşmuştur. Bunlar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler. Antioksidatif savunma mekanizması serbest radikallerin üretilmesi ile yok edilmesi arasındaki dengeyi sağlarlar. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler (Zima, et al., 1996; Schmidtman, et al., 1991).

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki gösterirler (Akgül, 1996);

- **Toplatıcı etki (Scavenging effect):** Serbest radikalleri etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni bir moleküle çevirme.
- **Bastırıcı etki (Quencher effect):** Serbest radikallerle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma.
- **Onarıcı etki (Repair effect)**
- **Zincir kırıcı etki (Chain breaking effect):** Serbest radikalleri kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleme (Akgün, 1996).

Enzimatik Korunma Mekanizmaları

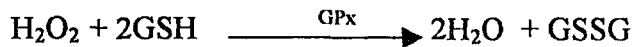
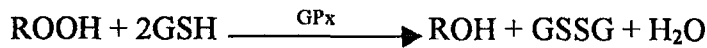
Süperoksit Dismutaz (SOD): Oluşumlarına süperoksit radikallerinin neden olduğu diğer radikaller süperoksitin kendisinden çok daha reaktif ve toksik etkilidir. Süperoksit radikalleri oluştukları anda uzaklaştırılmazlar ise, diğer radikallerin oluşması kaçınılmazdır. Bu nedenle, canlılarda oksijenin toksik etkilere karşı korunma mekanizmasının süperoksit radikallerinin birikmesini önlemek şeklinde olması beklenmelidir (Kılınç, 1985).

SOD, toksik süperoksit radikallerini elimine eden, serbest radikallere karşı doğal bir defans sistemidir (Durak ve diğ., 1993; Fulbert, et al., 1992).

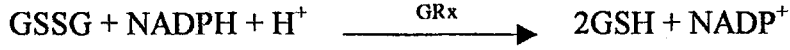


SOD yalnızca süperoksit üretilen bir sistemde oksijenin toksik etkilerini önler. Radyasyonun etkisinde olduğu gibi, süperoksit radikalının yanı sıra diğer radikallerin de üretildiği bir ortamda SOD, oksijenin toksik etkilerini tümü ile önleyemez, çünkü koruma basamağı aşılmıştır (Kılınç, 1986).

Glutasyon Peroksidaz (GPx): GPx, organik hidroperoksitlerin ve hidrojen peroksitin redüksiyonunu indirgeyici ajan olarak glutasyonu kullanarak katalize eden bir antioksidan enzimdir (Yoshimura, et al., 1996).



Hidroperoksitlerin redükte olması ile meydana gelen okside glutatyon, glutatyon redüktazın (GRx) katalizlediği reaksiyon ile tekrar redükte formuna döner.

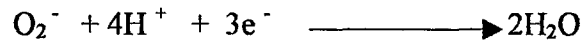


Kanda iki farklı tip GPx tanımlanmıştır; eritrositlerdeki klasik GPx ve ekstra-sellüler GPx (EGPx). Her iki enzimde aktif bölgelerinde selenosistein formunda selenyum içerirler. EGPx, selüler GPx'den gen dizisi yapısı, farklı kromozomdaki gen lokalizasyonu ve substrat spesifikliğı gibi bazı özellikleri ile ayrılır. EGPx'in en önemli kaynağının böbrek olduğu ve plazma antioksidan aktivitesinde anahtar enzimlerden biri olduğu bilinmektedir (Yoshimura, et al., 1996).

Katalaz (CAT): Katalaz enzimi hidrojen peroksiti direkt olarak suya çevirir. Böylece ikinci derecede sentezlenen toksik hidroksil radikallerinin yapımı engellenmiş olur. İndirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit metil ve etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine etki etmez (Akgül, 1996).



Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz: Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz, aşağıdaki reaksiyon ile süperoksiti detoksifiye eden enzimdir. Bu reaksiyon, fizyolojik şartlarda sürekli oluşan normal bir reaksiyon olup bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji sağlanır (Akkuş, 1995).

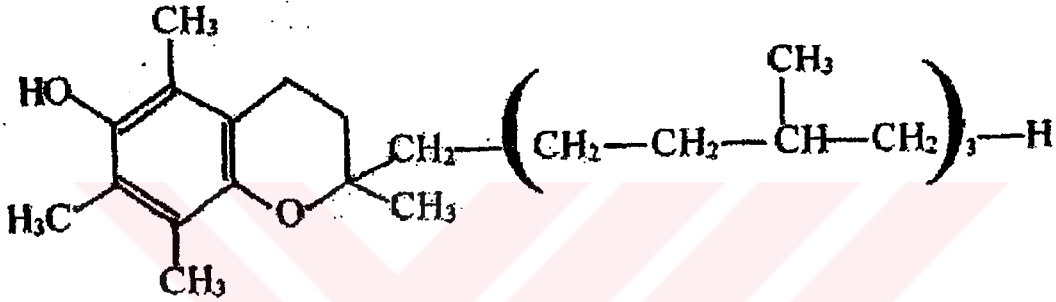


Nonenzimatik Antioksidanlar

Vitamin C: C vitamini, organizmada bir çok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. Güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Süperoksit ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. C vitaminin bir diğer özelliğı, antioksidan etkisi yanında oksidan etki de göstermesidir. Çünkü C vitamini ferri demiri (Fe^{+3}), ferro demire (Fe^{+2}) indirgeyen süperoksit radikali dışındaki tek hücresel ajandır. Bilindiğı

gibi Fe^{+2} fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye uygun olan bir formdur. Yani süperoksit üretimine katkıda bulunur. Bu etkisinin sadece düşük konsantrasyonlarda (0, 2 mM) görüldüğü daha yüksek konsantrasyonlarda ise güçlü bir antioksidan olarak etki ettiği kaydedilmiştir (Akkuş, 1995).

Vitamin E: Vitamin E'nin 8 adet tokoferol formu vardır. Bunlardan α -tokoferol en aktif olanıdır. Başlıca fonksiyonu; hücre membran fosfolipitlerinde bulunan poliansature yağ asitlerini ve özellikle LDL'yi serbest radikallerin oksidasyonundan korumaktadır. Zincir kırıcı bir antioksidan olarak bilinir (Akkuş, 1995; Champe and Harvey, 1994).



Şekil-7: Vitamin E formu olan alfa tokoferolün moleküler yapısı.

Vitamin E molekülü yapısal olarak birbiri ile bağlantılı bir grup bileşik içerir. Bunlar temelde 2-metil-6 kroman halkası içerirler ve 2. karbona bağlı 16 karbonlu fitil yan zincir kapsarlar. Vitamin E benzeri etkiye sahip bileşikler, iki grupta toplanırlar. Birinci grup tokoferoller, ikinci grup tokotrienoller olarak adlandırılır. Tokoferoller alfa (α), beta (β), gama (γ), delta (δ) olmak üzere 4 çeşit molekül ve bunların stereoizomerlerinden oluşur. E vitaminin halka yapısındaki oksijenin 2p-tip elektron çiftleri aromatik düzeye ne kadar dik bulunursa, türevin antioksidan özelliği o derece artar. Bu durumda dihidrofuranlar dihidropiranlardan daha aktiftir. Aromatik halkanın ve 2. karbonun elektron fazlalığı antioksidan etkiyi artırır. Tekli (singlet) oksijenin tokoferol homologları tarafından tutulma hızı α , β , γ , δ tokoferol sırasındadır. Tokoferollerin biyolojik oksidasyon ürünleri de antioksidan aktivite gösterirler. Alfa tokoferol dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunur. En yüksek vitamin E

konsantrasyonları, mitokondri ve mikrozomlar gibi membrandan zengin hücre organellerinde bulunur.

Vitamin E TPGS (d-alfa-tokoferol polietilen glikol 1000 süksinat) bir vitamin E türevidir. Hidrofilik polar başı (tokoferol süksinat) ve lipofilik alkil kuyruğa (polietilen glikol) sahip olup amphifilik özellik göstermektedir. Vitamin E-TPGS suda çözünür lipofilik bir özellik gösterir. Vitamin E TPGS ile uzun süreli tedavinin normal plasma alfa tokoferol, yağ dokusu alfa tokoferol konsantrasyonunu arttırdığı ve vitamin E eksikliğine bağlı gelişen nörolojik bozuklukların ilerlemesini durdurduğu gösterilmiştir.

Bitkisel yağlar ve tohumlar, E vitamininden zengin kaynaklardır. Bitkisel yağların sabunlaşmayan kısımlarında ve en çok yer fıstığı, badem, pamuk yağı ve keten tohumunda bulunur. Zeytin yağında eser miktarda bulunur.

Diyette, yağda çözünmüş olarak alınır, yağ sindirimi sırasında açığa çıkar ve emilir. Emilebilmesi için yağ emiliminin ve safra asidlerinin normal olması gerekir. Herhangi bir taşıyıcı protein olmadan, pasif difüzyonla emilir. E vitaminin en önemli depolanma yeri yağ dokusu ve karaciğerdir. Retinanın değişik tabakalarındaki vitamin E seviyesi tespit edilebilmiştir. En yüksek miktar retina pigment epitelinde bunu takibende fotoreseptörlerin dış segmentindedir.

E vitamini eksikliğinde retinada uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinde geri dönüşümsüz kayıp, lipid peroksidasyonunda artma ve membran geçirgenliğinde değişiklik olduğu bilinmektedir.

3. MATERİYAL VE METOT

3. 1. Hayvanların Hazırlanması

Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı ve Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Denekler, Elazığ Hayvan Kontrol Merkezi Müdürlüğü'nden temin edilen 400-600 gram ağırlığında erkek cins 40 adet pigmentli ve sağlıklı kobay (Guinea pig)'den oluşmuştur. Denekler beş gruba ayrılarak her gruba standart hazırlık, anestezi ve cerrahi teknik uygulanmıştır. Her grup 8 denekten oluşmuştur.

GRUPLAR

1. Grup (Kontrol grubu): Bu gruba herhangi bir işlem yapılmamış olup, sadece normal değerlerin saptanması amaçlanmıştır.

2. Grup (İ-R): Bu gruba iskemi reperfüzyon işlemi yapılmış ve plasebo olarak serum fizyolojik verilmiştir. 90 dakikalık iskemiden sonra 24 saatlik reperfüzyon gerçekleştirilmiştir.

3. Grup (İ-R+alfa tokoferol grubu): Bu gruba iskemi-reperfüzyon işlemi yapılmış ve sıvı yağda çözünen alfa tokoferol uygulanmıştır. 90 dakikalık iskemiden sonra 24 saat reperfüzyon gerçekleştirildi. Alfa tokoferol 3 doz olarak subkutan enjeksiyonla verildi.

1. Doz: 300 IU
2. Doz: 300 IU
3. Doz: 280 IU

4. Grup (İ-R+ gama tokoferol grubu): Bu gruba iskemi-reperfüzyon işlemi yapılmış ve sıvı yağda çözünen gama tokoferol uygulanmıştır. 90 dakikalık iskemiden sonra 24 saat reperfüzyon gerçekleştirildi. Gama tokoferol 3 doz olarak subkutan enjeksiyonla verildi.

1. Doz: 370 IU
2. Doz: 350 IU
3. Doz: 350 IU

5. Grup (İ-R+ vitamin E-TPGS grubu): Bu gruba iskemi-reperfüzyon işlemi yapılmış ve suda çözünen vitamin E-TPGS uygulanmıştır. 90 dakikalık iskemiden sonra 24 saat reperfüzyon gerçekleştirildi. Vitamin E-TPGS 3 doz olarak subkutan enjeksiyonla verildi.

1. Doz: 274 IU
2. Doz: 250 IU
3. Doz: 250 IU

Anestezi Tekniği: İntramasküler 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı Türkiye) ve 5 mg/kg Xsilazin hidroklorid (Rompun, Bayer, Türkiye) kombinasyonu ile anestezi ve analjezi sağlandı. İşlem öncesi deneklerin kornealarına %0.5'lik proparokain hidroklorid damlatılmış olup, hiçbir denekte solunum ve kan basıncı desteği sağlanmamıştır.

3.2. İskemi ve Reperfüzyon Oluşturulması

Bütün deneklerin gözü biyokimyasal inceleme için kullanılmıştır. Denekler yüzüstü pozisyonda laboratuvar masasına yatırılarak anestezi ve analjezi uygulandı. Kontrol grubuna herhangi bir işlem yapılmadı. Plasebo, alfa-tokoferol, gama-tokoferol ve vitamin E-TPGS grubundaki deneklerde retinal iskemi oluşturmak amacıyla, distile su şişesine ucunda insülin iğnesi olan serum seti takılmış ve bu insülin iğnesi ile temporal limbustan ön kameraya girilmiştir. Göz içi basıncı 150 mm Hg olacak şekilde serum şişesi 204 cm yüksekliğe çıkartılarak tespit edilmiş ve bu yükseklikte 90 dakika süreyle tutulmuştur. İskeminin başlamasıyla birlikte plasebo grubuna 1 ml serum fizyolojik subkutan olarak verildi. 90 dakikalık iskemi sonrasında serum şişesi göz seviyesine indirilerek, göz içi basıncı normal seviyeye düşürülmüş ve takiben iğne ön kameralardan çekilmiştir. Denekler 24 saat süreyle reperfüzyon ortamında bekletilmiştir. Reperfüzyonun başlaması ile birlikte 1,8 ve 16'ncı saatlerde 3.gruba alfa tokoferol ,4.gruba gama tokoferol ve 5.gruba vitamin E-TPGS subkutan olarak uygulanmıştır.

3.3. Retina Örneğinin Hazırlanması

90 dakikalık iskemiden sonra, denekler 24 saat süreyle reperfüzyon ortamında bekletilmiş ve takiben intrakardiyak 50 mg/kg thiopental sodyum (Pentothal Sodium, Abbott) ile kobaylar öldürülüp gözler enükle edilmiştir. Her gruptaki enükle edilen gözler incelenmeye alınmıştır.

Biyokimyasal analizler için alınan gözler enüklasyon sonrası süratle buz kabı üzerine konup, bistürü yardımıyla pars plana bölgesinden ikiye ayrıldı. Vitreus dokusu sellüloz süngerler ile temizlendikten sonra, ameliyat mikroskobu yardımıyla retina dokusu koroidden ayrılarak tüplere konmuş ve tüpler derin dondurucuda -80 °C'de biyokimyasal inceleme gününe kadar muhafaza edilmiştir.

3.4. Glutasyon(GSH) Ölçümü

Ayırıcı oluşturan maddeler

Ayıraç I : 0.2 N HCl içinde 1.2×10^{-2} M kromojenik ayıraç solüsyonu

Ayıraç II: %30 NaOH

Tampon Solüsyonu (S₃): 0.2 mM dietilentriamin pentaasetik asit (DTPA) ve %0.025 (W/v) lubrol içeren 20 mM potasyum fosfat pH 7.8 (25 °C)

Retina Örneklerinin Hazırlanması

Standart Eğrinin Hazırlanması

Her yeni analizden önce, en az beş farklı GSH konsantrasyonunda bir standart eğri hazırlanmıştır. Bu beş konsantrasyon reaksiyon ortamında 20-100µmol/L değerlerini kapsayacak şekilde hazırlanmıştır. 5 gram metafosforikasit (MPA)'yı 100 ml suda çözündürerek MPA çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.

Retina Doku Örneklerinin Hazırlanması

1. %0.9 NaCl solüsyonu ile yıkandı.
2. Doku foil kağıt üzerine bırakılıp ağırlığı tartılarak belirlendi.
3. Buz ile soğutulmuş MPA çalışma solüsyonunda doku homojenize edildi
4. 4 °C'de 10 dakika 3000 g'de santrifüj edildi.

5. Üst kısımdaki faz alınarak ve 0-4 °C’de analiz zamanına kadar bekletildi.
Bulutsu süpernatant 0.2µm’lik filtreler ile süzüldü.

GSH standart çalışma solüsyonunu hazırlamak için;

GSH Standart Eğri

[GSH] µmol/L	0	20	40	60	80	100
(Kör)						
Tampon S ₃ (µl)	900	860	820	780	740	700
GSH çalışma Solüsyonu	0	40	80	120	160	200
(0.5 mmol) (µl)						

Her bir standart örneğe şema halinde gösterildiği şekilde ilaveler yapılmıştır.

50 µl Ayıraç I eklendi.



Vortekslendi

50 µl Ayıraç II eklendi.



Vortekslendi

25 ± 3 °C de 10 dakika karanlıkta bekletildi.



400 nm de absorbansları okundu.

Glutatyon(GSH) Seviyesinin Ölçümü

1. Her bir örnekten 100µl alınıp üzerine tampon çözeltisinden 900µl ilave edilmiştir.
2. Örnek ve standartlara 50µl ayıraç I ilave edildikten sonra vortekslenerek karışım sağlanmıştır.
3. Daha sonra ayıraç II’den 50µl ilave edilip iyice karıştırılmıştır.
4. Karanlık ortamda 10°C sıcaklıkta bekletilmiştir.
5. Örnek ve standartların absorbansları 400 nm’de okunmuştur.

Glutatyon(GSH) Konsantrasyonunun Ölçümü

Örneklerin absorbans değerleri standart kurvedeki formüle uyarlanarak belirlenmiş ve bu değerler dilüsyon oranları göz önünde bulundurularak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar $\mu\text{g}/\text{mg}$ retina yaş ağırlık şeklinde ifade edilmiştir.

3.5. Malondialdehit (MDA) ölçümü

Retina Örneklerinde Lipit Peroksit Ölçümü

Retina örneklerinde lipit peroksit ölçümü Ohkawa ve ark'nın (1979) geliştirdikleri malondialdehit (MDA) yöntemi modifiye edilerek hazırlanan OXIS kiti(LPO-586) ile yapılmıştır.

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.

Ayırıcılar:

1. % 8. l'lik Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)
2. %20'lik Glasiyal Asetik Asit (GAA, 2 N NaOH ile pH 3.5'e ayarlanır.)
3. %80'lik 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

Buharlaşmayı önlemek için tüplerin üst kısımlarına bilye yerleştirildikten sonra 95°C'deki su banyosunda 1 saat bekletildi. Soğuk su altında soğutulduktan sonra tüplere;

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
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:

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

Homojenat Hazırlanması: Kobaylardan alınan retinaların tartımları yapıldı. Net ağırlıkları belirlenen retinalar, her gram başına 9 ml %1.15'lik KCl olacak şekilde sulandırıldı ve +4 °C'de homojenize edildi.

4. RETİNADA GSH ÖLÇÜM SONUÇLARI

Tablo-1: Kontrol grubunda GSH seviyesi

Grup Kontrol	Konsantrasyon ($\mu\text{gGSH}/\text{mg}$ retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer
1	1.63	1.54
2	1.52	
3	1.46	
4	1.52	
5	1.63	
6	1.52	
7	1.52	
8	1.48	

Tablo-2: İ-R grubunda GSH seviyesi

Grup İ-R	Konsantrasyon ($\mu\text{gGSH}/\text{mg}$ retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer
1	0.97	1.03
2	1.08	
3	0.97	
4	1.08	
5	1.2	
6	0.86	
7	1.19	
8	0.86	

Tablo-3: İ-R+Gama tokoferol grubunda GSH seviyesi

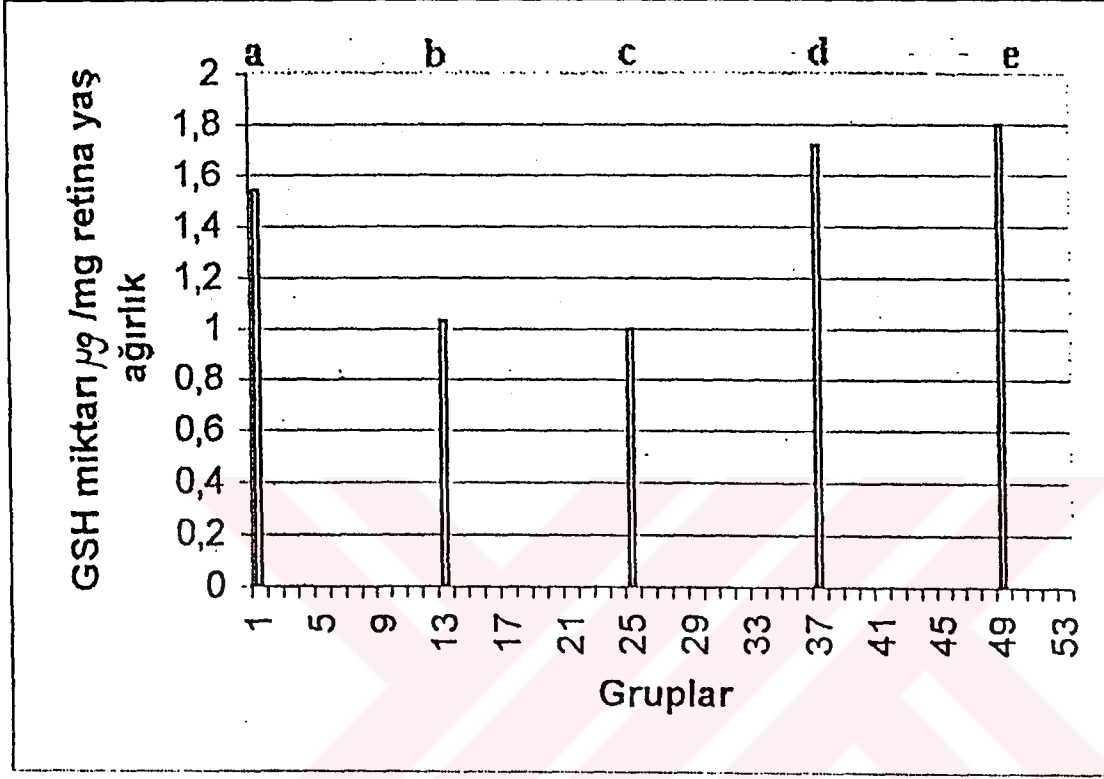
Grup İ-R +Gama tokoferol	Konsantrasyon ($\mu\text{gGSH}/\text{mg}$ retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer
1	0.86	1
2	0.97	
3	0.92	
4	1.08	
5	0.92	
6	1.3	
7	0.96	
8	0.98	

Tablo-4: İ-R/TPGS grubunda GSH seviyesi

Grup İ-R+ vitamin E -TPGS	Konsantrasyon ($\mu\text{gGSII}/\text{mg retina}$ yaş ağırlığı)	Ortalama değer
1	1.35	1.72
2	1.62	
3	1.95	
4	1.9	
5	1.5	
6	1.82	
7	1.9	
8	1.68	

Tablo-5: İ-R/Alfa tokoferol grubunda GSH seviyesi

Grup İ-R+ alfa tokoferol	Konsantrasyon ($\mu\text{gGSII}/\text{mg retina}$ yaş ağırlığı)	Ortalama değer
1	1.4	1.8
2	1.46	
3	1.14	
4	2.17	
5	2.33	
6	2.12	
7	1.9	
8	1.85	



a. kontrol grubu

GSH ort.değ.: 1.54 µgGSH/mg RYA

b. İ-R grubu

GSH ort.değ.: 1.03 µgGSH/mg RYA

c. İ-R+gama tokoferol grubu

GSH ort.değ.: 1.00 µgGSH/mg RYA

d. İ-R+vitamin E-TPGS grubu

GSH ort.değ.: 1.72 µgGSH/mg RYA

e. İ-R +alfa tokoferol grubu.

GSH ort.değ.: 1.80 µgGSH/mg RYA

ort.değ. : Ortalama değer.

RYA : Retina Yaş Ağırlık

5. RETİNADA MDA ÖLÇÜM SONUÇLARI

Tablo-6: Kontrol grubunda MDA seviyesi

Grup Kontrol	Konsantrasyon (nmolMDA/mg retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer
1	3.19	3.25
2	3.22	
3	3.36	
4	3.25	
5	3.08	
6	3.15	
7	3.45	
8	3.28	

Tablo-7: İ-R grubunda MDA seviyesi

Grup İ-R	Konsantrasyon (nmolMDA/mg retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer
1	4.28	3.95
2	3.83	
3	4.29	
4	3.55	
5	3.76	
6	4.46	
7	3.62	
8	3.84	

Tablo-8: İ-R+Gama tokoferol grubunda MDA seviyesi

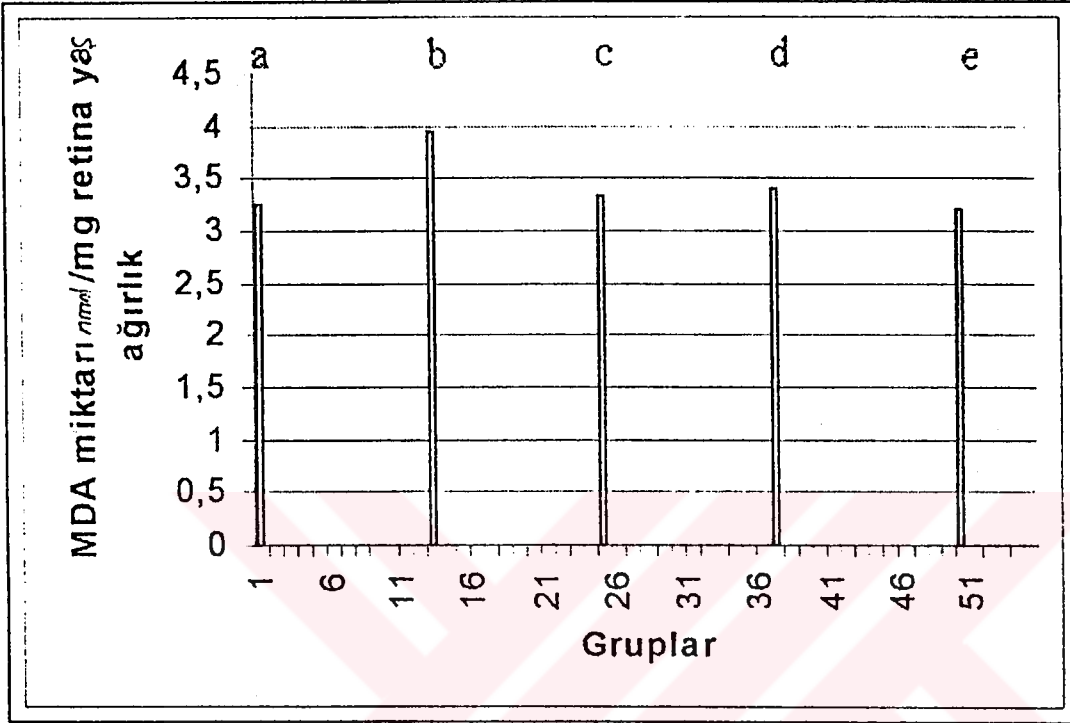
Grup İ-R +Gama tokoferol	Konsantrasyon (nmolMDA/mg retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer
1	3.27	3.32
2	3.49	
3	3.43	
4	3.46	
5	3.25	
6	3.3	
7	3.28	
8	3.1	

Tablo-9: İ-R/TPGS grubunda MDA seviyesi

Grup İ-R+ vitamin E -TPGS	Konsantrasyon (nmolMDA/mg retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer
1	3.46	3.41
2	3.38	
3	3.43	
4	3.42	
5	3.5	
6	3.4	
7	3.32	
8	3.36	

Tablo-10: İ-R/Alfa tokoferol grubunda MDA seviyesi

Grup İ-R+ alfa tokoferol	Konsantrasyon (nmolMDA/mg retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer
1	3.3	3.21
2	3.16	
3	3.14	
4	3.27	
5	3.16	
6	3.02	
7	3.54	
8	2.95	



a. kontrol grubu

MDA ort.değ.:3.25 nmolMDA/mg RYA

b. İ-R grubu

MDA ort.değ.:3.95 nmolMDA/mg RYA

c. İ-R+gama tokoferol grubu

MDA ort.değ.:3.32 nmolMDA/mg RYA

d. İ-R+vitamin E-TPGS grubu

MDA ort.değ.:3.41 nmolMDA/mg RYA

e. İ-R +alfa tokoferol grubu.

MDA ort.değ.:3.21 nmolMDA/mg RYA

ort.değ. :Ortalama değer.

RYA : Retina Yaş Ağırlık

GSH sonuçları SPSS istatistik programına göre değerlendirilmiştir. Kontrol grubunun retina dokusunda GSH düzeyi 1.54 $\mu\text{m}/\text{mg}$, İ-R grubunda 1.03 $\mu\text{m}/\text{mg}$, İ-R+gama tokoferol grubunda 1 $\mu\text{m}/\text{mg}$, İ-R+alfa tokoferol grubunda 1.8 $\mu\text{m}/\text{mg}$ ve İ-R+vitamin E -TPGS grubunda 1.72 $\mu\text{m}/\text{mg}$ retina yaş ağırlığı olarak ölçülmüştür (Tablo-1,2,3,4,5).

Retina dokusundaki MDA düzeyleri de GSH düzeylerinin ölçümlerinin yapıldığı SPSS istatistik programına göre yapılmıştır. Kontrol grubunun retina dokusunda MDA düzeyi 3.25 nmol/mg, İ-R grubunun retina dokusunda MDA düzeyi 3.95 nmol/mg, İ-R+gama tokoferol grubunun retina dokusunda MDA düzeyi 3.32 nmol/mg, İ-R+alfa tokoferol grubunun retina dokusunda MDA düzeyi 3.21 nmol/mg ve İ-R+vitamin E-TPGS grubunun retina dokusunda MDA düzeyi 3.41 nmol/mg retina yaş ağırlığı olarak ölçülmüştür (Tablo-6,7,8,9,10).

Kobay retina dokularındaki MDA değerleri, gama tokoferol ve vitamin E-TPGS uygulanan iskemi-reperfüzyonlu (İ-R) kobaylarda kontrol grubuna göre kısmen artış göstermiştir. Antioksidan uygulanmayıp İ-R' ye maruz bırakılan kobaylarda ise MDA değeri belirgin bir düzeyde artış göstermiştir. Alfa tokoferol uygulanan grupta MDA değeri ise kontrol grubuna göre çok az düşme göstermiştir.

Kobay retina dokularındaki GSH değerleri ise alfa tokoferol ve vitamin E-TPGS uygulanan iskemi-reperfüzyonlu (İ-R) gruplarda, kontrol ve İ-R gruplarına göre artış gösterdiği tespit edilmiştir. Gama tokoferol uygulanan iskemi-reperfüzyonlu grubun GSH değerleri ise İ-R grubuna yakın olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak antioksidan madde kullanılan gruplarda MDA miktarı iskemi-reperfüzyon uygulanıp antioksidan madde kullanılmayan gruba göre belirgin düzeyde düştüğü deneylerle saptanmıştır.

6. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Glutasyonun İstatistiksel Analizi

Gruplar arasındaki farklılık Kruskal-Wallis testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve sonuçta 5 grup arasında anlamlı farklılıklar görülmüştür ($p < 0.0001$).

Gruplar arasında mukayese ise Mann Whitney testi yapılarak belirlenmiştir.

Buna göre;

- Kontrol ile İ-R grupları arasında anlamlı bir farklılık görülmüştür ($p < 0.0001$).
- Kontrol ile alfa tokoferol grupları arasında önemli bir farklılık görülmemiştir ($P > 0.05$).
- Kontrol ile gama tokoferol grupları arasında bir farklılık görülmüştür ($p < 0.001$).
- Kontrol ile vitamin E-TPGS grupları arasında önemli bir farklılık görülmemiştir ($p > 0.05$).

Malondialdehitin İstatistiksel Analizi

Gruplar arasındaki farklılık Kruskal-Wallis testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve sonuçta 5 grup arasında anlamlı farklılıklar görülmüştür ($p < 0.0001$).

Gruplar arasında mukayese ise Mann Whitney testi yapılarak belirlenmiştir.

Buna göre;

- Kontrol ile İ-R grupları arasında anlamlı bir farklılık görülmüştür ($p < 0.001$).
- Kontrol ile alfa tokoferol grupları arasında önemli bir farklılık görülmemiştir ($P > 0.005$).
- Kontrol ile gama tokoferol grupları arasında önemli bir farklılık görülmemiştir ($p > 0.005$).
- Kontrol ile vitamin E-TPGS grupları arasında anlamlı bir farklılık görülmüştür ($p > 0.01$).

7. TARTIŞMA

Serbest radikaller son halkalarında eşleşmemiş bir elektron bulunduran moleküllerdir ve vücutta normal metabolik süreçler sırasında oluşabilecekleri gibi birçok patolojik olay sırasında da oluşabilmektedirler. Serbest radikaller biyomolekülleri okside edip doku yaralanması ve hücre ölümüne yol açarlar. Serbest radikallerin hücresel kaynakları, rol aldıkları reaksiyonlar ve serbest radikallere karşı antioksidan savunma mekanizmalarının açığa kavuşmasıyla bugün bilinmeyen bir çok olayın patojenezi aydınlatılabilmektedir (Cheeseman and Slater, 1993).

Bu çalışmadan kobay retinalarına uygulanan iskemi ve reperfüzyon ile serbest radikallerin oluşumu amaçlanmıştır. Bilindiği gibi serbest radikaller lipit peroksidasyonunu başlatmaktadır. Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA bileşiği retina dokusunda ne derecede serbest radikaller oluşturduğumuzun bir göstergesi olmuştur.

Serbest radikaller son derece reaktif olup çok kısa ömürlüdürler. Serbest radikalleri doğrudan ölçmek zor olduğundan bunların dolaylı göstergesi olan yıkım ürünlerinin ölçülmesi sık başvurulan bir yöntemdir. Bu radikallerin en önemli etkisinin poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu olduğu kabul edilmektedir. Bu şekilde oluşan lipit peroksitleri kolaylıkla yıkılarak, en önemlisi MDA olan reaktif karbon bileşiklerini meydana getirirler. Lipit peroksidasyonu sonucu açığa çıkan ürünler, membran permeabilitesini önemli ölçüde etkilemektedir. Peroksidasyonda oluşan malondialdehit, membran moleküllerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu olayda deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre membran bileşenlerinin agregasyonu gibi membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler MDA'nın niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar (Akkuş, 1995; Cheeseman and Slater, 1993).

Gözde lipit peroksidasyonuna karşı birçok savunma mekanizmalarının olduğu gösterilmiştir. Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz gibi enzimler ile askorbat, karotenoidler, vitamin E gibi antioksidanlar gözde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır (Baybek, 1997; Braquet and Doly, 1986).

Lipit peroksidasyonu poliansatüre yağların oksidatif hasarının bir sonucu olduğu iyi bilinmektedir. Retinanın özellikle fotoreseptör tabakası(sensoriyal retina) yüksek konsantrasyonda doymamış yağ asitleri bulundurmaktadır. Dokosaheksanoik asit fotoreseptör membranının başlıca fosfolipiti olarak bilinmektedir ve lipit peroksidasyonuna oldukça yatkındır. Oksijen bakımından retina oldukça zengin bir dokudur. Işığa karşı duyarlı olan bu dokunun lipit peroksidasyonuna maruz kalma riski yüksektir(Baybek,1997; Braquet and Doly,1986). Birçok çalışmada aşırı oksijenin ışığın ve radyasyonun lipit peroksidasyonunu başlatarak , retinada hücrel elemanların hasarına yol açtığı tespit edilmiştir (Kagan,et al.,1973)

Bizim çalışmamızda da iskemi-reperfüzyon oluşturulmuş kobay retinalarında lipit peroksidasyon ürünü olan MDA değerlerine bakılarak retina lipit peroksidasyonunda çok anlamlı şekilde artış olduğu saptanmıştır.

Vitamin E, serbest radikallerin sebep olduğu hasarlarda merkezi rol oynamaktadır. Bu vitaminin, retina pigment epitelinde ışığa maruz kalmaktan dolayı oluşan hasarın azaltılmasında etkili olduğu tespit edilmiştir. (Wiegand, et al., 1986; Katz and Robinson , 1987). Uzun süreli vitamin E eksikliği retinal degradasyonuna sebep olabilmektedir (Bron, et al., 1995).

Serbest radikaller, birçok metabolik olayda devamlı olarak üretilirken redükte glutatyon ve vitamin E gibi antioksidanlar tarafından hızla ortamdaki uzaklaştırılırlar. Özellikle iskemik dokularda vitamin E konsantrasyonu düşük olarak tespit edilmiştir (Wolff, 1993).

Çalışmamızda etkili bir antioksidan olan vitamin E formları kullanılmıştır. Kobay retina dokusunda MDA ve GSH düzeylerine bakılarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Antioksidan (vitamin E formları) uygulanmayan İ-R grubunda MDA değeri arttığı halde alfa tokoferol, gama tokoferol ve vitamin E-TPGS uygulanan gruplarda belirgin bir şekilde düştüğü saptanmıştır. Alfa tokoferol, gama tokoferol ve vitamin E-TPGS gruplarındaki MDA değerleri kontrol grubunda saptanan MDA değerine yakınlık gösterdiği gözlemlenmiştir. Bununla birlikte alfa tokoferol ve vitamin E-TPGS uygulanan gruplarda GSH değerleri kontrol, İ-R ve gama tokoferol uygulanan gruplara

göre yüksek bulunmuştur. Gama tokoferol grubunda GSH değeri, İ-R grubuna yakınlık gösterdiği, kontrol grubundan ise daha düşük değerde olduğu tespit edilmiştir. Böylece bu çalışmanın da amacına uygun olarak vitamin E formlarının iskemi ve reperfüzyona maruz kalmış kobay retinalarında ne derece etkili olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, iskemi ve reperfüzyon oluşturulmuş kobay retinalarında lipid peroksidasyon düzeyinin çok anlamlı bir şekilde arttığı saptanmıştır. Antioksidan etkisi bilinen vitamin E uygulanması, retinadaki lipid peroksidasyonunu anlamlı bir şekilde düşürmüştür. Çok güçlü bir antioksidan olan vitamin E iskemi-reperfüzyon ile oluşturulan serbest radikallerin sebep olduğu retina degradasyonunu önlemede kullanılabileceğini düşünmekteyiz.



KAYNAKLAR

- ADACHI, T., NAKAMURA, M., YAMADA, H., FUTENMA, A., 1994. Quantitative and qualitative changes of extracellular-superoxide dismutase in patients with various diseases. **Clin. Chim. Acta.**, 229:123-131.
- AKGÜL, E., 1996. Tıp II diyabetes mellituslu hastalarda oksidan ve antioksidan mekanizmaların incelenmesi. **Uzmanlık tezi**, Elazığ: Fırat Üniversitesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı.
- AKKUŞ, İ., 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1. Baskı, Konya: **Mimoza Yayınları**, 1-84.
- BARNET, A.H., 1993. Origin of the microangiopathic changes in diabetes. **Eye**, 7: 218-22.
- BARRY, M.C., GRACE, P.A., 1997. Ischaemia Reperfusion Injury. **Surgery**, 68-72.
- BAYBEK, T., 1997. Serbest oksijen radikalleri ve oksijen hasarı. **MN Oftalmoloji**, 4(4): 271-4
- BAYNES, J.V., 1991. Role of oxidative stress in development of complication in diabetes. **Diyabetes**, 40: 405-12.
- BENGİSU, Ü., 1990. **Göz hastalıkları**, 3. Baskı Beta Basım Yayın Dağıtım A.Ş. 10: 118-132.
- BİLGİHAN, A., 1992. Deneysel olarak üveit oluşturulan kobaylarda Ginkgo biloba ektesinin retina lipit peroksit ve glutatyon peroksidaz düzeylerine etkisi. **Uzmanlık Tezi**, Ankara Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı.
- BRON, A.M., MAUPOIL, V., GARCHER, C., GUYONNET, G., CHELQI, E.H., ROCHETTE, L., 1995, Modieication of vitamin E during ischemia-reperfusion in rat retina. **Invest Ophthalmol Vis. Sci.**, 36: 1084-1087
- BRAQUET, P., DOLY, M., 1986. Lipit peroxidation effects on isolated rat retina. **Antioxidation in Therapy and Preventive Medicine**, Edited by I. Emerit et al. Plenum Press, New York , 847-52.
- CHAMPE, P.C., HARVEY, R.A., 1994. **Lippincott's Illustrated Reviews Biochemistry**. 2nd edition, Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 114-115.

- CHEESEMAN, K.H., SLATER, T.F., 1993. An introduction to free radical biochemistry. **Br. Med. Bull.**, 49(3): 481-93
- DURAK, İ., YURTASIAN, Z., CANBOLAT, O., AKYOL, Ö.A., 1993. Methodological approach to superoxide dismutase activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium reduction. **Clin. Chim. Acta.**, 214:103-104.
- FULBERT, J.C., SUCCARI, M., CALS, M.J., 1992. Semi-automated assay of erythrocyte Cu-Zn superoxide dismutase activity. **Clin. Biochem.**, 25:115-119.
- GIARDINI, O., TACCONE, M., LUBRANO, R., TENORE, G., et al., 1984. Evidence of red blood cell membrane lipid peroxidation in haemodialysis patients. **Nephron**, 36: 235-237.
- GIUGLIANO, D., PAOLISSO, G., CERIELLO, A., 1996. Oxidative stress and diabetic vascular complications. **Diabetes Care**, 19(3): 257-67.
- HOLLEY, A.E., CHEESEMAN, K.H., 1993. Measuring free radical reactions *in vivo*. **British Medical Bulletin**, 49: 3: 494-505.
- JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J.O., KELLEY R., 1992. Appleton and Lange Press 7th edition, **Basic Histology**.
- KADOR, P.F., ALBERT, D.M., JACOBIEC, F.A., 1994. Biochemistry of the lens. **Principles and practice of ophtalmology**, Philadelphia: WB saunders Co. 146-67.
- KAGAN, V.E., SHEVODA, A.A., NOVIKOV, K.N., KOZLOV, Y.U.P. 1973. Light-induced free radical oxidation of membrane lipids in photoceptors of frog retina. **Biochimica et biophysica Acta**, 330: 76-9.
- KANSKI, J.J., 1994. **Clinical Ophthalmology**, 3rd edition, Oxford: Butterworth-Heinemann Ltd, 286-309.
- KARWATOWSKA, E., CZARNOWSKA, E., BERSEWICZ, A., 1992. Iron availability and free radical induced injury in the isolated ischaemic/reperfused rat heart. **Cardiovascular Research**, 26: 58-66.
- KATZ, M.L., ROBINSON, W.G., 1987. Light and aging effects on vitamin E in the retina and retinal pigment epithelium. **Vision Res.**, 27: 1875-1879
- KILINÇ, K., 1986. Kanserde oksijen radikalleri ve süperoksit dismutaz. **Biyokimya Dergisi**, XI: 3: 59-76.
- KILINÇ, K., 1985. Oksijen radikalleri, üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri. **Biyokimya Dergisi**, 10: 60-89.

- KÖSE, K., DOĞAN, P., 1992. Lipit peroksidasyonu. **Erciyes Tıp Dergisi**, Ek 1: 340-350.
- KÖKSEL, O., 1998. İskemi reperfizyona bağlı akciğer hasarı üzerine alfa-lipoik asitin etkisi. **Uzmanlık Tezi**, Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs-Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı.
- PAUL, J.L., SAIL, N.D., SONI, T., POIGNET, J.L., et al., 1993. Lipit peroxidation abnormalities in haemodialyzed patients. **Nephron**, 64: 106-109.
- REITER, R.R., TAN, D., POEGGELER, B., PELAEZ, A.M., 1993. Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases. **Annals New York Academy of Sciences**, 30: 1-11.
- RICHARD, M.J., ARNAUD, J., JURKOVITZ, C., HACHACHE, T., et al., 1991. Trace elements and lipid peroxidation abnormalities in patients with chronic renal failure. **Nephron**, 57: 10-15.
- SCMIDTMANN, S., MULLER, M., BAEHR, R., PRECHT, K., 1991. Changes of antioxidative homeostasis in patients on chronic haemodialysis. **Nephrol Dial Transplant Suply.**, 3: 71-74.
- SEDDON, J.M., 1994. Vitamins, minerals and molecular degeneration. **Arch. Ophthalmol.**, 112: 176-8.
- SPECTOR, A., WANG, G.M., WANG, R.R., LI, W.C., KLEIMAN, N.C., 1995. A brief photo chemically induced oxidative insult causes irreversible lens damage and cataract II. **Exp. Eye Res.**, 60: 483-93.
- SZABO, M.E., 1991. Ischemia and reperfusion-induced histologic changes in the rat retina. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, 32(5): 1471-8.
- TSAL, L.Y., LEE, K.T., TSAI, S.M., LEE, S.C., YU, H.S., 1993. Changes of lipit peroxide levels in blood and liver tissue of patients with obstructive jaundice. **Clin. Chim. Acta.**, 215: 41-50.
- WEST, S., VITALI, S., HALLFRISCH, J., MUNOZ, B., MULLER, D., BRESSLER, S., BRESSLER, N., 1994. Are antioxidants or supplements protective for age-related maculer degeneration. **Arch. Ophthalmol.**, 112; 222-7.
- WIEGAND, R.D., JOEL, C.D., RAPP, L.M., NIELSEN, J.C., MAUDE, M.B., ANDERSON, R.E., 1986. Polyunsaturated fatty acids and vitamin E in rat outer segments during light damage. **Invest Ophthalmol Vis. Sci.**, 27: 727-733

- WOLFF, S.P., GARNER, A., DEAN, R.T., 1986. Free radicals, lipids and protein degradation. **Trends in Biochemical Sciences**, January: 27-31.
- YEH, L., ASHTON, A., 1990. The increase in lipid peroxidation in diabetic rat lens can be reversed by oral sorbinil. **Metabolism**, 39(6): 619-22.
- YOSHIMURA, S., SUEMIZU, H., NOMOTO, Y., SAKAI, H., et al., 1996. Plasma glutathione peroxidase deficiency caused by renal dysfunction. **Nephron**, 73: 207-211.
- ZIMA, T., STIPEK, S., CRKOVSKA, J., NEMECEK, J., et al., 1996. Antioxidant enzymes-superoxide dismutase in haemodialyzed patients. **Blood Purification**, 14: 257-261.



ÖZGEÇMİŞ

29.09.1974 tarihinde Diyarbakır' da doğdum. Orta eğitimimi Diyarbakır Atatürk Lisesinde tamamladım. 1993 yılında Marmara Üniversitesi Atatürk Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği (İngilizce) bölümünü kazandım. 1998 yılında aynı bölümden mezun oldum. 3 yıl özel eğitim kurumlarında biyoloji öğretmenliği yaptım. 1999 yılının bahar döneminde Fırat Üniversitesi Fen – Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde Doç. Dr. Nihat DİLSİZ Beyin danışmanlığında yüksek lisansa başladım. Şuan Milli Eğitim Bakanlığında İngilizce öğretmeni olarak görev yapıyorum.

İhsan EKİN

