

**GLUKOZ-İNSÜLİN-POTASYUM (GİK)
İNFÜZYONU UYGULANMIŞ DİLATE
KARDİYOMİYOPATİLİ HASTALARDA
RADİKAL SÜPÜRÜCÜ ENZİM
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**GÜNNUR DEMİRCAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GLUKOZ-İNSÜLİN-POTASYUM (GİK) İNFÜZYONU
UYGULANMIŞ DİLATE KARDİYOMİYOPATİLİ
HASTALARDA RADİKAL SÜPÜRÜCÜ
ENZİM AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

GÜNNUR DEMİRCAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. EMİNE DIRAMAN**

GLUKOZ-İNSÜLİN-POTASYUM (GİK) İNFÜZYONU UYGULANMIŞ DİLATE KARDİYOMİYOPATİLİ HASTALARDA RADİKAL SÜPÜRÜCÜ ENZİM AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Bu çalışmada, glukoz-insülin-potasyum (GİK) infüzyonu verilmiş dilate kardiyomyopati (KMP) hastalarda tedavi süresince ve tedavi sonrası eritrosit antioksidan enzim aktiviteleri araştırılmıştır.

Bu amaçla, çalışmaya dilate KMP'li (EF<%40), New York Kalp Cemiyeti (NYHA) sınıflamasına göre grup III-IV kalp yetersizliği olan 41 hasta alınmıştır. Hastalardan 28'ine (GİK Grubu) standart tedaviye ek olarak 24 saatlik infüzyon şeklinde GİK solüsyonu (% 30'luk 500 cc glukoz içinde 300 Ü insülin, 60 mEq KCL) verilmiştir. Diğer 13 hastaya ise (Kontrol Grubu) yine aynı süre ve miktarda % 0.9'luk NaCl solüsyonu intravenöz olarak verilmiştir. Tüm hastalardan 0., 2., 8., 12., 24., ve 48. saatlerde venöz kan örnekleri alınarak eritrosit süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSHPx) aktivitesi ölçümü yapılmıştır.

GİK verilen grupta, 24. ve 48. saatte ölçülen SOD değerlerinin 0. ($p<0.05$), 2. ($p<0.05$) ve 8. saatteki ($p<0.05$) değerlerle karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir. GİK verilen grupta, bazal (0. saat) değerlere göre tedavi süresince ve tedavi sonrasındaki CAT aktivitesinde artış eğilimi görülmüştür. Ancak fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). GSHPx aktivitesinde ise; takip sırasında GİK grubunda anlamlı değişiklik görülmemiştir ($p>0.05$). Kontrol grubunda ise bazalde, tedavi süresince ve tedavi sonrasında ölçülen SOD, CAT ve GSHPx aktiviteleri benzer bulunmuştur ($p>0.05$). GİK ve kontrol grubunun 0., 2., 8., 12., 24. ve 48. saatte ölçülen SOD, CAT ve GSHPx değerlerinin ayrı ayrı iki grup arasındaki karşılaştırılmasında anlamlı fark saptanmamıştır (hepsi için $p>0.05$).

Sonuç olarak, dilate kardiyomyopati hastalarda standart tedaviye ek olarak GİK solüsyonunun verilmesi, miyokardiyal oksidatif stresi azaltarak metabolik anlamda düzelmeye sağlayabilir. Bu da, devam eden miyosit kaybını engelleyerek hastaların daha iyi klinik seyir izlemede katkı sağlayabilir.

Anahtar kelimeler: Kardiyomyopati, glukoz, insülin, potasyum, oksidatif stres

ASSESSMENT OF RADICAL SCAVENGING ENZYME ACTIVITIES IN PATIENTS WITH DILATED CARDIOMYOPATHY TREATED WITH GLUCOSE INSULIN POTASSIUM INFUSION

ABSTRACT

In this study, the erythrocyte antioxidant enzyme activities were investigated during and after therapy, in patients with dilated cardiomyopathy treated with glucose insulin potassium (GIK) infusion.

Forty one patients with dilated cardiomyopathy who had class III-IV heart failure according to the New York Heart Association (NYHA) classification was taken in to the study. GIK solution (300 U insulin plus 60 mEq KCl in 500 cc 30% glucose) as a 24 hour infusion was given to the 28 patients (GIK group) in addition to the standart treatment. To the rest of the patients (n=13), intravenous infusion of 0.9% NaCl was given in the same amount and time intervals (Control group). Activities of erythrocyte superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSHPx) was determined by taking venous samples from all patients at admission, 2nd, 8th, 12th, 24th and 48th hours.

In the GIK group, levels of SOD at 24th and 48th hours increased significantly when compared with levels at admission ($p<0.05$), 2nd hour ($p<0.05$) and 8th hour ($p<0.05$). Again in the GIK group, tendency to increase during and after treatment was seen in the CAT activity when compared with levels at admission, but this increase was not statistically significant ($p>0.05$). Significant increase was not determined in the GSHPx activity during follow-up in the GIK group ($p>0.05$). In the control group, activities of SOD, CAT and GSHPx measured at admission, during and after treatment were similar ($p>0.05$). Levels of SOD, CAT and GSHPx measured at admission, 2nd, 8th, 12th, 24th and 48th hours were not different significantly between the groups (for all of them, $p>0.05$).

As a conclusion, addition of GIK solution to the standard treatment of dilated cardiomyopathy patients can cause improvement in metabolic parameters by decreasing oxidative stress. This can lead to better clinical outcome of the patients by preventing continuing myocyte loss.

Key Words: Cardiomyopathy, glucose, insulin, potassium, oxidative stress

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bana sonsuz destek veren ve beni özveriyle yetiştiren sevgili danışman hocam Biyoloji Bölümü Başkan Yardımcısı Yrd. Doç. Dr. Emine Dıraman'a, her zaman eğitimliliğiyle ve hoşgörüsüyle yanımda hissettiğim Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Zafer Eren'e, gösterdiği manevi ve bilimsel destek için sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Banu Eren'e, tez çalışmalarım sırasında hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Gönül Akbal'a, dönem arkadaşlarım Yeliz Yılmaz, İrem Çelebioğlu ve Gülhan Akşimşek'e, Uzm. Biyolog Sevinç Sultansuyu'na ve destek ve teşvikleri için tüm Biyoloji Bölümü elemanlarına çok teşekkür ederim.

Ayrıca, tüm öğrenim hayatım boyunca benden yardım ve desteklerini esirgemeyen ve bu günlere gelmemi sağlayan sevgili aileme, hiçbir şekilde kelimelere dökemeyeceğim kadar sevgi, destek ve sabrı için canım eşim Dr. Sabri Demircan'a ve sadece varlığıyla bile olsa bana sonsuz güç veren biricik kızım Gülce'ye teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Günnur DEMİRCAN

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. OKSİJEN TOKSİSİTESİ	3
2.2. OKSİJEN RADİKALLERİNİN OLUŞUMU	3
2.2.1. OKSİJEN VE OKSİJEN RADİKALLERİ	4
2.2.2. CANLILARDA OKSİJEN RADİKALLERİNİN YAPIMI	5
2.3. SERBEST RADİKALLER	7
2.3.1. SÜPEROKSİT RADİKALI	7
2.3.2. HİDROJEN PEROKSİT	8
2.3.3. HİDROKSİL RADİKALI	9
2.3.4. SİNGLET OKSİJEN	10
2.3.5. NİTRİK OKSİT	11
2.4. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNİN ETKİLERİ	12
2.4.1. SERBEST RADİKALE BAĞLI HASTALIKLAR	14
2.5. ANTİOKSİDAN SAVUNMA	15
2.5.1. ANTİOKSİDAN ENZİMLER	17
2.5.2. NON-ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR	19
2.6. OKSİDATİF STRESİN DEĞERLENDİRİLMESİ İLE İLGİLİ ANALİZLER	22
2.7. KALP HASTALIKLARINDA ROT VE RNT'LERİN KAYNAKLARI	25
2.8. OKSİDATİF STRES VE KALP HASTALIKLARI	28
2.8.1. HİPERTANSİYON	29
2.8.2. ENDOTEL DİSFONKSİYONU	30
2.8.3. ATEROSKLEROZ	31
2.8.4. REPERFÜZYON HASARI	31
2.8.5. KALP YETERSİZLİĞİ	33
2.9. KALP HASTALIKLARINDA GLUKOZ İNSÜLİN POTASYUM TEDAVİSİ	34
3. MATERYAL VE METOD	35
3.1. ARAŞTIRMA GRUPLARININ OLUŞTURULMASI	35
3.2. ÇALIŞMALARDA KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	35
3.3. ÇALIŞMALARDA KULLANILAN ALETLER	35
3.4. HEMOLİZAT HAZIRLANMASI	36
3.5. KATALAZ AKTİVİTE TAYİNİ	36
3.6. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ AKTİVİTE TAYİNİ	37
3.7. GLUTATYON PEROKSİDAZ AKTİVİTE TAYİNİ	38
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	39
4. BULGULAR	40
4.1. ÇALIŞMA GRUPLARININ KLİNİK ÖZELLİKLERİ	40
4.2. GİK VE KONTROL GRUBUNDA ERİTROSİT SOD AKTİVİTE DEĞİŞİMİ	41
4.3. GİK VE KONTROL GRUBUNDA ERİTROSİT KATALAZ AKTİVİTE DEĞİŞİMİ	43
4.4. GİK VE KONTROL GRUBUNDA ERİTROSİT GSHPX AKTİVİTE DEĞİŞİMİ	44
4.5. ERİTROSİT ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİNİN KALP YETERSİZLİĞİNİN AĞIRLIĞIYLA İLİŞKİSİ	45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	46
6. KAYNAKLAR	50

1. GİRİŞ

Kronik iskemik kalp yetersizliği tedavisi üzerine uzun süredir yapılan araştırmalar olmasına rağmen, mortalite ve morbidite oldukça yüksektir. Son yıllarda metabolik bozukluklar ve nöro hormonal aktivasyonun belirlenmesine ve düzeltilmesine yönelik yaklaşımlar ön plana çıkmıştır. Bununla ilgili olarak, miyokart infarktüsü sonrası görülen sol ventriküler yeniden yapılanma (remodeling) ve yetersizliğinin gelişmesinde ve ilerlemesinde oksidatif stresin önemli rol oynadığı yönündeki bulgular giderek artmıştır (Kinugawa ve ark., 2000; Sawyer ve ark., 2002).

Oksidatif stresin derecesi ve oluşturduğu miyokardiyal hasarın ciddiyeti, kalpteki aşırı reaktif oksijen türlerinin (ROT) retimi ve antioksidan savunma arasındaki balansa bağlıdır. Kalpte oluşan artmış ROT retimi miyosit hipertrofisi, apoptozis ve interstisyel fibrozise yol açabilir (Kinugawa ve ark., 2000), bu da deprese olmuş kardiyak fonksiyonu ve kardiyak yetersizliğinin ilerlemesini daha da artırabilir.

Serbest oksijen radikalleri oldukça reaktif ve stabil olmayan metabolitler olup, protein, lipid ve nükleik asitler gibi önemli biyomolekülleri değiştirme kapasitesine sahiptirler. Sağlıklı kişilerde bu metabolitlerin zararlı etkileri antioksidanlarla sınırlanmaktadır, böylece oksidatif hasara bağlı olarak ortaya çıkan doku hasarı en aza indirilmektedir. Serbest oksijen radikalleri, membran lipid ve proteinleri ile reaksiyona girerek miyokardiyal kasılmayı azaltır (Singal ve ark., 1998).

Azalmış veya yetersiz miyokardiyal kasılma ise kardiyomiyopatinin en genel özelliğidir. Kardiyomiyopati terimi, belirti ve bulguların hepsinin ya da çoğunun miyokard işlev bozukluğundan kaynaklandığı tüm kalp hastalıkları için kullanılmaktadır. Miyokart fonksiyonunun bozulmasının ve iskemi reperfüzyon sonrası doku nekrozunun patogeneğinde meydana gelen hasarın hüresel temelini açıklayan farklı mekanizmalar ne sürülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, serbest oksijen radikallerinin geri dönüşümsüz bir Şekilde hücre hasarının ortaya çıkmasında önemli rol alabileceğini göstermiştir (Yücel ve ark., 1998).

ROT'ların aracı olduğu kardiyak hasara karşı ilk basamak savunma mekanizması SOD, CAT ve GSHPx'den oluşan önemli antioksidan enzimleri içermektedir. Kalp yetersizliği gelişen hastalarda SOD, CAT, GSH-Px ve E vitamini gibi miyokardiyal antioksidanlar azalırken serbest oksijen radikallerin ve de oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir (Hill ve Singal, 1996). İlaç tedavisiyle hemodinamik fonksiyonu düzelen hastalarda antioksidan kaynağında düzelme ve oksidatif streste azalma sağlanabilmektedir (Khaper ve Singal, 1997).

DeneySEL ve klinik kalp yetersizliğinde oksidatif stres SOD, GSHPx, CAT aktivitesi ve lipid peroksidlerin plazma seviyeleri ölçülerek dolaylı yoldan değerlendirilmektedir (Kojda ve

Harrison, 1999). SOD ve GSHPx'in kalpte serbest oksijen radikallerinin detoksifikasyonunda büyük bir rol oynadığı öne sürülmektedir (Dieterich ve ark., 2000). Serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu hasara karşı korunmada SOD ilk basamak olmasına rağmen süperoksit anyonunun hidrojen peroksite (H_2O_2) dismutasyonunu katalizlediği için H_2O_2 seviyesini artırarak etki eder. H_2O_2 birikmesinin büyük tehlikesi fizyolojik savunma sistemi olmayan oldukça reaktif hidroksil radikali üretimidir. CAT ve GSHPx, H_2O_2 'i metabolize ettikleri için en önemli antioksidatif enzimler olarak ortaya çıkar (Dieterich ve ark., 2000).

Glukoz alınımı ve glikolitik ATP üretimi özellikle kalpte azalmış koroner akımı olduğunda miyokart hücrelerinin yaşamını devam ettirmesi (viabilitesi) için önemlidir (King ve Opie, 1998). Buradan yola çıkılarak yapılan daha önceki birçok çalışmada GİK tedavisinin miyokart infarktüsünün erken dönemindeki hastalarda ve kalp cerrahisi sırasında faydalı etkileri gösterilmiştir (Lazar ve ark., 1995). Bunların yanında, son yıllarda kalp yetersizliğinde miyokart hücresinin etkin enerji kullanımını için metabolizmasını düzenlemek amacıyla verilen GİK tedavisinin sistolik fonksiyonlarını düzelttiğine dair çalışmalar vardır (Cottin ve ark., 2002; Tune ve ark., 1998; Alan ve ark., 2003; Yazıcı ve ark., 2004).

Kalp yetersizliği olan hastalarda insülinin tek başına, oksijen tüketimini artırmadan kontraktıl fonksiyonları iyileştirdiği ve bu etkinin oksijen yararlanımındaki artışa bağlı olduğu belirtilmiştir (Tune ve ark., 1998). İnsülin, miyokardiyal glukoz metabolizmasını uyarır ve yağ asiti metabolizmasını inhibe eder (Eberli ve ark., 1991). Yapılan çalışmalarda (Cottin ve ark., 2002; Sasso ve ark., 2000), GİK infüzyonu ile iskemik kalp yetmezliği olan hastalarda kontraktıl fonksiyonların düzelmesi, GİK tedavisinin koroner kan akımında artış ve iskemik miyokartta metabolik koruyucu etkisi ile açıklanmıştır.

Hem dilate kardiyomyopatide hem de akut miyokart infarktüsünde oksidatif stresin arttığı bilinmektedir (Hill ve Singal, 1996; Kaul ve ark., 1993). Bununla birlikte, akut miyokart infarktüslü hastalarda GİK tedavisinin metabolik aktiviteyi düzenleyerek oksidatif stresi azaltıp azaltmadığını araştırmaya yönelik çalışma (Díaz-Araya ve ark., 2002) olmakla birlikte dilate kardiyomyopatideki durum araştırılmamıştır.

Çalışmalarımızda, dilate kardiyomyopati nedeniyle dekompanse kalp yetersizliği tablosunda hastanede yatmakta olan hastalara verilen 24 saatlik GİK infüzyonunun tedavi süresince ve tedavi sonrası eritrosit antioksidan enzim (GPX, SOD, CAT) aktiviteleri üzerine etkisi incelenerek bu hastalardaki mevcut oksidatif stresi olumlu yönde etkileyip etkilemediği araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

En bol bulunan bir element olan oksijen, atmosferimizde fotosentetik canlıların faaliyeti sonucu oluşmaya başlamıştır.

Oksijen bütün canlılar için vazgeçilmez bir element olup; hidrojen, karbon, nitrojen ve kükürt ile birlikte organik moleküllerin temel yapısal atomlarını oluşturur. Bunun yanında, aerobik canlıların enerji metabolizmasındaki rolü nedeniyle, oksijen hayati bir öneme sahiptir.

2.1. OKSİJEN TOKSİSİTESİ

Bilinen bütün canlı türleri, organik moleküllerin içindeki şekli ile oksijene gereksinim duysalar da, serbest formdaki moleküler oksijen her canlı türü için aynı anlamı ifade etmez. Aerobik canlılar yaşamları için mutlaka moleküler oksijene gereksinim duyarken, anaerobik canlılar büyüme ve çoğalmaları için oksijene bağımlı değildirler. Anaerobik canlılardaki oksijenin toksik etkisinin nedeni, oksijenden kaynaklanan bazı reaktif türlerin biyolojik molekülleri oksitlemeleri ve bu reaktif türlere karşı anaerobik canlılarda savunma sisteminin bulunmamasıdır. Oksijen sadece anaerobik türlerde değil, yaşamları için mutlaka moleküler oksijene bağımlı olan canlılarda da toksik etkilidir.

Oksijenin canlılardaki **toksik etkileri başlıca iki tür mekanizma** ile gerçekleşir: (Yurdakul, 2003)

- ✓ Aerobik canlılarda gözlenen oksijen toksisitesinin ilk açıklaması, “**moleküler oksijenin bazı enzimleri inhibe ettiği**” şeklindedir. Örneğin, nitrojen fiksasyonunu katalizleyen nitrojenaz enzimleri ve CO₂ fiksasyonunu katalizleyen ribüloz bifosfat karboksilaz oksijen tarafından kompetitif olarak inhibe edilirler. Oksijen, glutamat dekarboksilaz enzimini inhibe ederek beyinde GABA düzeyini düşürmektedir.
- ✓ Oksijenin enzim inhibisyonu etkisi sınırlı ve çok zayıftır. İlk kez 1954 yılında, oksijenin biyolojik sistemlerde görülen toksik etkilerinin, oksijenin bazı reaktif türlerinden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. Bugün, oksijenin canlılardaki toksik etkisinin “**oksijen radikalleri**” olarak adlandırılan ve oksijenin vücuttaki metabolizması sırasında oluşan reaktif türlerden kaynaklandığı bilinmektedir.

2.2. OKSİJEN RADİKALLERİNİN OLUŞUMU

Atomlar, proton ve nötronlardan oluşan pozitif yüklü bir çekirdek ve çekirdeğin etrafında bulunan negatif yüklü elektronlardan oluşur. Elektronlar hem partikül, hem de dalga özelliğine sahip olup, çekirdek etrafında ışık hızı ile hareket ederler. Bu nedenle

elektronların çekirdek etrafındaki yeri tam olarak tarif edilemez, yalnızca bulunma olasılığının en yüksek olduğu yerden bahsedilebilir. Belirli elektronların bulunma olasılığının en yüksek olduğu yer “orbital” olarak adlandırılır.

Radikaller, dış orbitallerinde paylaşılmamış elektron içeren kimyasal türlerdir. Her türden kimyasal ve biyokimyasal tepkime daima atomların dış orbitallerindeki elektronlar seviyesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması söz konusu kimyasal türün reaktivitesini olağanüstü arttırdığı için, radikaller reaktivitesi çok yüksek olan kimyasal türlerdir. Organizmada oluşan serbest radikaller, radikal olmayan bileşiklerle etkileşerek yeni radikaller oluşturur. Biyolojik sistemlerdeki serbest radikaller Tablo 1’de gösterilmiştir.

İçinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle devamlı bir radikal yapımı vardır. hücresele koşullarda da ciddi bir miktar ve çeşitlilikte radikal üretilmektedir (Tablo 1).

Radikaller başlıca 3 temel mekanizma ile oluşur: (Yurdakul, 2003)

- ✓ **Kovalent bağların homolitik kırılması ile.** Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma denir ve her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalır.
- ✓ **Normal bir molekülün elektron kaybetmesi ile.** Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşur. Örneğin askorbik asit, glutatyon ve tokoferoller gibi hücresele antioksidanlar, radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formu oluşur.
- ✓ **Normal bir moleküle elektron transferi ile.** Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir. Örneğin moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan superoksidin oluşumuna neden olur. Superoksit radikalinin yapımındaki artış da, oksijenin diğer radikal türlerinin ve diğer atom merkezli radikallerin oluşumu için tetik fonksiyonu görür.

2.2.1. OKSİJEN VE OKSİJEN RADİKALLERİ

Moleküler oksijen dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron içerir. Bu elektronlar, spinleri aynı yönde ve farklı orbitallerde iken minimum enerji seviyesindedirler. Radikal tanımına göre oksijen “diradikal” yapıya sahip bir moleküldür. Oysa oksijenin reaktivitesi beklenenin aksine çok düşüktür. Diradikal bir yapıya sahip olan oksijenin herhangi bir molekül ile tepkimeye girebilmesi için, tepkimeye gireceği molekülün de benzer yapıya (farklı

orbitalerde spinlerin aynı yönde elektron içermesi) sahip olması gerekir. Oysa başta organik moleküller olmak üzere atom ve moleküller orbitallerinde elektronları antiparalel ve eşleşmiş olarak içerirler. Veya paylaşılmamış elektronlar kovalent bağlara katılmışlardır. Bunun sonucu olarak oksijenin diğer moleküllere olan reaktivitesi son derece kısıtlanmıştır. Bu kısıtlama “spin kısıtlaması” olarak adlandırılır. Canlıların oksijeni kullanabilmesi için, oksijene elektron transferi yaparak spin kısıtlamasını aşmaları gerekir. Bu işlem için canlılar bazı metal iyonlarından (Fe, Cu, Mn, Zn) yararlanırlar (Akkuş, 1995; İnan, 1998; Kılınç, 1985).

Tablo 1. Biyolojik sistemlerdeki serbest radikaller (Aral ve Türkmen, 2002)

Oksijen Türevleri (reaktif oksijen türleri: ROT)

Radikaller

- Süperoksit ($O_2 \cdot$)
- Hidroksil ($OH \cdot$)
- Peroksil ($LO_2 \cdot$)
- Alokoksil ($LO \cdot$)
- Hidroksiperoksil ($HO_2 \cdot$)

Radikal olmayanlar

- Hidrojen peroksit (H_2O_2)
- Hipokloröz asit ($HOCl$)
- Ozon (O_3)
- Singlet oksijen (ΔgO_2)
- Lipid hidroperoksitleri ($LOOH$)

Azot oksitler (reaktif azot türleri: RAT)

Radikaller

- Nitrik oksit ($NO \cdot$)
- Azot dioksit ($NO_2 \cdot$)

Radikal olmayanlar

- Nitröz asit (HNO_2)
- Peroksinitröz asit ($ONOOH$)
- Peroksinitrit ($ONOO^-$)
- Alkil peroksinitritler ($RONOO$)

Geçiş metalleri (Cu, Fe, Mn)

Kükürt merkezli radikaller (tiyil radikalleri, $RS \cdot$)

Karbon merkezli radikaller ($\cdot CCl_3$)

Azot ve fosfor merkezli radikaller

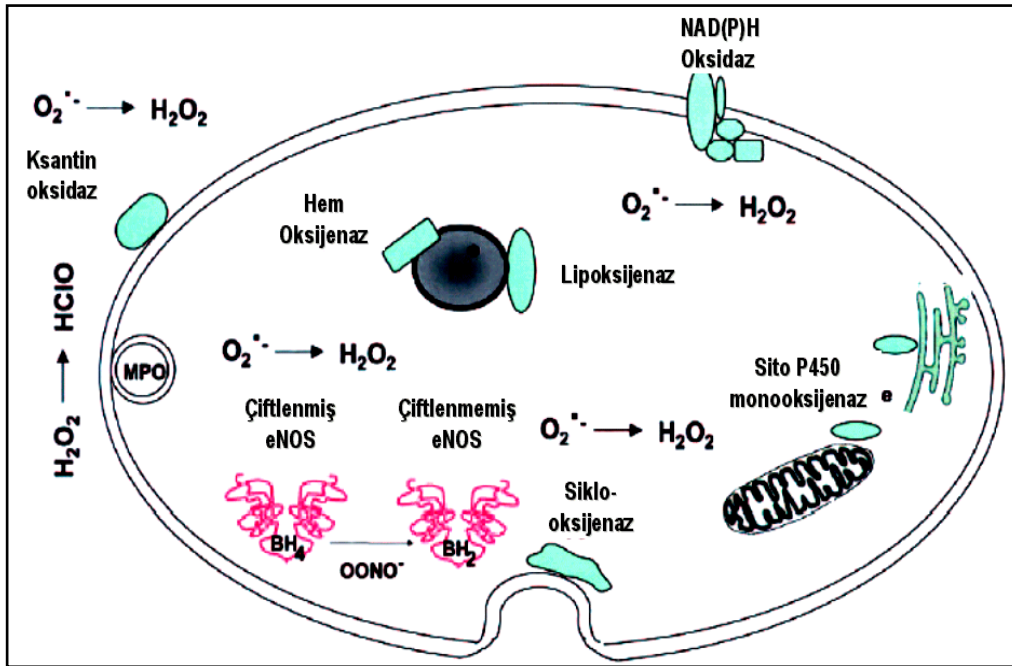
2.2.2. CANLILARDA OKSİJEN RADİKALLERİNİN YAPIMI

Oksijen bulunan ortamda çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenlerle oksijen radikalleri yapılabilir. Vücudumuzda oluşabilen radikallerin sayısı “yüzlerce farklı tür” şeklinde ifade edilebilirse de, bu radikaller arasında **süperoksit**, **H_2O_2** , **nitrik oksit** ve **hidroksil radikal**inin özel yerleri vardır. Hatta bu radikaller içinde süperoksit ve nitrik oksit temel radikaller sayılabilir. Çünkü süperoksit ve nitrik oksit enzimatik mekanizmalarla, devamlı olarak ve önemli derişimde üretilen radikallerdir. Ayrıca bu iki radikal, biyolojik sistemlerde

tanıdığımız diğer bütün önemli radikaller ile radikal yapıda olmayan reaktif türlerin oluşumunu başlatabilecek özelliktedirler.

Normal biyokimyasal tepkimeler sırasında oluşan oksijen radikalleri ile çeşitli biyolojik fonksiyonları yerine getirmek üzere üretilen nitrik oksidin derişimleri genellikle çok düşüktür. Düşük derişimdeki reaktif türler, hücrelerin antioksidan sistemleri tarafından inaktive edildiklerinden önemli toksik etkilere neden olmazlar. Ancak bu radikallerin yapımları çeşitli patolojik durumlarda artabilir, çoğunlukla da her iki radikal bileşik grubunun oluşumu birbiri ile paralel seyredir. Örneğin iltihabi durumlarda aktive olan lökositler aynı anda hem oksijen radikallerini hem de nitrik oksidi yüksek derişimlerde sentezlerler. Nitrik oksit, oksijen radikalleri ile tepkimeye girerek veya oksijenli ortamlarda oksitlenerek, kendisinden çok daha reaktif türlerin oluşumuna neden olur. Oksijen radikallerinin fazla yapımının neden olduğu etkilerin toplamı “**oksidan stres**“ diye adlandırılır. Oksidan stresi, nitrik oksidin reaktif türlerinden kaynaklanan toksik etkilerden ayırmak mümkün olmadığından, “**nitrozatif stres**”den ayırmak imkansızdır (Yurdakul, 2003).

Bu bakımdan, oksidatif hasar, superoksitten kaynaklanan radikaller ile nitrik oksidin reaktif türlerinin neden olduğu hasarların bir toplamıdır (Tablo 2, Şekil 1).



Şekil 1: ROT'nin potansiyel kaynakları (Griendling ve FitzGerald, 2003). Mitochondriyal ETZ'ndekiler, ksantin oksidaz, siklooksijenaz, lipooksijenaz, mieloperoksidaz, sitokrom P450 monooksijenaz, çiftlenmemiş NOS, hem oksijenaz, peroksidaz ve NAD(P)H oksidazdan oluşan birçok enzim ROT'lerini oluşturur. Enzimlerin hücredeki lokalizasyonuna göre bu ROT intrasellüler, ekstrasellüler veya spesifik intrasellüler kompartmanlarda meydana gelir.

Tablo 2. Reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif azot türlerinin (RAT) kaynakları (Aral ve Türkmen, 2002)

Endojen (iç) kaynaklar

- ✓ Enzimler (ksantin oksidaz, sitokrom P450, NADPH oksidaz, hidroksilazlar)
- ✓ Fagositoz
- ✓ Mitokondriyal solunum
- ✓ Hemoglobin

Ekzojen (dış) kaynaklar

- ✓ Radyasyon
- ✓ Toksinler (sigara dumanı)
- ✓ Ksenobiyotikler
- ✓ İlaçlar (glutatyon tükeyen ilaçlar, antikanser ilaçlar)

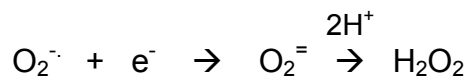
2.3. SERBEST RADİKALLER

2.3.1. SÜPEROKSİT RADİKALI

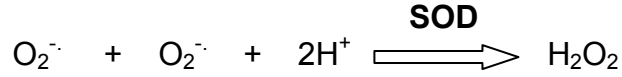
Canlılarda olduğu ilk gösterilen radikal olan süperoksit, başlıca şu mekanizmalarla üretilmektedir: (Yurdakul, 2003)

- ✓ İndirgeyici özellikteki biyomoleküler oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksit radikali oluşur. Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler, indirgenmiş nükleotidler gibi yüzlerce biyolojik molekül aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit yapımına neden olurlar.
- ✓ Başta çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere, yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında süperoksit radikali bir ürün olarak oluşabilir.
- ✓ Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin % 1-5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni NADH-dehidrogenaz ve koenzim-Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olmasıdır.
- ✓ Aktive edilen fagositik lökositler bol miktarda süperoksit üreterek fagozom içine ve buldukları ortama verirler. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal yapımı, daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatır. Yani radikal yapımı bazı hücrel fonksiyonlar için gerekli de olabilir.

Hücrel koşullarda üretilen süperoksit, oksitleyici veya indirgeyici olarak davranabilir. Aldığı elektronu metal iyonuna, sitokrom C'ye veya bir radikale verirse tekrar oksijene oksitlenir. Oksijenden daha oksitleyici olan süperoksit bir elektron daha alırsa peroksi anyonuna indirgenir.



Bu tepkime biyolojik moleküllerin oksidasyonuna neden olduğundan tercih edilmez. Aerobik canlılarda süperoksitlerin H_2O_2 'e çevrilmesi katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenir.



SOD tarafından katalizlenen bu tepkime “*dismutasyon tepkimesi*” diye adlandırılır. Süperoksit, özellikle hafif asidik koşullarda SOD olmadan kendiliğinden dismutasyonla da H_2O_2 'e çevrilebilir.

SOD enziminin yüksek katalitik etkisi nedeniyle hücrelerde süperoksit birikimine izin verilmez. Ancak çeşitli patolojik durumlarda süperoksit yapımının artmasıyla süperoksitde özgü tepkimeler görülmeye başlar:

- ✓ Süperoksit metal iyonlarını indirgeyerek bağlı olduğu proteinlerden salınımına neden olur. kofaktörlerin oksidasyon düzeylerini bozar ve metal iyonlarının katıldığı hidroksil radikali yapım tepkimelerini hızlandırır.
- ✓ Diğer radikallere göre daha az reaktif olsa da indirgenmiş nükleotidlerin, bazı amino asitleri ve antioksidan bileşikleri oksitler.
- ✓ Süperoksit, hücre zarlarının hidrofobik ortamlarında daha uzun ömürlü ve çözünürlüğü daha fazladır. Zar fosfolipidleri nedeniyle hücre zarı yüzeyleri daha asidiktir ve süperoksit burada daha kolayca bir proton alarak hidroperoksit radikalini (HO_2^{\cdot}) oluşturur. Bu radikal de çok reaktif olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonunu başlatabilir ve antioksidanları oksitleyebilir (Akkuş, 1995; Halliwell, 1987).

2.3.2. HİDROJEN PEROKSİT

Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitlerin enzimatik ve non-enzimatik dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşur.

Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz, reaktif bir tür değildir. Hidrojen peroksidin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni, demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalinin öncülü olarak davranmasıdır.

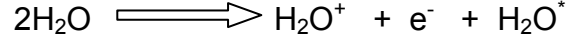
Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir.

Oksitleyici özelliği nedeniyle, biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'nin derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri yerine getirir (Dieterich ve ark., 2000).

2.3.3. HİDROKSİL RADİKALİ

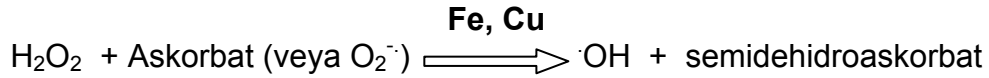
Biyolojik ve kimyasal sistemlerde üretilen hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) canlılarda **iki mekanizma** ile oluşabilir.

1) İyonlaştırıcı radyasyonun etkisi ile sulu ortamda su moleküllerinin iyonlaşması gerçekleşir.



Uyarılmış su molekülü (H_2O^*) homolitik yıkım ile; H_2O^+ ise bir su molekülü ile tepkimeye girerek hidroksil radikali oluştururlar. Bu tepkimeler çok kısa sürede gerçekleşir ve üretilen $\cdot\text{OH}$, radyasyonun canlılardaki toksik etkisinden sorumlu başlıca kimyasal türdür.

2) Hidrojen peroksitin eksik indirgenmesi ile $\cdot\text{OH}$ yapımı, vücutta bu radikalin en önemli kaynağıdır. H_2O_2 'nin iki elektron ile indirgenmesi ile su oluşurken, tek elektron ile indirgenmesi $\cdot\text{OH}$ yapımına neden olur. Bu tür indirgenme Fe, Cu gibi metal iyonları tarafından katalizlenir. Askorbik asit, süperoksit gibi indirgeyici bileşiklerin de bulunduğu ortamda oksitlenen metal iyonu tekrar indirgendiğinden H_2O_2 'den $\cdot\text{OH}$ yapımı sürekli bir duruma gelir (Adalı, 1998; Çakır, 1997).



Haber-Weiss tepkimesi ya da **fenton tepkimesi** olarak adlandırılan bu tepkime ile $\cdot\text{OH}$ oluşacağı vücutta üretilen H_2O_2 derişimi ve serbest metal iyonunun varlığına bağlıdır. Süperoksit hem H_2O_2 'nin öncülü hem de metalleri indirgeyici bir tür olduğundan; süperoksit proteinlere bağlı metallerin indirgenip serbest kalmasına da neden olabildiğinden, biyolojik koşullarda süperoksit oluşumunun arttığı ortamda $\cdot\text{OH}$ üretimi kaçınılmazdır. Fenton tepkimesini katalizleyen en aktif metal iyonları demir ve bakırdır (Haber ve Weiss, 1934).

Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan $\cdot\text{OH}$, su dahil ortamda rastladığı her biyomolekülle tepkimeye girer. Hidroksil radikalinin tepkimeleri başlıca:

- ✓ **Elektron transfer tepkimeleri**
- ✓ **Hidrojen çıkarma tepkimeleri**
- ✓ **Katılma tepkimeleri**

Bütün bu tepkimeler, $\cdot\text{OH}$ 'ın paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır.

Katılma tepkimeleri, özellikle elektronca zengin moleküllerle (pürin ve primidin bazları, aromatik amino asitler gibi) gerçekleşir.

Hidroksil radikalinin organik moleküllerden hidrojen atomu alarak suya indirgendiği tepkime, hidrojen çıkarma tepkimesi olarak bilinir (Ames ve ark., 1993; Fıçkın ve ark., 1995).

Hidroksil radikali ile oluşan en iyi tanımlanmış biyolojik hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur.

Her tür biyolojik molekül ·OH'ın bir hedefi ise de özellikle elektronca zengin bileşikler tercihli hedeflerdir. Nükleik asitler, proteinler ve lipidlerde başlatılan radikalik tepkimelerde binlerce farklı ara ürünler oluşabilir (Oğuz, 1990).

- ✓ DNA ile tepkimesi sonucu baz modifikasyonları, baz delesyonları, zincir kırılmaları gerçekleşebilir. İleri derecedeki DNA hasarları tamir edilemediğinden hücre ölümüne neden olur.
- ✓ Proteinler üzerinde oluşan oksidasyonlar yapı değişimine neden olacağından proteinleri proteolitik yıkıma götürür.
- ✓ Hücre zarı su içermediğinden ·OH'ın başlıca hedefi yağ asididir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp yine hücre ölümüne neden olabilir.

Özellikle ·OH yapımını katalizlemelerindeki etkileri nedeniyle, canlılarda metal iyonların radikal hasarlarından birinci derecede sorumludurlar ve bu etkiye sahip olamadıkları formda (proteine bağlı) tutulmalıdır.

2.3.4. SİNGLET OKSİJEN

Oksijenin enerjetik olarak uyarılan bu formunda reaktivite çok yüksektir. Aldığı enerjiyi çevreye dalga enerjisi şeklinde verip yeniden oksijene dönebilir (Adalı 1998). Başlıca şu mekanizmalarla vücutta oluşabilir:

- ✓ Pigmentlerin (örneğin flavin içeren nükleotidler, retinal, bilirubin) oksijenli ortamda ışığı absorblamasıyla
- ✓ Hidroperoksitlerin metaller varlığındaki yıkım tepkimelerinde
- ✓ Kendiliğinden dismutasyon tepkimeleri sırasında
- ✓ Prostaglandin endoperoksit sentaz, sitokrom p450 tepkimeleri, myelo/kloro/laktoperoksidaz enzimlerinin etkileri sırasında (Kılınç, 1995)

Oksijenin bu enerjetik reaksiyonu sonucunda **iki tip singlet oksijen** üretilir.

Sigma singlet oksijen: Enerjisi daha fazladır ve çok kısa ömürlüdür.

Delta singlet oksijen: Daha uzun ömürlüdür ve gözlenen kimyasal reaksiyonlardan esas sorumlu form olduğu kabul edilmektedir (Akkuş, 1995).

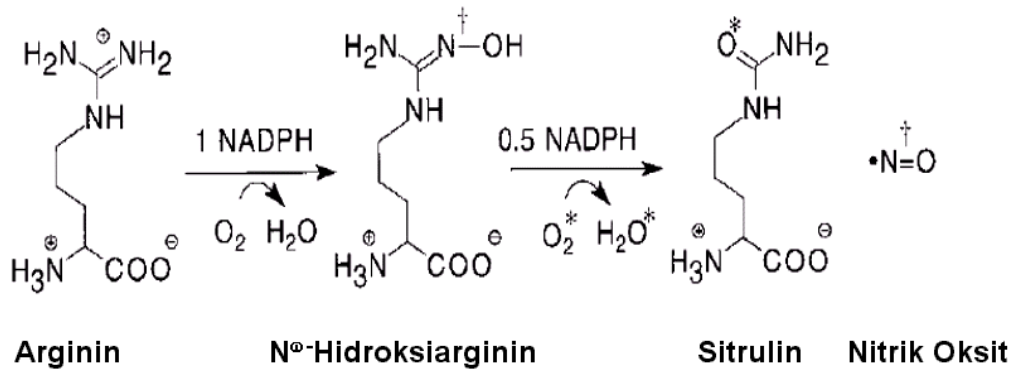
Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enerjiyi transfer eder, ya da kovalent tepkimelere girer. Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. Doymamış yağ asitleri ile de doğrudan tepkimeye girerek

peroksi radikalin, oluşturur ve ·OH kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir (Akkuş, 1995; İnan, 1998).

2.3.5. NİTRİK OKSİT

Nitrik oksit, çok önemli biyolojik fonksiyonları yerine getirmek üzere üretilen nitrojen merkezli bir radikaldır. Paylaşılmamış elektron aslında nitrojen atomuna ait ise de, bu elektronun hem nitrojen hem de oksijen atomu üzerinde delokalize olması nedeniyle tam radikal özelliği taşımaz. Bunun sonucu, bilinen diğer radikallere göre reaktivitesi baskılandığından oldukça uzun ömürlüdür.

Oksijen radikalleri çok sayıdaki enzimatik ve enzimatik olmayan yollar ile fiziksel/kimyasal mekanizmalarla oluşturulurlar. Oysa vücudumuzda NO sentezini sağlayan mekanizmalar son derece kısıtlıdır. Vücuda giren nitro bileşiklerinin metabolize edilmesi sırasında oluşan NO bir tarafa bırakılacak olursa, endojen NO oluşturan tek kaynak **nitrik oksit sentaz (NOS)** enzimidir. Bu enzimin **nöronal, endotelial ve indüklenebilir** olmak üzere 3 formu vardır (Stuehr ve ark., 2001).



Radikal olarak reaktivitesi düşük olan NO, metal içeren merkezler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girer. Özellikle lipid radikaller ile tepkimeye girmesi NO'e *antioksidan bir etki* de kazandırır.

Fizyolojik değişimde üretilen NO esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata (NO₃⁻) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, nitrik oksidi ortamdaki temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. Aerobik ortamda NO stabil değildir. Derişiminin artması ile oksidasyonu hızlanır. Bu nedenle ortamdaki derişimi ile kendi ömrü arasında ters bir orantı vardır.

Radikalik tepkimeler şu durumlarda sona erer.

- ✓ Oluşan radikallerin antioksidanlar ile indirgenmesi
- ✓ Radikallerin birbirleri ile tepkimeleri
- ✓ Ortamda tepkimeye girebilecek bileşik kalmaması

Buna göre hücrenel koşullarda, oluşan radikalin çok erken safhalarda indirgenmesi biyomoleküllerin korunması bakımından hayati öneme sahiptir.

Serbest radikaller çeşitli hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynarlar. Diabet ve diabet komplikasyonlarının gelişimi, kanser, yaşlılık, Behçet hastalığı gibi çok sayıda hastalıkta serbest radikal üretiminin arttığı ve antioksidan savunmaların yetersiz olduğu gösterilmiştir.

Ancak bu hastalıkların çoğunda, serbest radikallerin hastalığın bir sebebi mi, yoksa bir sonucu olarak mı meydana geldikleri bilinmemektedir.

NE KADAR RADİKAL YAPIMI?

Yaşam için mutlaka gerekli olan oksijen, canlıların yaşamının sona erdirilmesinde de etkili olan faktörlerin başında gelir. Canlıların yaşlanması, radikallerin neden olduğu kalıcı hasarların bir birikimi olarak değerlendirilmektedir. (Yurdakul, 2003)

Vücutta üretilen radikaller her zaman tehlikeli kimyasal türler olarak değerlendirilmemelidir. Oksijenin biyokimyasal tepkimelerde kullanılması için reaktif formlarına çevrilmesi zorunludur. *Örneğin:*

- ✓ Steroid yapıdaki çok sayıdaki bileşiklerin, eikozanoidler gibi biyolojik aktif moleküllerin sentezi
- ✓ Ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu
- ✓ Çok sayıdaki oksidaz ve hidroksilaz enzimlerinin etkileri için
- ✓ Sitotoksik etkilere sahip hücrelerin fonksiyonları için radikal yapımı olmazsa olmaz bir koşuldur.

Biyolojik ihtiyacın üzerinde üretilen radikaller gözlenen toksik etkilerden sorumludurlar. Çevresel faktörler (Örneğin: iyonlaştırıcı radyasyon), vücuda alınan çeşitli kimyasal bileşikler, çeşitli enfeksiyonlar, doku travmaları gibi patolojik durumlar vücutta radikal yapımında artışa neden olurlar. Düşük derişimdeki radikal yapımının etkileri çok uzun bir süreç sonunda örneğin yaşlanma sonunda görülürken; yüksek derişimde ve yaygın radikal yapımının etkileri kısa sürede ve ciddi bir patolojik durum olarak karşımıza çıkabilir. (Aral ve Türkmen, 2002)

2.4. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNİN ETKİLERİ

Serbest radikaller yaşam için gereklidir. Elektron transferi enerji üretimi ve pek çok diğer metabolik işlevde temel oluşturur. Ama eğer zincir reaksiyonu kontrolsüz bir davranış gösterirse hücrede hasarlara neden olur. Antioksidantlar ise serbest radikaller için kolay bir elektron hedefi oluşturur. Bağlanan serbest iki serbest radikali birleştirerek nötralize

edebilme özelliğine sahip bir enzime (**glutasyon peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz...**) taşınana kadar radikalle stabil bir yapı oluşturur.

Eğer serbest radikaller nötralize edilmezlerse vücutta ciddi hasarlara neden olabilirler:

- ✓ Hücre membranı proteinlerini yıkarak hücreleri öldürmek,
- ✓ Membran lipit ve proteinlerini yok ederek hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonunu engellemek
- ✓ Çekirdek membranını yararak nukleustaki genetik materyale etki edip DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirmek
- ✓ Bağışıklık sistemindeki hücreleri yok ederek bağışıklık sistemini zorlamak.

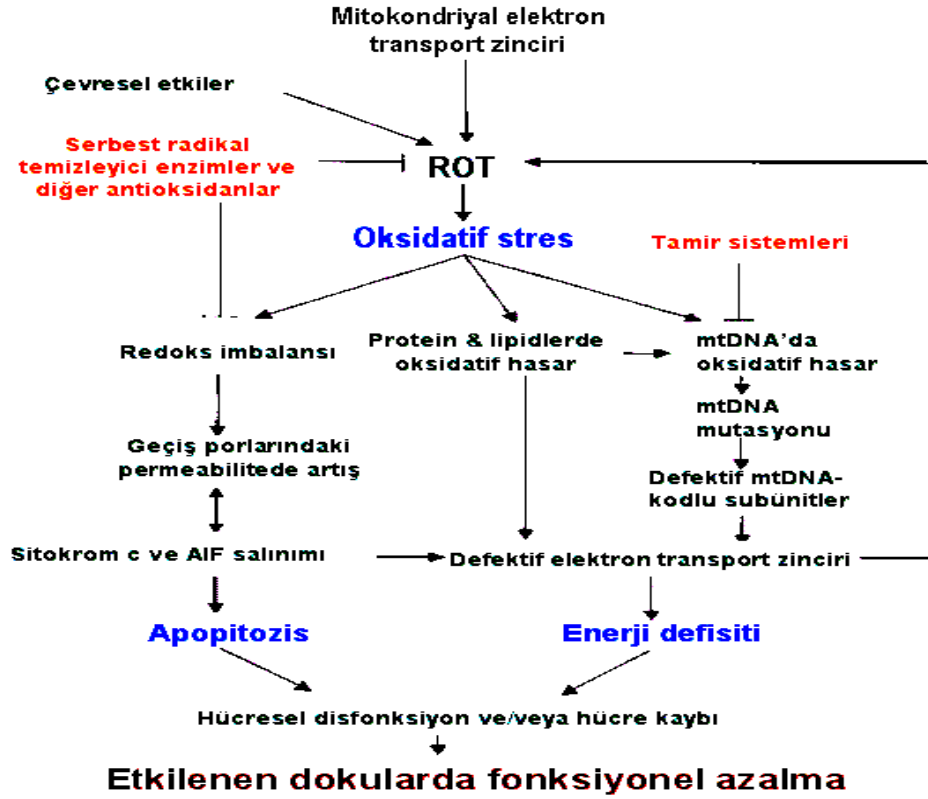
Bu etkiler **oksidatif stres** olarak bilinen DNA mutasyonları, hücre ölümleri ve hastalıkları gibi hasarlara neden olur. (Şekil 2)

Peki serbest radikaller bu hasarları nasıl verirler? Bu sorunun cevabı çok çeşitli mekanizmalara dayandırılabilmeyle beraber en temel etkileri, lipit peroksidasyonu, proteinler arasında disülfid bağı oluşumu ve DNA hasarıdır.

- a) **Membran Lipitlerinin Peroksidasyonu:** Bu, serbest radikaller hücrenin membranına saldırdıklarında gerçekleşir. Serbest radikaller, hücre membranının stabilizasyonunu ortadan kaldırarak, hızlı hücre ve doku bozulmalarına neden olurlar (Gutteridge, 1995; Halliwell ve Chiroco, 1993).
- b) **Disülfid Bağı Oluşumu:** Glutasyon (GSH) gibi tiyollerin (R-SH) oksidasyonu tiyol ve oksijen radikallerinin oluşumuna neden olur (Fridovich, 2001). Her ne kadar hidroksil radikallerinden daha zayıf olsalar da tiyol radikalleri bazı biyolojik sorunlara neden olurlar. Bunlar sülfür merkezli radikallerdir (RSH) ve proteinlerdeki homolitik fisyon (sülfürlerin karşılıklı bağlanması) reaksiyonları disülfid bağını oluşturur. Bu da proteinlerin konfigürasyonlarını bozarak vücuttaki metabolik aktivitelerini engeller.
- c) **DNA Hasarı:** Bir canlının elektromanyetik, ultraviyole ve X-ışınlarına maruz kaldığı sırada DNA, hidroksil radikallerinin de saldırısına uğrayabilir. Serbest radikal etkisiyle DNA'nın yapısının değişmesi mutasyonlara ve hatta canlının eşey hücrelerindeki mutasyona bağlı olarak döllerin ölmesine neden olur (Halliwell ve Arumoa, 1991).

Metabolizmadan ve çevresel etkenlerden kaynaklanan serbest radikaller biyolojik sistemlerde sürekli etkileşim halindedirler. "**Oksidatif stres**" terimi, oksidanlara maruz kalınmasıyla, denge bozukluğunun artmasının normal redoks halini değiştirdiğine dikkat çekmek için kullanılmaktadır. Moleküler, hücresel, doku düzeyinde oksidatif hasarı en aza indirgeyebilmek için oksidanlar ve antioksidanlar arasında bir denge sağlanmalıdır. Oksidatif stresin antioksidan savunmayı zayıflatmasını önlemede redoks antioksidanları non-

enzimatik ve enzimatik reaksiyonlardan oluşan bir ağ örgüsü içerisinde birbirleriyle etkilemiş gösterirler.



Şekil 2: Organizmada oluşan ROS'ların hücre düzeyindeki etkileri (Wei ve Lee, 2002)

2.4.1. SERBEST RADİKALE BAĞLI HASTALIKLAR

Serbest radikaller vücudun hastalıklara karşı direncini vücudu saran organizmaları yok ederek artırır. Buna karşın fazla üretildiğinde vücuttaki bazı yerlerde hasara neden olarak hastalıklara yol açar. Serbest radikal reaksiyonlarının neden olduğu hastalıklarda giderek bir artış olmaktadır. Bu serbest radikal hastalıkları üç grupta toplanabilir: (Gümrükçüoğlu, 2001)

1. Genetiğe bağlı (Fanconi anemisi, bloom sendromu)
2. Çevresel bileşenler (iş hastalıkları, zehirlenmeler, virus ve bakteriyel enfeksiyonlar)
3. Hem genetik hem de çevresel (bronşial astım, diabetes mellitus, kanser, kardiovasküler hastalıklar ve diğerleri)

İnflamasyon (İltihap-Yangı): Yangı sırasında serbest radikallerden çıkan oksijen, lökositler salınır. Bu işlem çoğunlukla koruyucu olmasına rağmen kontrolsüz olursa zarar verir (Fantone ve Word, 1982).

Mikropların Öldürülmesi: Vücutta sayısı artan mikroplar, lökositlerin fagolizozomları tarafından öldürülüp sindirilirler. Bu sırada reaktif süperoksitler ve hidroksil radikalleri

oksidatif reaksiyonlar sonucu oluşur. Bu işlemler milisaniye'lik kısa sürelerde olmasına rağmen kontrolsüz gerçekleştiklerinde toksik ve zarar vericidirler (Gümrükçüoğlu, 2001).

Oksijen ve Diğer Gazların Toksisiteleri: Yüksek oksijen ve diğer gazlar maruz kalındığında canlılar için zararlı hatta bazı durumlarda öldürücüdür. Oksijenin hasara neden olan etkileri oksijen oluşturan serbest radikallerin ya da diğer serbest radikal ara ürünlerinin hücre membranı gibi hücrenel komponentlerini okside etmesindedir (Gümrükçüoğlu, 2001).

Yaşlanma: Denham Harman tarafından ortaya atılan serbest radikal teorisine göre normal yaşlanma, aerobik metabolizma sırasında oluşan serbest radikallerin dokularda birikmesi sonucu oluşan hasarlar nedeniyle olmaktadır. O halde dengeli bir beslenme, serbest radikal reaksiyonlarını minimumda tutmalıdır (Johnson ve ark., 1986; Wei ve Lee, 2002).

Radyasyon: Canlı hücrelerin temel bileşeni olan su, iyonize radyasyona maruz bırakıldığında (x-ışını ya da gamma ışını gibi) hidroksil radikali oluşacaktır. Bu hidroksil radikalleri DNA ve hücre membranının hasarından sorumludurlar (Clark ve ark., 1985).

Ateroskleroz: Düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) peroksidasyonunun ateroskleroz hastalığına karıştığı bilinmektedir. Bu kan damarlarındaki daralma, arteriyel kan basıncının düşmesine ve hastalığın diğer belirtilerinin oluşmasına neden olur (Heinecke, 2003).

DNA'ya Etkisi: Hidrojen peroksit oksidantlar arasında en belalısı kabul edilen bir maddedir ve hücrede pek çok bölgeyi hedef alarak bu bölgelere saldırarak hidroksil radikali oluşturur. DNA hidroksil radikallerinin oluşturduğu hasarlara karşı oldukça hassastır. Hem DNA zincirinin kırılmasına hem de bazların hidroksilasyonuna neden olabilir. DNA zincirinin kopması bir DNA bağlayıcı protein olan poli(ADP)polimerazı aktif hale geçirir. Bu protein nikotin amid dinükleotidi (NAD) substrat olarak nuklear proteinlere bağlı ADP-riboz polimerleri oluşturur. Bu koşullarda NAD turnoverı azalır, bu da ATP sentezini mitokondriyal sentezi inaktive ederek etkiler (Wei ve Lee, 2002)

2.5. ANTIOKSİDAN SAVUNMA

Oksidatif stres halinde ROT veya RAT (reaktif azot türleri) oluşumu ile antioksidan kapasite arasında dengesizlik vardır. Yani oksidatif stres; prooksidatif ve antioksidatif süreçlerden oluşan dengenin prooksidatif yöne kayması durumudur (Aral ve Türkmen, 2002). Organizmayı oksidatif etkilere karşı dengede tutabilmek için gerekli olan endojen ve ekzojen antioksidanların toplam etkisi **antioksidan kapasiteyi** oluşturur (Tablo 3). Antioksidanlar hedef moleküllerdeki oksidatif hasarı engelleyen veya geciktiren maddelerdir. Antioksidanlar etkilerini başlıca iki şekilde gösterirler: (Yurdakul, 2003)

1. Serbest radikal oluşumunun önlenmesi:

- ✓ Başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırıcı etki,
- ✓ Oksijeni uzaklaştırıcı veya konsantrasyonunu azaltıcı etki,
- ✓ Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etki.

2. Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi:

- ✓ Toplayıcı etki: ROT'lerini etkileyerek onları tutma veya çok daha az reaktif başka bir moleküle çevirme. (ör: enzimler.)
- ✓ Bastırıcı etki: ROT'leri ile etkileşip onlara bir proton ekleyerek aktivite kaybına neden olma. (ör: flavinoidler, vitaminler.)
- ✓ Onarıcı etki
- ✓ Zincir kırıcı etki: ROT'lerini ve zincirleme reaksiyonları başlatacak diğer maddeleri kendilerine bağlayıp zincirlerini kırarak fonksiyonlarını önleyici etki. (Ör: Hemoglobin, seruloplazmin, mineraller)

Tablo 3: Antioksidan Savunma Molekülleri

Enzimler

- Süperoksit dismutaz (SOD)
- Katalaz (CAT)
- Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)

Metal bağlayan proteinler

- Demir ve bakır metabolizması
- Metalotiyoninler

Küçük Moleküller

Endojen antioksidanlar

- Glutasyon
- Lipoik asit
- Koenzim Q
- Bilirubin
- Ürik asit
- Melatonin

Ekzojen antioksidanlar

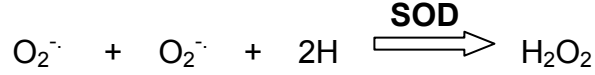
- Askorbik asit (C vit)
 - α -tokoferol (E vit)
 - Karotenoidler
 - Flavanoidler
 - Fenoller
 - Bitkisel ilaçlar
-

Antioksidanlar; hücre lokalizasyonuna göre **intraseküller** veya **ekstraseküller**, fonksiyonuna göre; **radikal oluşumunu önleyen** (metal şelatörler, SOD, CAT, GSHPx) veya **radikallerin dokudaki etkilerini önleyen** (E vit, ubikinon, retinoik asit, β -karoten, GSH, urat) ve de **enzimatik** veya **non-enzimatik** olarak sınıflandırılırlar.

2.5.1. ANTIOKSİDAN ENZİMLER

Süperoksit Dismutaz (SOD)

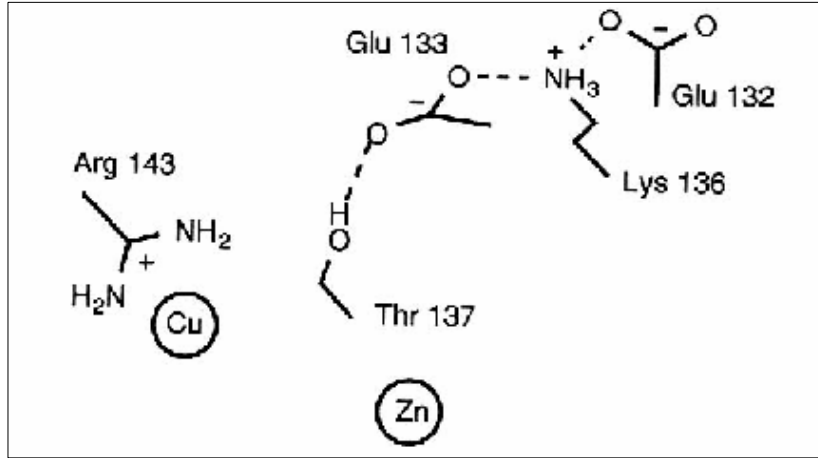
SOD enzimleri; süperoksit radikallerini daha az reaktif olan hidrojen peroksit formuna çeviren metalloenzim ailesidir (Halliwell ve Arumoa, 1991).



Bu reaksiyon “oksidatif strese karşı ilk savunma” olarak da adlandırılır. Çünkü, süperoksit zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısıdır. Bu sistem sayesinde hücrel kompartmanlardaki $\text{O}_2^{\cdot -}$ düzeyleri kontrol altında tutulur.

SOD'ın farklı izoenzimleri mevcuttur:

- ✓ **Sitozolik SOD** ve **vasküler endotele bağlı bulunan ekstrasellüler SOD**'in kofaktörleri çinko ve bakırdır. (**CuZn-SOD**) Bu enzimlerin aktivitelerinden bakır, stabilitelelerinden çinko sorumludur.
- ✓ **Mitokondrial SOD**'in kofaktörü ise mangandır. (**Mn-SOD**)
- ✓ Ayrıca, bazı bakterilerde **Fe-SOD** da saptanmıştır (Halliwell ve Arumoa, 1991).



Organizmalarda SOD, fazla miktarda H_2O_2 oluşumuna neden olduğundan bu toksik maddeyi temizleyici diğer antioksidan enzimlerle kombine çalışır. İnsanlarda bu özellikle çalışan enzimler **CAT** ve **GSH-Px**'dir (Gamble ve ark., 1997).

Katalaz (CAT)

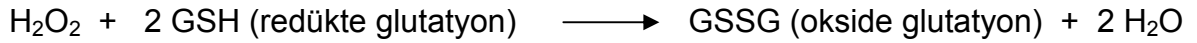
CAT tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan ve 4 adet hem grubu içeren bir **hemoproteindir**. CAT, hidrojen peroksiti yıkar ve diğer tüm makromolekülleri peroksitlerin yıkıcı etkisinden korur. Görevi; hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalamaktır.



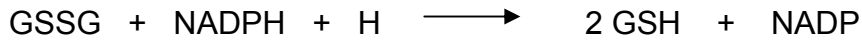
% 20 oranında sitoplazmada geri kalanı peroksizomlarda lokalizedir. Kan, kemik iliği, mukoz membranlar, böbrek ve özellikle de karaciğer olmak üzere birçok dokudaki peroksizomlarda konsantrasyonu oldukça yüksektir (Halliwell ve Arumoa, 1991)..

Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) ve Glutatyon Redüktaz

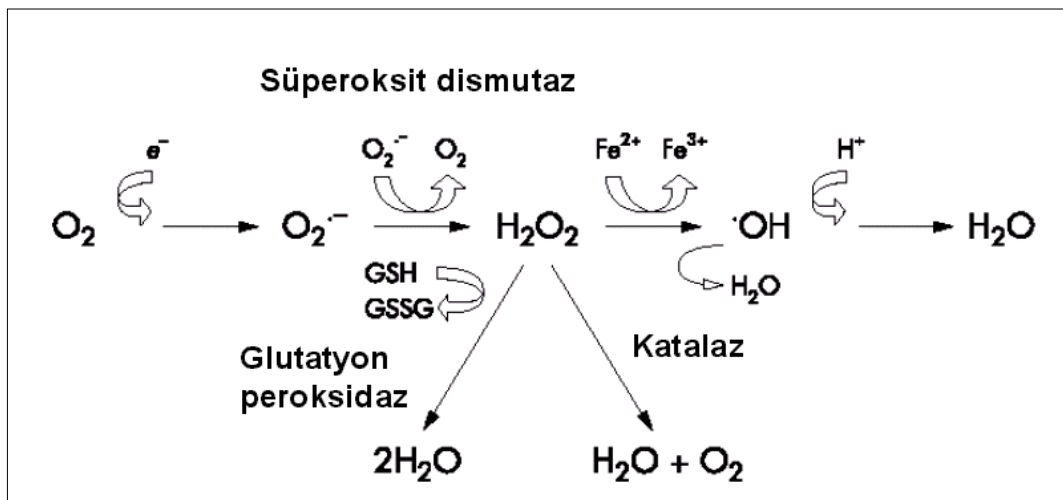
GSH-Px; hidrojen peroksitin uzaklaştırılmasında görevli enzimdir. Redükte glutatyonun (GSH) -SH grubundan, su oluşturmak için hidroksil radikali ya da hidrojen peroksitle birleşmek üzere hidrojen çıkartmasını sağlar. 4 alt üniteden oluşur. Selenyum içerdiğinden hücreleri çeşitli hasarlara karşı koruyan bir **selenoenzim** olarak kabul edilir (Gamble ve ark., 1997). En fazla aktivite gösterdiği dokular, eritrositler ve karaciğerdir. Normal koşullarda hidrojen peroksitin detoksifikasyonunu yapar. Bunun yanında, GSH-Px intrasellüler alanda lipidleri peroksidasyondan koruyan en önemli enzimdir. Substratı basit bir tripeptid olan **glutatyondur** (GSH).



H_2O_2 'lerin indirgenmesi ile (redükte) oluşan GSSG ise **glutatyon redüktazın** katalizlediği reaksiyonla tekrar GSH'a dönüşür.



GSH-Px'in hücredeki dağılımı glutatyon redüktaza bağlıdır. Her iki enzim de sitozolde en yüksek konsantrasyonda bulunur (Milne, 1999).



Şekil 4: ROT'ların oluşumu ve detoksifikasyonda rol alan enzimler (Nedeljkovic ve ark., 2003)

Glutasyon-S-Transferaz (GST)

GST'lar iki protein alt biriminden oluşan bir enzim ailesidir. Genel olarak 3 **sitozolik** ve bir de **mikrozomal** olmak üzere dört ana gruba ayrılırlar. Organizmaya giren ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynamaktadırlar (Çebi, 2001). Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid hidroperoksitlere (ROOH) karşı GST'lar Se-bağımsız glutasyon peroksidaz aktivitesi gösterirler:



Antioksidan aktivitelerine ilaveten çok önemli başka biyokimyasal fonksiyonlara da sahip olup hem, bilirubin ve bazı kortikosteroidler gibi endojen maddeleri reversibl olarak bağlayarak bunların hücre içi transportunda görev alırlar. Bazı güçlü alkilleyici ajanlara doğrudan kovalent bağlanarak hücrel proteinler ve makromolekülleri bu ajanların etkisinden korurlar. GST'lar LTB₄ (lökotrien B₄) ve prostaglandin sentezinde rol oynarlar (Mannervik, 1985).

2.5.2. NON-ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR

Glutasyon (GSH): Önemli bir intrasellüler antioksidandır ve ekstrasellüler mesafede çok düşük konsantrasyonlarda bulunur. **Glutamik asit, sistein** ve **glisin** amino asitlerinden meydana gelmiş bir tripeptittir. GSH'a antioksidan özelliğini sisteinin tiyol grubu kazandırır.

GSH, HO. ve singlet O₂ gibi ROT'lerinin temizleyicisidir. Serbest radikal ve peroksidlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Bunun dışında proteinlerdeki –SH gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı muhafaza eder. Demirin Fe⁺² (ferröz) halde tutulmasını sağlar. Böylece, protein ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller, hatta rejenere olmalarını sağlar.

GSH birçok enzimin kofaktörüdür (örn: **HMG CoA Redüktaz**). Tiroid hormon sentezinde rol oynar. Bazı moleküllerin hücre içi taşınmasına aracılık eder. Birçok kimyasal maddenin karaciğerde detoksifikasyonunda rol oynar.

N-asetil sistein hücre membranını geçip hücre içinde sisteine dönerek GSH üretimini artırır.

Vitamin C (Askorbik Asit): Vitamin C bir ketolaktondur. Suda eriyen vitaminlerden olan askorbik asit özellikle taze yeşil sebze, meyve ve trunçgillerde bol miktarda bulunur. Çok güçlü bir indirgeyici ajan olan vitamin C süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. Ayrıca, antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller. Yine vitamin C, tokoferoksil radikalının tokoferole redüklenmesini de sağlar.

Vitamin C'nin antioksidan etkisinin yanında oksidan etkisi de söz konusudur. Çünkü, vitamin C ferrik demiri (Fe^{+3}) ferröz demire (Fe^{+2}) indirgeyen süperoksit dışındaki tek hücreli ajandır:

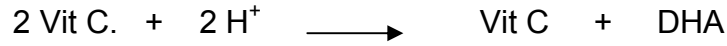


Bu yolla askorbik asit proteine bağlı ferrik demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan indirgeyerek **Fenton reaksiyonunda** H_2O_2 ile etkileşmeye uygun olan ferröz demire dönüştürür. Yani O_2^- . Üretimine katkıda bulunur.

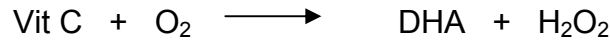
Vitamin C'nin Fe^{+3} ile doğrudan reaksiyonunda vitamin C radikali (Vit C.) de oluşur:



Vit C. radikali çok reaktif değildir. Ya **NADH redüktaz** tarafından indirgenir ya da iki proton alıp serbest radikal reaksiyonlarının ilerlemesini durdurur:

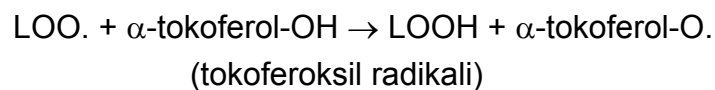


Bundan başka vitamin C oksidasyonundan H_2O_2 de meydana gelebilir:



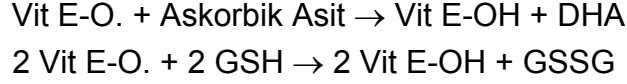
Vitamin E (Tokoferol): E vitamini tokoferol yapısında olup α , β , γ ve δ olarak dört tipin karışımıdır. α -tokoferol doğal dağılımı en geniş ve biyolojik aktivitesi en fazla olanıdır. Antioksidan etkisi en fazla olanı da α -tokoferoldür. Yapısında bulunan fenolik hidroksil gruplu aromatik halka vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır.

En yüksek vitamin E konsantrasyonu mitokondri ve mikrozoimler gibi membrandan zengin hücre kısımlarında bulunur. Çok güçlü bir antioksidan olan E vitamini hücre membran fosfolipidlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal etkilerinden koruyucu savunma elemanıdır. Bir molekül vitamin E 100 molekül yağ asidinin peroksidasyonunu önleyebilir. Vitamin E O_2^- , $HO\cdot$, singlet O_2 , lipid peroksil ($LOO\cdot$) radikallerini ve diğer radikalleri temizler. Lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Lipid peroksil radikallerini yıkarak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırdığı için zincir kırıcı bir antioksidan olarak da bilinir:



Sonuçta oluşan tokoferoksil radikali (α -tokoferol-O \cdot) stabildir ve kendi kendine lipid peroksidasyonu başlatmak için yeterince reaktif değildir. Glukuronik asitle oksidasyona uğrayarak safra yolu ile atılır.

E vitamini ve GPx serbest radikal etkisine karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. GPx oluşmuş peroksitleri ortadan kaldırır, E vitamini sentezlerini engeller. Ayrıca GPX'in yapısına katılan Se+2 'un organizmadan kaybını önler ve enzimi aktif şekilde tutar. E vitamini okside olduktan sonra ve parçalanmadan önce askorbik asit ve GSH tarafından yeniden indirgenebilir.



Vitamin A (β-Karoten): Yağda eriyen vitaminlerden ilk bulunanıdır. A vitamininin metabolik ön maddesi olan β-karoten son derece güçlü singlet O₂ temizleyicisi olup ayrıca hidroksil, peroksil ve alkoksil radikalleriyle de doğrudan reaksiyon verip lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu önleyebilir. A vitamini oksijen etkisi ile kolayca oksitlenir. Görme, üreme, büyüme, epitel hücre sağlığında rol oynar.

Melatonin: Melatonin HO. radikalini temizleyen çok güçlü bir antioksidandır. HO. ile reaksiyona girdikten sonra bir indolil katyon radikaline dönüşür. Bu da ortamdaki O₂- radikalini tutarak antioksidan aktivite gösterir. Diğer antioksidanlara göre çok güçlü bir antioksidan olmasının nedenleri:

- ✓ Lipofilik olması nedeniyle hücrenin hemen tüm organellerine, birçok dokuya rahatça girerek geniş bir alanda aktivite gösterir;
- ✓ Hücre çekirdeğine girebilmesi nedeniyle DNA'yı oksidatif hasara karşı korur;
- ✓ Çok yüksek dozlarda ve uzun süreli kullanımında bile toksik bir etkisi yoktur;
- ✓ Prooksidan aktiviteye sahip değildir.

Yaşlanma ile birlikte melatonin de azaldığı için yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı bazı hastalıkların patogeneğinde önemli rolü olabileceği bildirilmiştir. Sonuç olarak, melatoninin klinik açıdan etkili bir antioksidan ve dolayısıyla antikanserojen olduğuna inanılmaktadır.

Ürik Asit: Pürin metabolizmasının son ürünü olan ürik asit normal plazma konsantrasyonlarında lipid radikalleri dışında tüm serbest radikalleri temizler. Japon araştırmacılar lipid peroksidasyonunu önleyici etkileri olduğunu da bildirmişlerdir. Ayrıca, C vitamini oksidasyonunu engelleyici etkisi de vardır.

Albümin: Albümin yapısında bulunan çok sayıdaki sülfidril grubu aracılığıyla bakır iyonlarını sıkı olarak bağlar ve bakır bağımlı lipid peroksidasyonu ile HO. oluşumunu inhibe eder. Albümine bağlı bakır bazı oksidan oluşumlarda bulunabilirse de oluşan radikaller biyolojik olarak önemsizdirler. Albümin aynı zamanda etkin bir HOCl temizleyicisidir, kanda serbest yağ asitlerini taşır ve bilirübini bağlar. Bu bağlı bilirübünün antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir.

Sistein: O₂- ve HO. radikallerinin temizleyicisidir.

Bilirubin: "Hem" katabolizmasının sonucunda oluşan safra pigmenti bilirubinun lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği ve HO. ve H₂O₂ radikallerinin temizleyicisi olduğu bilinmektedir.

Seruloplazmin: Plazmada major bakır içeren proteindir. Seruloplazmin ferro-oksidad aktivitesi göstererek Fe⁺²'i Fe⁺³'e okside eder. Böylece Fenton reaksiyonunu ve serbest radikal oluşumunu inhibe eder. Demir ve bakır bağımlı lipid peroksidasyonunu önleyici etki gösterir. Aynı zamanda bir akut faz reaktanıdır ve inflamatuvar hadiselerde seviyesi artar.

Ferritin: Dokulardaki demiri bağlayarak serbest radikal reaksiyonlarında yer almasını engeller.

Transferrin ve Laktoferrin: Transferrin dolaşımdaki, laktoferrin lökositlerdeki serbest demiri bağlar ve serbest radikal oluşumunu önler.

Haptoglobin ve Hemopeksin: Hemoglobin, gerek dekompozisyonla ortama demir vererek gerekse doğrudan peroksidlerle etkileşerek lipid peroksidasyonunu uyarabilir. Haptoglobin hemoglobini, hemopeksin "hem"i bağlayarak bu demir bileşiklerinin lipid peroksidasyonunu uyarmasını engeller.

Mannitol: HO. radikalini temizleyici etki gösterir.

Oksipurinol: Allopurinol metaboliti olup doğrudan HO. ve HOCl radikallerini azaltıcı etki gösterir.

Probukol: Kan kolesterolünü düşürmede kullanılan bir ilaç olup güçlü antioksidan özelliği vardır. Lipid peroksidasyon zincirini kırıcı özellik taşır.

Deferoksamin (DFO): DFO, Fe⁺³'ü bağlar ve oluşan bu kompleksteki demirin indirgenmesi son derece zordur. Bu sayede serbest radikal oluşumuna katılamaz.

Lipoik Asit: Lipid peroksidasyonunu önler. HO. ve singlet O₂ toplayıcısıdır. H₂O₂'i indirger. Vitamin E tüketimine karşı koruyucudur.

Flavinoitler: Farklı mekanizmalarla lipid peroksidasyonunu engeller.

2.6. OKSİDATİF STRESİN DEĞERLENDİRİLMESİ İLE İLGİLİ ANALİZLER

Kemilüminesans Analizleri: Tüm ROT'lar ve oksidanlar luminol gibi kimyasal maddelerle reaksiyon vererek luminesans meydana bu luminesans ölçülerek doğrudan serbest radikal miktarı tespit edilebilir. Lusigenin ve lusiferin analogu olan MCLA maddeleri süperoksit ve hidroksil radikali için spesifiktir. Ozon NO'in luminesans tayininde kullanılır. Lipid hidroperoksit, fosfolipid ve kolesterol hidroperoksitler için Sitokrom-C-hem ile kemilüminesans tayini yapılabilmektedir (Tarpey ve Fridovich, 2001).

Elektron Paramagnetik Rezonans Spektroskopisi (EPR): Elektron Spin Rezonans Spektroskopisi (ESR) de denilir. Bu yöntem en çok kullanılan doğrudan radikal ölçüm yöntemidir (Laurindo ve ark., 1994). Radikallerin bünyesinde bulunan magnetik enerji

seviyesinin dışarıdan uygulanan bir magnetik alanla iki farklı enerji seviyesine ayrılma olayı üzerine kurulmuştur. Yöntemin dezavantajı birkaç saniye gibi kısa ömürlü radikallerin ölçüm işleminin zor olmasıdır ve bu yüzden sadece uzun ömürlü radikaller doğrudan analiz edilebilir. Bu dezavantajı yenmek için kısa ömürlü radikaller spin tuzağı denilen nitrozo veya nitron içeren bileşiklerle reaksiyona sokulup uzun ömürlü türevler oluşturulur ve analiz mümkün hale gelir. (Tarpey ve Fridovich, 2001)

Aromatik Hidroksilasyon: HO. radikali salisilik asitin benzen halkasına atak yaparak stabil bir hidroksilli ürün verir. Bununla birlikte, sadece 2,3-dihidroksibenzoik asit izomerleri in vivo HO. konsantrasyonunu yansıtır. (**Stein ve Weiss, 1950**)

Dien Konjugasyonu: Serbest radikaller varlığında, çoklu doymamış yağ asitlerinden bir elektron koparılır, bunu sonra elektronik yeniden düzenlenme izleyerek çift bağlı konjuge sistemler oluşur. Serum ve plazmanın metanol-kloroform ekstraktlarının spektrofotometrede 200-300 nm dalga boyunda taranmasıyla bu değişim doğrudan analiz edilebilir ve hazırlanan standart lipid peroksit eğrisi ile konsantrasyonu hesaplanır. (Tarpey ve Fridovich, 2001)

Uçucu Alkanlar: Etan ve pentan gazları lipid peroksidasyonu göstergesi olarak kullanılmaktadır. Solumun havası özel düzeneklerle gaz kromatografisi sistemine enjekte edilerek analiz edilmektedir.

Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler (TBARS): MDA, tiyobarbitürik asit ile 1:2 oranında birleşerek spektrofotometre veya fluorometre ile ölçülebilen bir ürün oluşturur (Takeuchi ve ark., 1977). Şu anda en çok kullanılan lipid peroksidasyon tayin yöntemidir. Kullanılan örneklerin lipoprotein fraksiyonlarının asit ile çöktürülmesi reaksiyonun spesifikliğini artırmaktadır. Kullanılacak örnekler -80 °de 1-2 ay saklanabilir.

MDA için HPLC analizleri de mevcuttur. Bu teknik daha fazla zaman alıcı, fakat daha spesifiktir. (C18 kolon ve asetonitril veya metanol gibi mobil fazlar analiz için uygundur) (Tarpey ve Fridovich, 2001)

Aldehitler: Bu ikincil lipid peroksidasyon ürünleri demir iyonları varlığında artar ve güçlü biyolojik etkileri vardır. İnsan plazmasında bulunan 2-10 karbonlu aldehitler 1,3-siklohegzandion ile reaksiyon vererek floresan özellik gösteren türevler oluşturur ve floresans detektörlü HPLC sistemleri ile analiz edilir. Bundan başka aldehitler dinitrofenol hidrazin ile reaksiyon vererek sarı renk oluşturur ve UV detektörlü HPLC sistemlerinde ölçülebilir. (Tarpey ve Fridovich, 2001).

Lipid Hidroperoksitler: Konjuge dien ve TBARS ölçümlerine ilaveten HPLC ile doğrudan lipid, kolesterol, kolesterol ester peroksitleri ve organik peroksitleri ölçen yöntemler de mevcuttur (Tarpey ve Fridovich, 2001) .

Okside Lipoproteinler: Düşük ve yüksek dansiteli lipoproteinler, antioksidan oldukları kadar fosfolipid ve kolesterol ester hidroperoksitleri de taşırlar. Artmış

peroksidasyonu tayin etmek için dien konjugasyonu ölçümü, TBARS ölçümü, antikor titresi ve HPLC kullanılır.

Tiyoller: GSH/GSSG oranı oksidatif için bir indeks olabilir. Bunun için spektrofotometrik, fluorometrik ve HPLC analiz yöntemleriyle GSH ve GSSG düzeyleri ölçülebilmektedir. Bunların yanında sistin, sistein ve disülfidler de antioksidan olarak önemlidir ve ölçümleri faydalı olabilir. (Tarpey ve Fridovich, 2001).

Eser Elementler: Fe, Cu, Zn, Mn gibi bazı geçiş metal iyonları lipid peroksidasyonu için önemli biyolojik mediatörlerdir. Bazı antioksidan enzimler için kofaktör olarak işlev görürler. Ayrıca, serbest radikallerin oluşumlarına aracılık ederler. (Fenton reaksiyonu) Bu açıdan, bu geçiş elementlerinin atomik absorpsiyon spektrometrisi ile ölçülerek oksidatif hakkında bir fikir edinilebilir.

Vitaminler: A, C, E gibi antioksidan vitaminlerin ölçümleri de bilgi vericidir. Bunlar HPLC, spektrofotometre, fluorometre, gaz kromatografisi gibi metodlarla ölçülebilir.

Antioksidan Enzimler: SOD, katalaz, GPx, GR ve GST gibi enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçülebilir.

Total Antioksidan Kapasite (TAK) Ölçümü: Troloks eşdeğer antioksidan kapasite (TEAC) denilen bir yöntemle total antioksidan kapasite ölçülebilmektedir. Bu amaçla vitamin E, β-karoten, flavinoidler, GSH, urat, bilirubin, transferrin, seruloplazmin, albümin, GPx, Se, SOD, katalaz seviyeleri değerlendirilmektedir. Yöntemin temeli radikallerin ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazolin)-6-sulfonik asit) ile reaksiyon vermesine dayanır.

Oksijen radikali absorblama yeteneği de aynı TAK'nin tespiti için kullanılır, fakat burada floresans ölçümü yapılmaktadır. (Tarpey ve Fridovich, 2001)

NO Ölçümü:

1. Doğrudan NO ölçen yöntemler:

- ✓ Kemilüminesans yöntemi
- ✓ Diazotizasyon yöntemi
- ✓ Methemoglobin spektrofotometre yöntemi
- ✓ Gaz kromatografisi yöntemi
- ✓ Kütle spektroskopisi yöntemi (MS)
- ✓ Mikroelektrot yöntemi

2. Dolaylı NO ölçüm yöntemleri (Vücuttaki NO metabolizması ile ilişkili mekanizmaları kullanarak NO miktarının dolaylı ölçüldüğü yöntemler):

- ✓ cGMP ölçümü
- ✓ NOS ölçümü

3. Yardımcı ölçüm yöntemleri: NOS enzimi kofaktörlerinin (NADPH, BH₄, FAD, FMN) ölçümleri NO miktarı hakkında fikir verebilir. (Tarpey ve Fridovich, 2001)

Tablo 4: Oksidatif Stres ve ROT Ölçüm Yöntemleri (Aral ve Türkmen, 2002)

Doğrudan ölçüm

ESR (electron spin resonance) spektrofotometresi
Elektron tutucular
Aromatik hidroksilasyon
Kemilüminesans

Hedef Moleküllerdeki Hasarın Ölçümü

Lipid peroksidasyonu (tiyobarburik asit deneyi ile reaksiyon veren maddeler –TBARS, etan/pentan ekshalasyonu)
Protein oksidasyonu
DNA hasarı
DNA yapısındaki modifiye bazların ölçümü (8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin)
DNA'ya bağlı aldehitlerin ölçümü
Tek hücre jel elektroforezi (SCGE: COMET assay)
Mutasyona uğramış DNA'nın immunodeteksiyonu
Kromozomal aberasyonlar ve mikronükleiler gibi mikroskobik göstergeler
Glikasyon ürünleri

Antioksidan Savunma Sistemindeki Değişiklikler

Antioksidan kapasite
Enzimler
Küçük moleküller

2.7. KALP HASTALIKLARINDA REAKTİF OKSİJEN / NİTROJEN TÜRLERİNİN KAYNAKLARI

Kalp hastalığında artmış ROT üretiminin kesin kaynakları tüm durumlar için net olarak ortaya konmamıştır. Memeli hücrelerinde önemli ROT; süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali ve hidrojen peroksittir (H_2O_2). Aynı zamanda, son yıllarda RNT peroksinitritin ($ONOO^-$) kardiyak disfonksiyondaki önemli rolü gösterilmiştir. Kardiyovasküler hastalık sürecinde hücrel ROT ve peroksinitrit artışını kolaylaştıran önemli potansiyel kolaylaştırıcı faktörler vardır, ancak akut iskemi/reperfüzyon (örn: MI) ve kronik durumlar (örn: kalp yetersizliği) gibi farklı koşullarda oksidanların kaynakları farklılık gösterebilir. İnsanlarda iskemi/reperfüzyon veya hipoksi sırasında ROT'nin indüklediği kardiyak hasara ait bulgular yetersiz olmakla birlikte, birçok çalışma iskemi sırasında oksidan üretiminin biyomarkerlarında artış ve/veya antioksidan kapasitede azalmanın olduğunu göstermiştir (Wattanapitayakul ve Bauer, 2001).

Kalp hastalıklarında ROT üretim yolları;

Mitokondriyal ETZ: Normal fizyolojik koşullarda, oksijen mitokondriyal oksidatif fosforilasyon ve ATP üretimi için temeldir. ROT gibi potansiyel toksik ürünleri mitokondriyal

ETZ sırasında intrasellüler olarak oluşur ve intrasellüler antioksidan savunma tarafından kontrol edilir. Hem hipoksi (kanlanma yeterli fakat arteriyel oksijen parsiyel basıncı düşük) hem de iske miyle (koroner kan akımında kesilme veya azalma) oksijen sunumundaki azalma mitokondriyal ETZ'ni bozarak toksik metabolitlerin birikmesine, asidoza, ATP eksikliğine, intrasellüler Ca^{2+} artışına, mitokondriyal membran depolarizasyonuna, matriks şişmesine ve hücre ölümüne yol açar (Lemasters ve ark., 1997). İlginç olarak, iskemik hücre nekrozunun ilerlemesini önleyen kan akımında düzelme bazen yaşayan hücrelerde **reperfüzyon hasarına** neden olur (Ambrosio ve Tritto, 1999). Bu fenomen mitokondriyal solunuma oksijen sunumunun sonucu olarak masif ROT üretimiyle birliktelik gösterir. Önemli deneysel hipoksi veya iske mi/reperfüzyon modellerinde, miyokardiyumdaki hasarın mitokondriyal ETZ'nde oluşan oksijen radikalleri nedeniyle olduğu gösterilmiştir (Lesnefsky ve ark., 1997). Fazla miktarda ROT oluşumu intrasellüler antioksidan savunma ağını yenebilir ve nötröfil aktivasyonu, lipid peroksidasyonu, protein modifikasyonu ve DNA kırılmalarına yol açar (Ambrosio ve Tritto, 1999).

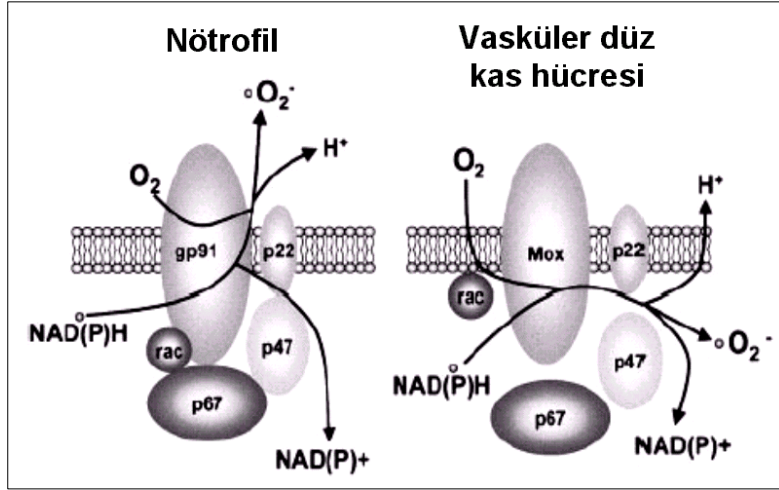
İmmun hücre infiltrasyonu ve sitokinler: Kalp kası içinde aktive olmuş immün hücrelerin infiltrasyonu kardiyak oksidan üretimi için potansiyel bir mekanizmadır. Post-iskemik reperfüzyon sırasında ROT hücre ölümü ve doku hasarına yol açar ve de akut inflamatuvar (iltihabi) yanıtı tetikleyebilir. Özellikle nötrofillerin oluşturduğu bu immün hücre aktivasyonu ROT, proteolitik enzimler ve pro-inflamatuvar sitokinler gibi medyatörler sekrete ederek doku hasarını artırabilir (Wattanapitayakul ve Bauer, 2001).

Oksidatif enzim indüksiyonu: Son yıllarda bazı kardiyovasküler durumlarda **ksantin oksidaz, NADH/NADPH oksidaz** ve **NOS** gibi sitozolik oksidazların aktivasyonu ve/veya indüksiyonunun mitokondri dışında ROT oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir (Wattanapitayakul ve Bauer, 2001).

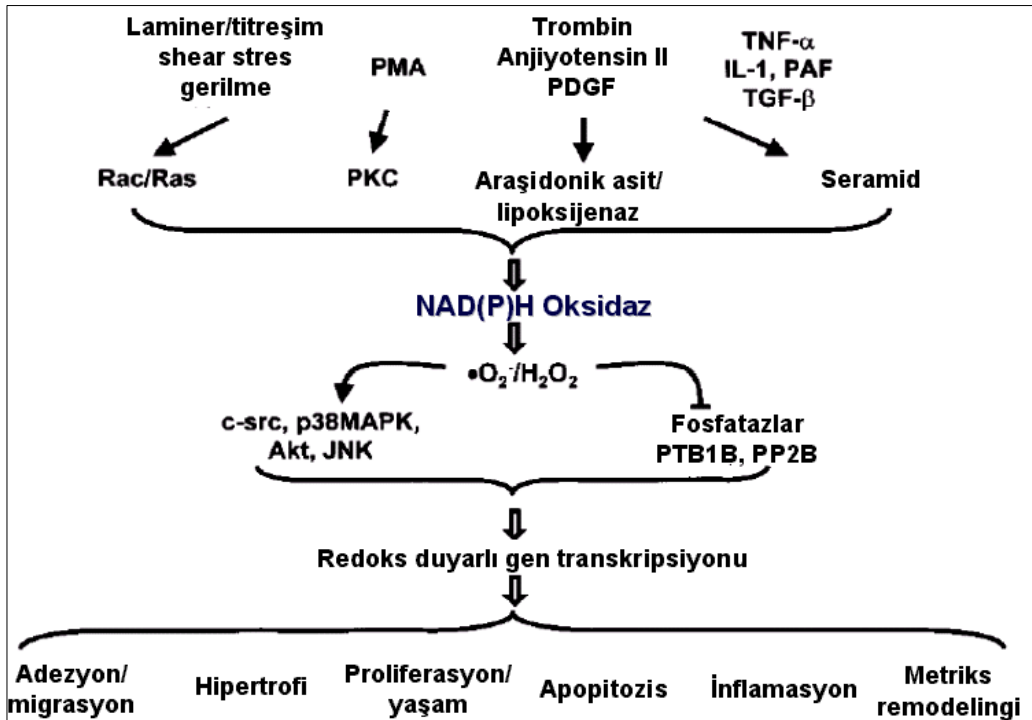
Ksantin oksidaz; pürin degradasyon yolunda anahtar enzimdir. Fizyolojik koşullarda bu enzim karaciğer ve ince bağırsak mukozasında lokalizedir. Bununla birlikte, kronik hipoksi sırasında veya artmış inflamatuvar sitokin varlığında aşırı ROT üretimi ksantin oksidaz aktivitesini artırır ve plazmaya çıkmasına yol açar. Dolaşan ksantin oksidazın artmış seviyeleri vasküler dokularda daha fazladır ve bu endotel fonksiyon bozukluğunda, hiperkolesterolemik tavşanlarda ve insan aterosklerozundaki önemini vurgulamaktadır (Houston ve ark., 1999). Ksantin oksidazın plazmada artışı aynı zamanda süperoksitlerin aşırı üretimine katkıda bulunur.

NADPH oksidaz genellikle fagositik hücrelerde bulunur. Vasküler NADH/NADPH oksidazın tüm vasküler komponentlerde (endotel, medyal düz kas, adventisya) süperoksit üretimini önemli derecede kolaylaştırdığı gösterilmiştir (Bayraktutan ve ark., 1998). Kalp hastalığında anjiyotensin II gibi faktörler bu enzim yoluyla vasküler dokularda süperoksit üretimini aktive eder (Wattanapitayakul ve Bauer, 2001).

NOS elektron donörü NADPH'dan bir prostetik hem grubuna flavin aracılı elektron transportunu katalize eden p450 redüktaz benzeri bir enzimdir. Sitokin aracılı (interlökin- 1 β , IL-6, interferon- γ ve tümör nekrozis faktör- α) kardiyak kontraktıl disfonksiyon ve kalp hastalığının gelişmesinde NOS indüksiyonuyla NO üretimi artışının önemli bir mekanizma olduğu gösterilmiştir (Sawyer ve Colucci, 1998).



Şekil 5: NAD(P)H oksidazın yapısı (Griendling ve ark., 2000)



Şekil 6: Oksidaz aktivasyon modeli ve kardiyovasküler hücrelerde fonksiyonel sonuçları (Griendling ve ark., 2000)

2.8. OKSİDATİF STRES VE KALP HASTALIKLARI

Kalp hastalıklarına karşı miyokardiyal savunma birkaç aşama gösterir.

Birincil savunma, hücre içi antioksidanlardan (SOD, CAT, GSH-Px ve GSH-redüktaz gibi) oluşur. İkincil savunma lipolitik ve proteolitik enzimleri (proteaz, fosfolipaz gibi) içerir. Üçüncül savunma oksidatif stres sonucunda artan ROT ile başa çıkabilmek amacıyla kalpteki gen ve proteinlerden (redoks duyarlı transkripsiyon faktörü olan) nükleer faktör κ B (NF- κ B) ve aktivatör protein I (AP-I) ile (redoks ile regüle edilen gen) Bcl-2 geni sayesinde hücre içi antioksidanların üretimi artırılır (Aral ve Türkmen, 2002)

Oksijenin parsiyel redüksiyonuyla üretilen singlet oksijen, süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi aktive olmuş oksijen türleri oldukça reaktiftir ve kalp gibi organlarda toksik etkilere yol açarlar (Singal ve ark., 1998).

İzole edilmiş kalplerde yapılmış çalışmalar, oksijen radikalının oluşumuna yol açan her olayın, yüksek enerjili fosfatlarda azalma, kontraktıl (kasılma) fonksiyonun kaybına ve yapısal anormalliklere neden olduğunu ortaya koymuştur (Burton ve ark., 1984; Gupta ve Singal, 1989) (**Tablo 5**)

Tablo 5: Kardiyak oksidatif stresin sonuçları

Kardiyovasküler Disfonksiyon

Hücre Ölümü

- ✓ Nekroz
- ✓ Apoptozis

Endojen Antioksidan Savunmada Değişiklikler

Lipid ve Protein Metabolizması / Fonksiyonunda Değişiklikler

- ✓ Lipid metabolizması ve lipid peroksidasyonu
 - Uzun zincirli serbest yağ asitleri
 - Membran lipidleri
 - Lipoproteinler
- ✓ Postranslasyonel protein modifikasyonu

Sinyal İletimindeki Değişiklikler

- ✓ Ca^{2+} iletisi
- ✓ Protein fosforilasyonu
 - Tirozin fosforilasyonu
 - Serin/treonin fosforilasyonu

Gen Ekspresyonunda Değişiklikler

Oksijen radikalleri doymamış (ansatüre) lipidlerle reaksiyon ve membranlardaki lipid peroksidasyon reaksiyonlarının başlamasına yatkınlık oluşturmaktadır. Serbest radikaller bunun yanında, proteinlerdeki sülfidril gruplarının ve nükleik asitlerdeki iplikçiklerin oksidasyonuna neden olur. **Katekolaminler stresinin indüklediği kalp hastalığındaki**

rolünü araştıran in vitro çalışmalarda katekolaminlerin otooksidasyonunun serbest radikal üretimini başlatarak kardiyak disfonksiyona yol açtığına dair bulgular elde edilmiştir (Singal ve ark., 1983). Bunun yanında, miyokart infarktüsü (kalp krizi) sırasında **iskemi-reperfüzyon hasarında** serbest radikallerinin rolü ortaya konmuş ve bunun sarkoplazmik retikulumdaki Ca²⁺ transportunda azalmayla oluştuğu gösterilmiştir (Hess ve ark., 1983). Bu yapılan ex vivo ve in vivo çalışmalar, önemli birçok kalp hastalığının patogenezinde artmış serbest oksijen radikallerinin önemini ortaya koymuştur. (**Tablo 6**)

Tablo 6: Kardiyovasküler hastalıklarda artmış ROT üretimiyle ilgili bulgular

Hastalık	Bulgular
Hipertansiyon	İn vitro ve in vivo ROT ile indüklenen vasküler düz kas hücre proliferasyonu Anjiyotensin II NADH/NADPH oksidaz yoluyla oksidan üretimini hızlandırır Süperoksit üretiminin neden olduğu endotel disfonksiyonu
Koroner arter hastalığı (ateroskleroz)	Süperoksit üretiminin neden olduğu endotel disfonksiyonu Artmış okside LDL (düşük dansiteli lipoprotein)
Miyokart infarktüsü	ROT oluşumuyla iskemi/reperfüzyon hasarı Oksidanların yaptığı miyosit nekrozu ve/veya apopitozis
Kalp yetersizliği	Artmış NO üretimi kardiyak disfonksiyonu artırır Sitokin derive ROT kardiyak apopitozisi artırır ROT'in indüklediği kardiyak apopitozis ve/veya nekroz

2.8.1. HİPERTANSİYON

Dolaşımdaki homeostazı kontrolü, vasküler endotelyumun kimyasal, hormonal ve hemodinamik değişikliklere olan cevabına bağlıdır. Hipertansiyonda, prostaglandinler, endotelden derive hiperpolarize edici faktör ve nitrik oksitten oluşan endotelle ilişkili vazodilatör sistemlerdeki bozukluk endotel disfonksiyona neden olmaktadır (Rathaus ve Bernheim, 2002).

Yapılan birçok çalışmada hipertansiyonda mikrovasküler düzeyde oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir (Suzuki ve ark., 1995; Swei ve ark., 1997). Hipertansiyonda serbest radikallerin indüklediği nitrik oksit yıkımı kritik rol oynar (Rathaus ve Bernheim, 2002). Yine NAD(P)H oksidaz ve ksantin oksidaz gibi süperoksit üreten enzimlerin hipertansiflerde arttığı gösterilmiştir (Rajagopalan ve ark., 1996; Beswick ve ark., 2001).

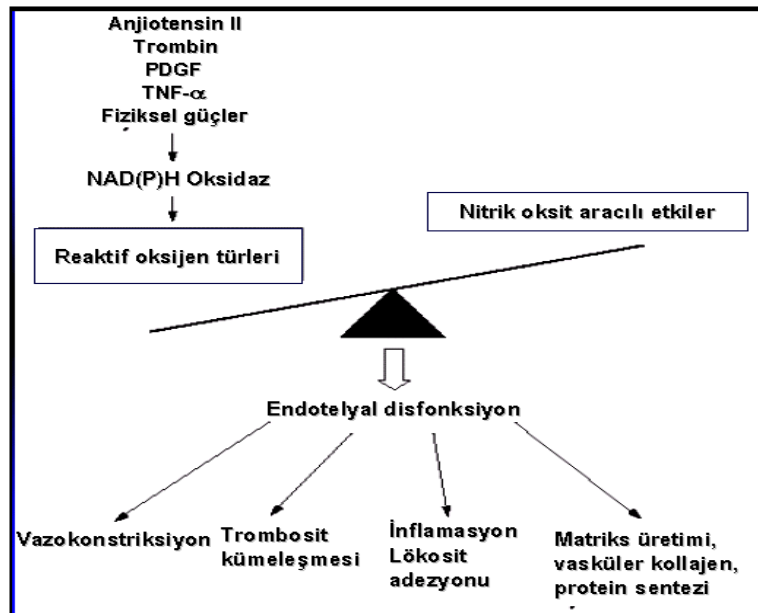
Kan SOD aktivitesinin hipertansiflerde daha az olduğu gösterilmiştir (Jun ve ark., 1996; Ulker ve ark., 2003). SOD in vitro olarak endotel disfonksiyonu düzeltebilir ve SOD mimetikler (tempol) deney hayvanlarında kan basıncını düşürebilmektedir (Nakazano ve

ark., 1991; Schnackenberg ve ark.1998). Ayrıca, süperoksit anyonlar hipertansiyonla ilişkili kardiyak hipertrofi, inme (felç) ve böbrek hasarının gelişmesinde rol almaktadır (Rathaus ve Bernheim, 2002). Kan basıncı normal ratlarda tuz yüklemesinin dirençli damarlarda ROT'lerinin üretimini artırdığı ortaya konmuştur (Lenda ve ark., 2000). Bunların yanında, hipertansiyonda vazokonstriktör siklooksijenaz ürünlerinin arttığı ve ksantin oksidaz yolundan oluşan O_2^- ve OH^- radikallerinin bu olayı olumsuz etkilediği gösterilmiştir (Vanhoutte, 2001). Tüm bunlar, ROT'lerinin hipertansiyondaki fonksiyonel önemini ortaya koymaktadır.

2.8.2. ENDOTEL DİSFONKSİYONU

Endotelyum vasküler tonus, platelet adezyonu, inflamasyon, fibrinoliz ve vasküler proliferasyonu düzenleyen lokal medyatörler sağlayarak vasküler homeostazı korur. Endotel fonksiyonunun bozulması (disfonksiyon) tüm bu olayları olumsuz etkileyerek kardiyovasküler risk oluşturur (Nedeljkovic ve ark., 2003). Mevcut gelişmeler oksidatif stresin vasküler disfonksiyon mekanizmalarını kolaylaştırdığını düşündürmektedir.

Oksidatif stres durumunda endotel hücreleri koruyucu fenotiplerini kaybederler ve proinflamatuvar moleküller sentezlerler (Kunsch ve Medford, 1999). Bunlar arasında vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1), hücrelerarası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve monosit kemotaktik protein-1 yer almaktadır. Reaktif oksijen türleri NO inaktivasyonunu hızlandırarak vazomotor fonksiyonu bozar. Endotel hücrelerinden büyüme faktörlerinin sekresyonunu hızlandırarak endotel hücre proliferasyonuna yol açar. Ayrıca apoptotik sinyal aktivasyonu ile endotel hücre kaybına yol açar (Irani, 2000).



Şekil 7: Vasküler fonksiyonda oksidatif stres ve NO balansı (Nedeljkovic ve ark., 2003)

2.8.3. ATEROSKLEROZ

Hiperlipidemi, diyabet, hipertansiyon, sigara ve yaşlanma gibi ateroskleroz için risk faktörleri endotel, vasküler düz kas hücresi ve adventisyal hücrelerden ROT'lerinin oluşumuna yol açar (Harrison ve ark., 2003). Bu ROT'lar aterogenez sürecinde rol önemli bir çok faktörü başlatır. Bunlar arasında; adezyon molekülü ekspresyonu, vasküler düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonu, endotelde apoptozis, lipidlerin oksidasyonu (okside LDL), proteolitik matriks metalloproteinazların (MMP) aktivasyonu ve vazomotor aktivitede değişiklikler yer almaktadır. Bu süreçte, ksantin oksidaz, NAD(P)H oksidaz, NOS ve mitokondriyal enzimler önemli rol oynar (Houston ve ark., 1999; Griendling ve ark., 2000). Erken dönemde endotel disfonksiyonuyla başlayan süreç, oksidan uyarının devamı ve antioksidan enzim aktivitesindeki yetersizlik devam ederse hızla ilerler ve aterosklerotik plaktan aşikar koroner arter hastalığına kadar devam edebilir (Heinecke, 2003). İnsan koroner arterlerinden elde edilen örneklerde SOD gibi antioksidan enzim aktivitesinde azalmanın gösterilmiş olması oksidatif stres ve ateroskleroz ilişkisinin güçlü bir kanıtıdır (West ve ark., 2001).

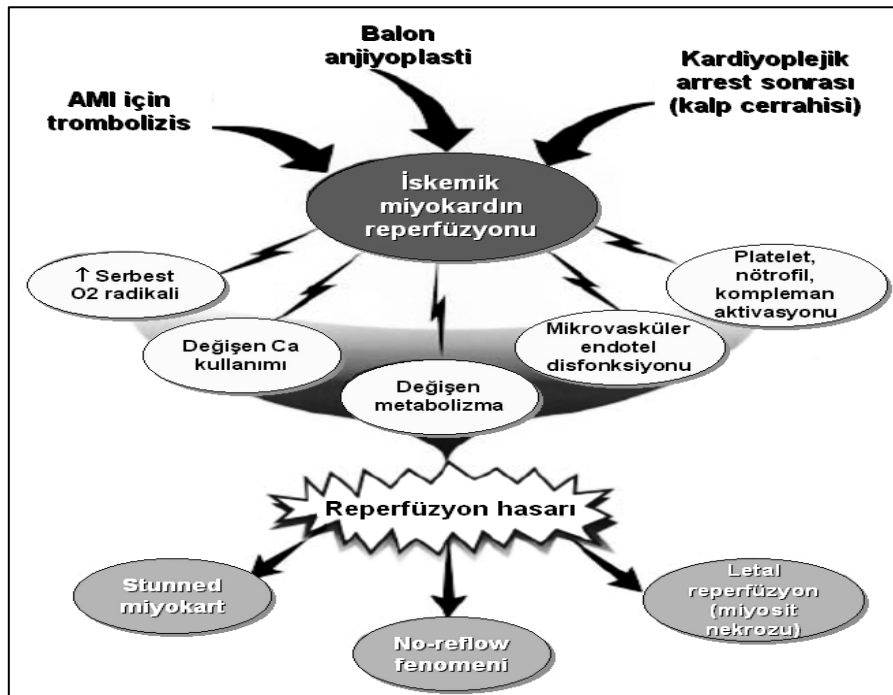
2.8.4. REPERFÜZYON HASARI

Serbest oksijen radikallerinin rolünün dolaysız olarak görüldüğü kardiyak sorunların başında **reperfüzyon hasarı** yer almaktadır. Reperfüzyon hasarı, tıkanmış koroner arterin (veya başka bir arterin) açılmasından sonra daha önce iskemik olan alana oksijenli kanın gelmesinin yarattığı bir olaylar zinciri sonrası paradoksik olarak artan miyokart (veya başka doku) hücre hasarıdır. Bu olayın kalp için anlamı ya geri dönüşebilir (miyokardiyal stunning) veya geri dönülemez (miyokart infarktüsü) hasardır. Hasar oluşumunun hücresel mekanizması koroner endotel hücreleri, dolaşımdaki kan hücreleri ve kardiyak miyositleri artmış serbest oksijen radikali oluşumudur (Lucchesi, 1990; Ku, 1982). Bunun kanıtları üç maddede incelenebilir (Keleş, 2002).

1. **Serbest oksijen radikallerinin postiskemik miyokartta artmış olduğunun gösterilmesi:** Hayvan deneylerinden serbest oksijen radikal oluşumunun reperfüzyonun başlamasından 10-30 saniye sonra ortaya çıktığı, hakim radikalın süperoksit tipi olduğu ve endotelden kaynaklandığı ve bazı lipid radikallerin 3 saate kadar oluşmaya devam edebildiği gösterilmiştir (Zweier ve ark., 1988). Koroner bypass sonrası reperfüzyonda da serbest oksijen radikali oluşumunda artışın direkt ve indirekt bulguları gösterilmiştir (Flitter, 1993).
2. **Dışarıdan serbest oksijen radikali verilmesinin iskemi / reperfüzyon hasarına benzer hasar yaratması:** Dışarıdan H₂O₂ perfüzyonunun reperfüzyon zedelenmesinin özellikleri olan hücresel K⁺ kaybı, yüksek enerjili fosfat

bileşiklerinin azalması, intraselüler Ca^{+2} artışı, miyosit kasılma gücünün zayıflarken gevşemenin giderek azalması, metabolik fonksiyonun yavaşlaması ve aritmiler gibi bozukluklara neden olduğu gösterilmiştir (Bolli, 1990; Weiss ve ark., 1993; Tarr ve Valenzano, 1993). Öne sürülen mekanizma; serbest oksijen radikallerinin mitokondri, sarkoplazmik retikulumdaki iyon transport proteinleri, enzimleri inaktive etmesi, lipid peroksidasyonu ile bu yapıları hasara uğratması ve bunun Ca^{+2} homeostazını bozmasıdır.

3. **Antioksidan enzim / ajanlarla önceden tedavinin hayvan deneylerinde iskemi / reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olabilmesi:** Bunu destekleyen birinci grup çalışmalarda SOD ve CAT gibi enzimlerin koruyuculuğu olup olmadığı incelenmiştir. Bazı çalışmalarda bu enzimler koruyucu (Mehta ve ark., 1989), bazılarında erken dönemde koruyucu, bazılarında ise faydasız bulunmuş (Engler ve Gilpin, 1989), ancak farklılıkların kullanılan metod ve enzim dozları ile ilişkili olduğu söylenmiştir. SOD'ın polietilenglikol'e bağlanıp enzim yarı ömrü ve hücre içine girişi artırılmış, ama ilgili çalışmalarda yine çelişkili sonuçlar alınmıştır. Bu enzim kompleksinin büyük olduğu için endotele yetersiz girdiği düşünülerek daha küçük SOD-mimetikler ve başka uzun etkili SOD formları üretilmiş ve koruyucu olduğu gösterilmiştir (Kilgore ve ark., 1994). Ayrıca, daha az spesifik antioksidan ajanlar (sülhidrilli aminoasit deriveleri, N-2 merkaptopropionil glisin, N-asetil sistein, dimetiltiüre, desferroksamin) kullanılmış ve faydaları gözlenmiştir (Keleş, 2002).



Şekil 8: Reperfüzyon hasarının mekanizmaları ve medyatörleri (Heinecke, 2003).

2.8.5. KALP YETERSİZLİĞİ

Oksidatif stresin önemi olduğu en önemli kalp hastalıklarından bir kontraktıl (kasılma) fonksiyonundaki bozulmanın neden olduğu **kalp yetersizliği**dir. Kalp yetersizliği gelişen hastalarda SOD, CAT, GSH-Px ve E vit gibi miyokardiyal antioksidanlar azalırken serbest oksijen radikallerin ve de oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir (Hill ve Singal, 1996). İlaç tedavisiyle hemodinamik fonksiyonu düzelen hastalarda antioksidan rezervde düzelme ve oksidatif streste azalma sağlanabilmektedir (Khaper ve Singal, 1997).

Son dönem kalp yetersizliği olan hastalarda olduğu gibi, miyokart infarktüsü geçiren hastalarda miyokardiyumun infarkt bölgelerinde miyositlerin **apoptozis** veya programlanmış hücre ölümüyle kaybı olmaktadır (Singal ve ark., 1998). Aynı zamanda, in vitro çalışmalar ve hayvan modellerinde iskemi/reperfüzyon, miyokart infarktüsü ve kronik basınç yüklenmesi (hipertansiyon) gibi durumların hepsinin oksidatif stres oluşturarak apoptozisle miyosit kaybına neden olduğu gösterilmiştir (Kaul ve ark., 1993). Apoptozisdeki oksidatif stresin rolü birçok hücre tipinde ortaya konmuştur. Adriamisin (antikanser ilaç), UV radyasyon ve TNF serbest radikal oluşturarak apoptozisi hızlandırır. Bunun yanında, SOD, vit E ve trolox gibi antioksidanların apoptozisi engellediği gösterilmiştir (Singal ve ark., 1998).



Şekil 9: Kalp yetersizliğinin gelişmesinde oksidatif stresin rolü

2.9. KALP HASTALIKLARINDA GLUKOZ İNSÜLİN POTASYUM TEDAVİSİ

GİK solüsyonu, miyositler tarafından temel enerji kaynağı olan glukozun hücre içine insülinle transportunun kolaylaştırıp, miyositin kasılma (kontraktilite) ve canlılığı sürdürmesi (viabilite) için gerekli enerji gereksinimini sağlamak amacıyla tasarlanmıştır. Miyokart iskemisinin metabolik bir olay olduğu ve metabolik destek sağlayan ajanlarla tedavi edilebileceği göz önüne alınarak iskemik kalp hastalıklarında GİK uygulaması ile ilgili farklı çalışmalar yapılmıştır (Lazar ve ark., 1995).

Birçok çalışmada GİK infüzyonunun postiskemik kalp üzerinde terapötik faydaları olduğu bildirilmiştir (Lazar ve ark., 1995). Akut miyokart infarktüsü (MI) hastalarda elektrikli stabilite ve metabolik destek sağlayan bir ajan olarak kullanılmış, zayıf ventrikül fonksiyonu olan hastalarda kardiyopulmoner bypass sırasında kardiyak indekste yararlı etkileri belirlenmiştir (Lell ve ark., 2002).

GİK infüzyonunun MI'ın akut fazında predominant enerji substratı olan serbest yağ asitlerinde bir azalmaya neden olduğu, bu etkinin uzun zincirli açıl CoA'nın birikiminin önlenmesi sonucu, serbest yağ asit metabolizmasının artmasına bağlı olduğu ileri sürülmüştür (Eberli ve ark., 1991). GİK'le tedavi edilen kronik iskemik kalp hastalarında, kan akımında artış ve koroner rezistansta azalma olmaktadır (Eberli ve ark., 1991).

İskemik kalp yetmezliği olan hastalarda insülinin tek başına, oksijen tüketimini artırmadan kontraktil fonksiyonları iyileştirdiği ve bu etkinin oksijen yararlanımındaki artışa bağlı olduğu belirtilmiştir (Tune ve ark., 1998). Yapılan birçok çalışmada kısa süreli GİK infüzyonunun iskemik kalp yetmezliği olan hastalarda kontraktil fonksiyonları düzelttiği gösterilmiş ve bu durum, GİK tedavisinin koroner kan akımında artış ve iskemik miyokartta metabolik koruyucu etkisi ile açıklanmıştır (Tune ve ark., 1998; Sasso ve ark., 2000; Khoury ve ark., 2003; Yazıcı ve ark., 2004).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Araştırma Gruplarının Oluşturulması

Çalışmaya Ondokuz Mayıs Üniversitesi (O.M.Ü.) Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kardiyoloji Kliniği'ne konjestif kalp yetersizliği semptom ve bulgularıyla başvuran, *konvansiyonel tedaviye* rağmen (ACE inhibitörü, spironolakton, furosemid, digoxin) NYHA sınıflamasına göre grup III-IV'deki EF<%40 olan dilate kardiyomyopati (KMP) hastalar alınmıştır.

Hastaların daha önce aldıkları tedaviler, KMP etyolojisi, risk faktörleri, bazal biyokimyasal ve ekokardiyografik özellikleri kaydedilmiştir.

Bu hastalardan rastgele seçilen 28'ine (GİK Grubu) standart kalp yetersizliği tedavisine ek olarak 24 saatlik infüzyon şeklinde GİK solusyonu (% 30'luk 500 cc glukoz içinde 300 Ü insülin, 60 mEq KCL) verilmiştir. Kontrol grubu olarak alınan 13 hastaya konvansiyonel tedaviye ek olarak yine aynı süre ve dozda % 0.9'luk NaCl infüzyonu uygulanmıştır. Tüm hastalar tedavi öncesi, tedavi süresince ve tedavi sonrasında serum potasyum, glukoz, kan basıncı, kalp hızı ve aritmi yönünden izlenmiştir.

Akut koroner sendrom, organik kapak hastalığı, diyabet, hipertansiyon ve böbrek yetmezliği olan hastalar çalışmaya alınmamıştır.

3.2. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarda kullanılan EDTA, CuSO₄, NaCl, Na₂CO₃, NaOH, CaSO₄, KH₂PO₄, Cumene H₂O₂, NaN₃, Merck W. Germany firmasından; Xanthine, Xanthine Oxidase, Sitokrom C, Süperoxide Dismutase, glutatyon peroxidase, glutatyon redüktaz, glutatyon, β-NADPH, Folin Phenol Reagent Sigma London England firmasından; Na-K tartarat Pancreac-Mantplet Esteban Barcelona Madrid firmasından sağlanmıştır.

Çalışmalarda kullanılan diğer analitik saflıktaki maddeler Sigma-London England ve Merck W. Germany firmalarından sağlanmıştır.

3.3. Çalışmalarda Kullanılan Aletler

Çalışmamızda O.M.Ü. Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kardiyoloji Servisi'nde bulunan malzemeler; Pediatrik Hematoloji Laboratuvarında bulunan Harrier 15-80 Sanyo MFE Santrifüj; Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (A.B.D.)'nda bulunan Micro 22R Heptich Santrifüj O.M.Ü Fen-Edb. Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji A.B.D.'da bulunan Jenway

6105 UV-VİS Spektrometre, Jenway 3010 pHmetre, Fissan Whirlimixer Chitren Hotplate, Magnetic stirrer, H S 31 Sanyo ultra low derin dondurucu kullanılmıştır.

3.4. Hemolizat Hazırlanması

Her iki gruptaki hastalara tedavi öncesi, tedavinin 2., 8., 12. ve 24. saatinde ve tedavi sonrası 1. günde antioksidan enzim ölçümü için venöz kan örnekleri alındı.

Hemolizat hazırlanmasında Guemouri ve ark. (1991)'nin yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır.

Alınan 4 cc EDTA'lı kan örnekleri 10 dakika 4000 rpm'de santrifüj edildi. Plazma ayrı tüplere alındı. Tüpün dip kısmındaki hücreler üzerine 4 ml steril serum fizyolojik (% 0.9'luk NaCl) ilave edilerek homojen hale gelmesi için karıştırıldı ve 10 dakika 4000 rpm'de santrifüj edildi. Dökelti bir plastik pipet yardımıyla ayrıldı. Çökelti üzerine 4 ml serum fizyolojik ilave edilerek santrifüj işlemi 2 kere daha tekrarlandı ve saf eritrosit eldesi sağlandı. Daha sonra örnekler -70°C 'de saklandı.

Buzluktan çıkarılan örnekler oda ısısında çözüldü. Eritrositler üzerine 3 ml bidistile su konuldu ve 10 dakika vortexlendi ve eritrositlerin tamamen hemoliz olması sağlandı. Örnekler 15000 rpm'de 15 dakika soğutmalı olarak santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst kısımdaki süpernatant kısım biyokimyasal hesaplamalarda kullanılmak üzere ayrıldı.

Süpernatantlar kullanılacağı zaman 1/10000 oranında bidistile su ile sulandırılmıştır.

Örneklerin protein tayinleri süpernatantlarda Lowry ve arkadaşları (1951) yöntemine göre yapıldı.

3.5. Katalaz Aktivite Tayini

Katalaz aktivite tayini Lück (1963)'ün yönteminden yararlanılarak yapılmıştır.

Katalaz aktivite tayini için pH:7'de 1/15 M'lık $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}-\text{KH}_2\text{PO}_4$ tamponu hazırlandı.

1. Her aktivite ölçümünde Na-K tamponunun 100 mlt'sine 160 μlt (0.16 mlt) H_2O_2 koyuldu (A karışımı).
2. Kör tüp spektrofotometre tüpüne 3 mlt Na-K tamponu ve 50 μlt süpernatant ilave edilerek hazırlandı ve spektrofotometre 240 nm dalga boyunda sıfırlandı.
3. Spektrofotometre tüpüne 3 mlt A karışımı ilave edip köre karşı optik dansite (OD) okundu (Bu değer tüpte bulunan H_2O_2 'yi gösterir)
4. Kontrol tüpünü köre karşı okuduktan sonra üzerine 50 μlt süpernatant ilave edildi.
5. Hızlı bir şekilde karıştırıldı.

6. 240 nm'de 2 dakika 30 sn aralıklarla absorbans okundu. Absorbans okunduktan sonra ml'deki enzim ünite sayısı Lück (1963) yöntemiyle hesaplanmıştır.

Bir ünite katalaz aktivitesi bir dakikada 1µmol H₂O₂ parçalanmasını katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanır.

Aktivite aşağıdaki formülden yararlanılarak hesaplanır.

$$C = \frac{\text{Örnek } \Delta OD \times 2 \text{ (dakika)} \times 1000}{0.036 \times \mu\text{lt süpernatant}} \quad / \text{ Lowry } \mu\text{mol/mg total protein}$$

3.6. Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini

SOD aktivite tayini için McCord ve Fridovich (1969) ve Flohe ve Otting (1984)'in metotlarından yararlanılmıştır.

A ÇÖZELTİSİ:

0.76 mg (5µmol) ksantin 10 ml 0.001 N NaOH içindeki çözeltisi ve 24.8 mg (2µmol) sitokrom c'nin 100 ml 50 mM pH:7.8 ve 0.1 M EDTA içeren fosfat tamponundaki çözeltisi karıştırıldı (Bu çözelti +4 °C'de 3 gün kararlıdır).

B ÇÖZELTİSİ:

Taze hazırlanan ksantin oksidaz'ın 0.1 Mm EDTA'daki çözeltisi. (0.2 u/ml)

Yöntem

1. Spektrofotometre tüpüne 3 ml distile su koyularak kör tüp olarak kullanıldı.
2. Spektrofotometre kör tüpe karşı sıfırlandı. .
3. Kontrol tüpü için spektrofotometre küvetine 2.9 ml A çözeltisi koyuldu.
4. Üzerine 50 µl örnek koyuldu.
5. 100 µl B çözeltisinin koyulmasıyla reaksiyon başlatıldı.
6. Hızlı bir şekilde karıştırılıp 550 nm'de 2 dakika 30 sn aralıklarla absorbans değişimi okundu.
7. Kontrol tüpü için örnek yerine 50 µl distile su eklendi ve köre karşı 2 dak. boyunca 30 sn aralıklarla absorbans okundu.
8. Örneklerin değerlendirme işlemi kontrol tüpüne göre yapıldı.
9. Kalibrasyon grafiği çizmek için belli konsantrasyondaki ($5 \cdot 10^{-7}$ M) SOD çözeltisinin 5 µl, 10 µl ve 15 µl'deki bilinen değerlerine karşılık elde edilen % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi. Bu işlem için saf SOD enzimi kullanıldı.

SOD aktivitesi sitokrom c'nin % inhibisyonu olarak ifade edilmiş ve aktivite aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

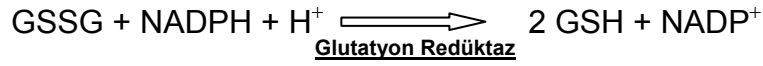
Inhibisyon değeri:

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{\text{Konulan örnek } \Delta\text{OD}}{\text{Blank } \Delta\text{OD}} \times 100$$

SOD'un bir ünitesi Xanthine/Xanthine Oxidase sistemi tarafından meydana getirilen süperoksit anyonu ile sitokrom c'nin redüksiyonunun inhibisyonunun %50'si için gerekli enzim miktarı olarak belirlenir. 550 nm'de spektrofotometrik olarak izlenir.

3.7. Glutasyon Peroksidaz Aktivite Tayini

Glutasyon peroksidaz aktivite tayini için Lawrence and Burk (1976)'un yöntemi kullanıldı. Glutasyon peroksidaz glutasyonun kümene hidrojen peroksit ile olan reaksiyonunu katalizler.



Reaksiyon ortamında bulunan glutasyon redüktaz ve NADPH kofaktörlüğünde okside glutasyon (GSSG)'un redükte glutasyon (GSH)'a dönüşümü sırasında NADPH, NADP⁺ şeklinde okside olur. Bu oksidasyon sırasında absorbanstaki azalma spektrofotometrik olarak 340 nm'de okundu ve glutasyon peroksidaz aktivitesi olarak ifade edildi.

Reaksiyon karışımı:

50 mM potasyum fosfat tamponu (pH:7)

1 mM EDTA

0.2 mM NADPH

1 mM NaN₃

1 E.U/ml Glutasyon Redüktaz

1 mM GSH'dan oluşan bir reaktif karışımı hazırlandı.

KÖR TÜP: Yukarıda belirtilen karışım içine 0.1 ml distile su koyuldu. Üzerine 10µl kümene hidrojen peroksit ilave edilerek 340 nm'de 5 dakika boyunca 30 sn aralıklarla absorbanstaki değişimi okundu.

ÖRNEK TÜP: Yukarıdaki karışımın içerisine 100 µl enzim kaynağı (süpernatant) koyularak 37 °C'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra üzerine 10 µl 1.5 mM kümene hidrojen peroksit ilave edilerek 5 dakika boyunca 30 sn aralıklarla 340 nm'deki absorbanstaki değişimi kaydedildi.

Aktivite, dakikada µmol NADPH'ın oksidasyonu olarak ifade edildi. Örnek tüplerin değerlendirilmesi kör tüpe göre yapıldı.

Protein miktarları Lowry ve arkadaşları (1951)'nin metodu ile yapıldı.

3.8. İstatistiksel Analiz

Sürekli değişkenler ortalama \pm standart hata, sürekli olmayan değişkenler oran olarak ifade edildi. Sürekli olmayan değişkenlerin iki grup arasında karşılaştırılması ki-kare testiyle yapıldı. Sürekli değişkenlerin iki grup arasındaki dağılımı Shapiro Wilks testi ile araştırıldı. Buna göre homojen dağılım göstermeyen değişkenlere logaritmik dönüştürme uygulandı. Sürekli değişkenlerin iki grup arasındaki karşılaştırması student t testi ile yapıldı. Antioksidan enzim aktivite değerlerinin gruplar içinde zaman göre farklılığı Friedman testi ile araştırıldı. Buna göre fark olması durumunda ikili karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltilmeli Wilcoxon testi kullanıldı. Sayısal veriler arasındaki ilişki iki yönlü olarak Pearson ve Spearman testi ile araştırıldı. $p < 0.01$ değerinin anlamlı kabul edildiği Bonferroni düzeltilmeli Wilcoxon testi hariç, p değerlerinin < 0.05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. $p < 0.05$ olması anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analiz "Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 10.0 programı" ile yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Gruplarının Klinik Özellikleri

Çalışmaya alınan hastaların yaş, cinsiyet, risk faktörleri ve kalp yetersizliği nedeniyle kullanmakta olduğu ilaçlar her iki grup arasında benzerlik gösteriyordu. ($p>0.05$) (**Tablo 7**)

Tablo 7: Çalışma gruplarının temel klinik karakteristikleri

Özellik	GİK (n=28)	KONTROL (n=13)	p
Yaş (yıl)	67.3±1.5	61.8±3.2	0.201
Erkek cinsiyet, sayı (%)	21 (75)	7 (53)	0.208
Sigara içenler, sayı (%)	4 (14)	2 (15)	0.757
Hipertansiyon, sayı (%)	8 (28)	2 (15)	0.609
Kullanılan ilaçlar			
ASA (%)	92.9	100.0	0.538
ACE inhibitörü (%)	100.0	100.0	1.000
Spironolakton (%)	96.4	80.4	0.156
Furosemid (%)	96.4	98.0	0.767
Dijital (%)	66.7	80.4	0.555
IV inotropik (%)	23.1	20.7	0.880
Beta bloker (%)	32.3	41.3	0.467
Nitrat (%)	23.2	61.4	0.084

ASA: Asetil salisilik asit, ACE: Anjiyotensin dönüştürücü enzim, IV: İntravenöz

Çalışmaya alınan hastaların başlangıçtaki kalp hızı, sistolik ve diastolik kan basınçlarından oluşan hemodinamik göstergeleriyle, kan glukozu ve potasyum düzeylerinden oluşan biyokimyasal göstergeleri GİK ve kontrol grubu arasında benzerdi ($p>0.05$). 24 saatlik GİK veya NaCl infüzyonunun bitiminden 24 saat sonra (48. saatte) bu hemodinamik ve biyokimyasal göstergelerde hem GİK hem de kontrol grubunda anlamlı değişiklik olmadı ($p>0.05$).

Hastaların ekokardiyografik olarak sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu ile belirlenen sistolik fonksiyonları GİK ve kontrol grubu arasında benzerdi. Yine sol ventrikül sistol ve diastol sonu çapları her iki grup arasında benzerdi ($p>0.05$). İnfüzyon sonrası sol ventrikül çap ve fonksiyonunda bazal değerlere göre hem GİK hem de kontrol grubunda anlamlı

değişiklik gözlenmedi ($p>0.05$). Yine tedavi sonrasındaki değerler her iki grup arasında benzerdi ($p>0.05$). (**Tablo 8**)

Tablo 8: Grupların tedavi öncesi ve sonrası hemodinamik, ekokardiyografik ve biyokimyasal göstergelerinin karşılaştırılması

	GİK (n=28)		KONTROL (n=13)	
	Bazal	48. Saat	Bazal	48. Saat
Ejeksiyon Fraksiyonu (%)	29.8±1.2	32.7±2.3	30.4±2.9	29.5±1.27
LVEDD (mm)	64.1±2.2	64.8±2.0	67.6±4.0	67.0±5.1
LVESD (mm)	56.1±2.2	55.4±1.8	57.8±4.3	55.7±5.1
Kalp hızı (atım/dk)	80.7±2.2	80.3±2.0	74.4±3.9	73.6±2.7
Sistolik kan basıncı (mmHg)	111.9±3.3	109.9±2.1	115.0±2.6	118.0±3.0
Diastolik kan basıncı (mmHg)	67.3±1.4	64.7±1.1	67.2±1.7	66.0±2.4
Glukoz (mg/dl)	111.2±4.1	108.3±5.7	104.8±7.1	109.6±8.5
Potasyum (mEq/L)	4.1±0.1	4.0±0.1	4.3±0.2	4.0±0.1

LVEDD: Sol ventrikül diastol sonu çapı, LVESD: Sol ventrikül sistol sonu çapı

4.2. GİK ve Kontrol Grubunda Eritrosit SOD Aktivite Değişimi

GİK verilen grupta, bazalde (0. Saat), tedavi süresince ve tedavi sonrasında ölçülen SOD değerleri farklılık gösteriyordu ($p=0.031$). Buna göre; 24. saatte ölçülen SOD değerlerinin 0. ($p=0.002$), 2. ($p=0.007$) ve 8. saatteki ($p=0.009$) değerlerle karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttığı gözlemlendi. Yine 48. saatte ölçülen SOD değerleri 0 ($p=0.0003$), 2 ($p=0.001$) ve 8. saatteki ($p=0.005$) değerlerle karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek saptandı.

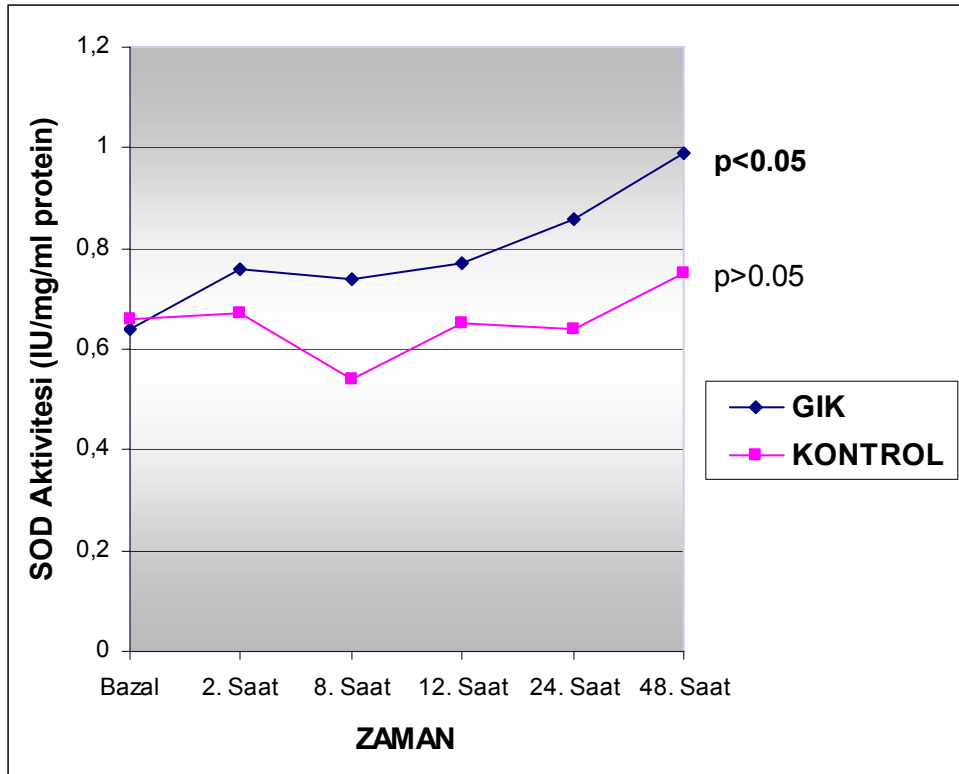
Kontrol grubunda ise bazalde, tedavi süresince ve tedavi sonrasında ölçülen SOD değerleri istatistiksel olarak benzerlik göstermekteydi ($p=0.291$).

GİK ve kontrol grubunun 0., 2., 8., 12., 24. ve 48. saatte ölçülen SOD değerlerinin ayrı ayrı iki grup arasındaki karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (hepsi için $p>0.05$). SOD değerlerinin gruplar arasında ve zamana göre dağılımı **Tablo 9 ve Şekil 10**'da verilmiştir.

Tablo 9: GİK ve kontrol grubunun zamana göre süperoksit dismutaz aktivitesi değerleri

	GİK (n=28)	KONTROL (n=13)	p değeri
0. saat	0.64±0.12	0.66±0.08	0.937
2. saat	0.76±0.17	0.67±0.09	0.738
8. saat	0.74±0.11	0.54±0.08	0.273
12. saat	0.77±0.14	0.65±0.05	0.430
24. saat	0.86±0.14 ^{&}	0.64±0.05	0.180
48. saat	0.99±0.17 ^{&}	0.75±0.05	0.209

[&] : Bonferroni düzeltilmeli Wilcoxon testine göre 0., 2. ve 8. saatteki değerlerle karşılaştırıldığında fark anlamlı ($p<0.01$)



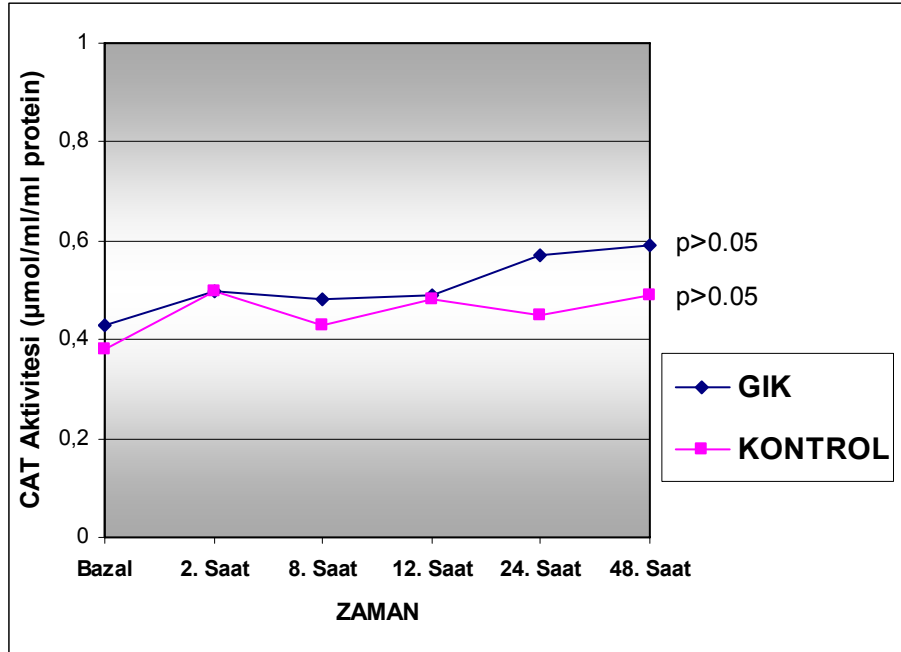
Şekil 10: GİK ve Kontrol gruplarında SOD aktivitesinin zaman göre değişimi

4.3. GİK ve Kontrol Grubunda Eritrosit Katalaz Aktivite Değişimi

CAT aktivitesi açısından bakıldığında, GİK verilen grupta, 0. saatteki değerlere göre tedavi süresince ve tedavi sonrasındaki CAT değerlerinde artış eğilimi vardı. Ancak değerler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.094$). Kontrol grubunda da bazalde, tedavi süresince ve tedavi sonrasında ölçülen SOD değerleri benzerlik göstermekteydi ($p=0.856$). GİK ve kontrol grubunun 0., 2., 8., 12., 24. ve 48. saatte ölçülen CAT değerlerinin ayrı ayrı iki grup arasındaki karşılaştırılmasında yine anlamlı farklılık saptanmadı (hepsi için $p>0.05$). CAT değerlerinin gruplar arasında ve zamana göre dağılımı **Tablo 10 ve Şekil 11**'de verilmiştir.

Tablo 10: GİK ve kontrol grubunun zamana göre katalaz aktivitesi değerleri

	GİK (n=28)	KONTROL (n=13)	p değeri
0. saat	0.43±0.04	0.38±0.05	0.554
2. saat	0.50±0.07	0.50±0.06	0.999
8. saat	0.48±0.06	0.43±0.10	0.701
12. saat	0.49±0.07	0.48±0.07	0.934
24. saat	0.57±0.05	0.45±0.05	0.207
48. saat	0.59±0.04	0.49±0.06	0.170



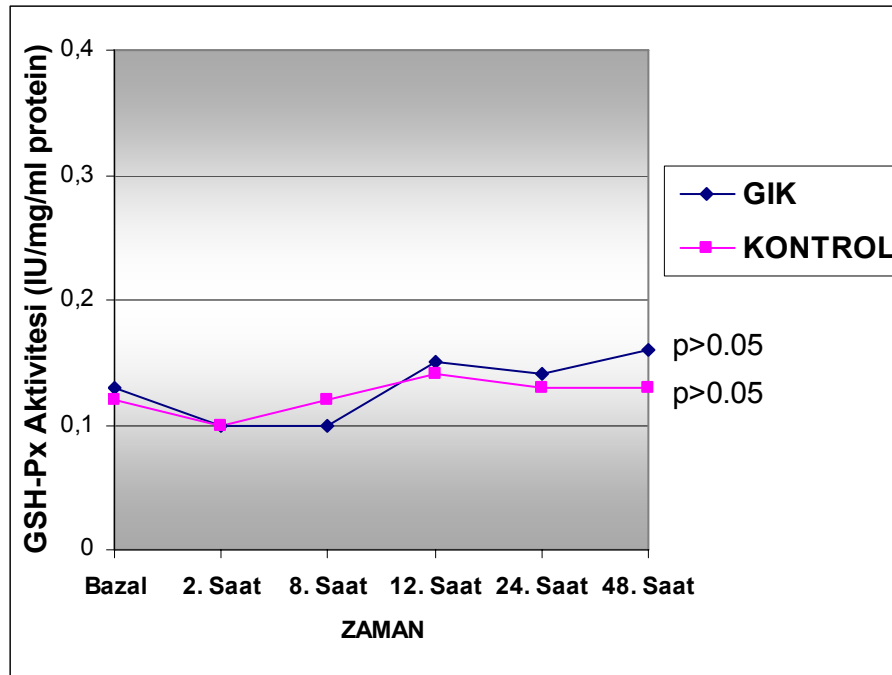
Şekil 11: GİK ve Kontrol gruplarında CAT aktivitesinin zaman göre değişimi

4.4. GİK ve Kontrol Grubunda Eritrosit GSHPx Aktivite Değişimi

Son olarak diğer bir antioksidan enzim olan GSHPx aktivitesi açısından bakıldığında, hem GİK hem de kontrol grubunda bazalde, tedavi süresince ve tedavi sonrasında ölçülen GSHPx değerleri benzerlik göstermekteydi (p değerleri sırasıyla 0.559 ve 0.936). Yine GİK ve kontrol grubunun 0., 2., 8., 12., 24. ve 48. saatte ölçülen GSHPx değerlerinin ayrı ayrı iki grup arasındaki karşılaştırılmasında anlamlı fark yoktu (hepsi için $p > 0.05$). GSHPx değerlerinin gruplar arasında ve zamana göre dağılımı **Tablo 11** ve **Şekil 12**'de verilmiştir.

Tablo 11: GİK ve kontrol grubunun zamana göre glutatyon peroksidaz aktivitesi değerleri

	GİK (n=28)	KONTROL (n=13)	p değeri
0. saat	0.13±0.05	0.12±0.04	0.931
2. saat	0.10±0.02	0.10±0.02	0.909
8. saat	0.10±0.01	0.12±0.01	0.682
12. saat	0.15±0.04	0.14±0.02	0.843
24. saat	0.14±0.05	0.13±0.05	0.905
48. saat	0.16±0.03	0.13±0.05	0.721



Şekil 12: GİK ve Kontrol gruplarında GSHPx aktivitesinin zaman göre değişimi

4.5. Eritrosit Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Kalp Yetersizliğinin Ağırlığıyla İlişkisi

Çalışmamızda son olarak kalp yetersizliğinin ağırlığıyla oksidatif stres ilişkisi araştırmak amacıyla hastaları EF < % 25 ve EF ≥ % 25 olmak üzere 2 gruba ayırdık. EF'si çok düşük olan hastaların SOD, CAT ve GSHPx aktiviteleri EF ≥ % 25 olan hastalara göre anlamlı derecede daha düşük saptandı (p değerleri sırasıyla 0.035, 0.025 ve 0.019). (**Tablo 12**)

Tablo 12: Sol ventrikül EF'ye göre bazal antioksidan enzim düzeylerinin karşılaştırılması

	EF < 25 (n=23)	EF ≥ 25 (n=18)	p değeri
SOD	0.44±0.05	0.96±0.18	0.035
CAT	0.36±0.04	0.52±0.04	0.025
GSHPx	0.04±0.007	0.25±0.08	0.019

Korelasyon analizinde tüm bu enzimlerin sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu ile düşük fakat anlamlı derecede ilişkili olduğu gözlemlendi (p<0.05).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Moleküler oksijenin indirgenmesi veya uyarılması sonucu serbest oksijen radikalleri oluşmaktadır. Fizyolojik şartlarda mitokondriyal elektron transport zincirinden, patolojik süreçlerde ksantin oksidaz metabolizmasından, aktive olmuş nötrofillerden, katekolamin oksidasyonundan, endotel hücrelerinden ve prostaglandinlerden serbest radikaller üretilmektedir (Kukreja ve ark., 1986).

Oksijen radikalleri doymamış (ansatüre) lipidlerle reaksiyon ve membranlardaki lipid peroksidasyon reaksiyonlarının başlamasına yatkınlık oluşturmaktadır. Serbest radikaller bunun yanında, proteinlerdeki sülfidril gruplarının ve nükleik asitlerdeki iplikçiklerin oksidasyonuna neden olur. Yapılan tüm ex vivo ve in vivo çalışmalar, önemli birçok kalp hastalığının patogenezinde artmış serbest oksijen radikallerinin önemini ortaya koymuştur (Singal ve ark., 1983; Hess ve ark., 1983).

Kalp hastalıklarında, artmış serbest oksijen radikallerinin olumsuz etkileri; hücre içi antioksidanlar (SOD, CAT, GSHPx ve GSH-redüktaz gibi), lipolitik ve proteolitik enzimlerden oluşan miyokardiyal savunmayla engellenmeye çalışılır. Bu antioksidan savunma mekanizmalarındaki yetersizlik veya serbest radikallerin fazlalığı oksidatif stresi yansıtır ki bu da birçok kalp hastalığının gelişmesinde ana faktörlerdendir.

Oksidatif stresin önemi olduğu en önemli kalp hastalıklarından bir kontraktıl fonksiyonundaki bozulmanın neden olduğu kalp yetersizliğidir. Dilate kardiyomyopati, kalp yetersizliği nedeniyle sıklıkla hastanede yatış gerektiren ve yaşam beklentisi tüm etkili tedavi yöntemlerine rağmen düşük olan ilerleyici bir hastalıktır. Bu hastalıkta ana sorun kalp boşluklarında dilatasyonla birlikte, azalmış miyokardiyal kasılmadır (sistolik disfonksiyon). Miyokardiyal kasılmanın göstergesi olan ejeksiyon fraksiyonunda düşme kardiyomyopatide kötü prognozun en önemli belirleyicisidir. Yine önemli diğer bir konu, oksidatif stresin artışının bu hastalarda kontraktıl fonksiyonlarda daha fazla azalmaya yol açmasıdır (Gupta ve Singal, 1989; Burton ve ark., 1984).

Çalışmamızda, sol ventrikül EF ve oksidatif stres ilişkisini ortaya koymak amacıyla, hastaları ejeksiyon fraksiyonu $EF < \% 25$ ve $EF \geq \% 25$ olmak üzere 2 gruba ayırdık. EF'si çok düşük olan hastaların SOD, CAT ve GSHPx aktivitelerinin, $EF \geq \% 25$ olan hastalara göre anlamlı derecede daha düşük olduğunu saptadık. Dahası, korelasyon analizinde oksidatif stresi göstermek amacıyla kullandığımız bu üç antioksidan enzim aktivitesinin sol ventrikül EF ile pozitif yönde ilişkisi olduğunu gösterdik.

Bu konuyla ilgili olarak, Sezgin ve ark.ları (2004) sınır EF değeri olarak $\% 35$ belirledikleri ve daha hafif kalp yetersizliği olan hastaları aldıkları çalışmalarında benzer sonuçlar bulmuşlardır. Yine Hill ve ark.ları (1996) sıçanlarda yaptıkları deneysel bir çalışmada koroner ligasyondan sonra sol ventrikül pik sistolik basınç ve sol ventrikül

diyastolik sonu basınçlara göre hafif, orta ve ağır kalp yetersizliği belirledikleri sıçanlarda antioksidan enzim düzeylerini çalışmışlar ve CAT ile GSHPx seviyelerinde progresif bir düşüş belirlemişlerdir. Süperoksit dismutaz seviyesinde ise hafif ve orta yetersizlik durumunda değişiklik olmazken 16 hafta sonra anlamlı olarak düşüş gözlemişlerdir.

Antioksidan sistemin bu üç enzimi en az bir radikale hassas olduğundan dolayı, yüksek oksidatif stres durumunda bir çeşit inhibisyon meydana gelir. Örneğin, hidrojen peroksitin SOD enzimini inaktive ettiği gösterilmiştir (Pigeolet ve ark., 1990). Bu inaktivasyonun muhtemel bir mekanizması SOD'un serbest radikal oluşturan Fenton reaksiyonunda, demirin yerini alabilen bakır içerdiği için bu radikale hassas olduğudur. Bu enzimler aynı zamanda direkt veya dolaylı olarak birbirlerini inaktivasyondan da korurlar. Böylece radikallerin sürekli arttığı bir üretim hızı ile geri dönüşümsüz bir otokatalitik süreç ve hücre ölümü meydana gelir (Pigeolet ve ark., 1990).

Bu noktalardan yol çıkarak, bizim gözlemlerimiz ve diğer birçok çalışmaların verileri, kalp yetersizliğinin ağırlığına paralel olarak oksidatif stresin arttığını, bunun da hastalığın progresyonunda ve kötü prognozda önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Kalp yetersizliğinde önemli başka bir nokta, ilaç tedavisiyle hemodinamik fonksiyonu düzelen hastalarda antioksidan rezervde düzelme ve oksidatif strese azalma sağlanabilmesidir (Khaper ve Singal, 1997) Bu hasta grubunda tüm gelişen tedavi yöntemlerine rağmen mortalitenin halen yüksek olarak izlenmesi, hastalığın gelişmesinde ve ilerlemesinde rol oynayan patofizyolojik olayları düzeltmeye yönelik tedavileri öncelikli hale getirmiştir. Bu noktalardan ikisini metabolik bozukluklar ve nörohormonal aktivite oluşturmaktadır.

Uzun yıllardır GİK solüsyonu, etkin enerji kullanımı ve metabolik destek olarak kalp hastalıklarında alternatif tedaviler arasında yerini korumuş ve bununla ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır (Cottin ve ark., 2002; Tune ve ark., 1998; Alan ve ark., 2003; Yazıcı ve ark., 2004). Bununla birlikte, GİK tedavisinin oksidatif stres üzerine etkilerini araştıran az sayıda çalışma olup, bunlar daha çok akut miyokart infarktüsü hastalarda yapılmıştır (Díaz-Araya ve ark., 2002). Bizim çalışmamız kardiyomyopati hastalarda GİK tedavisinin oksidatif stres üzerine etkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

Çalışmamızda GİK verilen grupta, tedavinin sonunda ve tedaviden 24 saat sonra ölçülen SOD aktivitesinde bazal, 2 ve 8. saatle karşılaştırıldığında anlamlı derecede artış saptadık. CAT aktivitesinde de GİK grubunda tedavi sırasında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış vardı. Bununla birlikte GSHPx aktivitesinde tedavi süresince değişiklik gözlenmedi. Kontrol grubunda ise bu üç antioksidan düzeylerinde takip süresince değişiklik görülmedi. GİK grubunda, SOD aktivitesinde olduğu gibi CAT ve GSHPx aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı artış olmaması hasta sayımızın azlığına bağlı olabilir. Ancak

hastaların genetik farklılığı ve bilinmeyen spesifik etkenler diğer antioksidanlarda beklenen artışın olmamasını sağlayabilir (Nishizawa ve ark., 2004).

Glukoz alınımı ve glikolitik ATP üretimi özellikle kalpte azalmış koroner akımı olduğunda miyokart hücrelerinin yaşamını devam ettirmesi (viabilitesi) için önemlidir (King ve Opie, 1998). Birçok çalışmada GİK tedavisinin miyokart infarktüsünün erken dönemindeki hastalarda ve kalp cerrahisi sırasında faydalı etkileri gösterilmiştir (Lazar ve ark., 1995). Bunların yanında, son yıllarda kalp yetersizliğinde miyokart hücresinin etkin enerji kullanımını için metabolizmasını düzenlemek amacıyla verilen GİK tedavisinin sistolik fonksiyonlarını düzelttiğine dair çalışmalar vardır (Cottin ve ark., 2002; Tune ve ark., 1998; Alan ve ark., 2003; Yazıcı ve ark., 2004).

Kalp yetersizliği olan hastalarda insülinin tek başına, oksijen tüketimini artırmadan kontraktıl fonksiyonları iyileştirdiği ve bu etkinin oksijen yararlanımındaki artışa bağlı olduğu belirtilmiştir (Tune ve ark., 1998). İnsülin, miyokardiyal glukoz metabolizmasını uyarır ve yağ asiti metabolizmasını inhibe eder (Eberli ve ark., 1991). Ayrıca insülin uyarımına bağlı glikolitik akım, sarkoplazmik retikulum Ca ATP'az aktivitesini artırarak sarkoplazmik retikuluma Ca alınımını artırır. GİK infüzyonuna bağlı kontraktıl fonksiyonların iyileşmesinde, miyokart hücresi içine giren insülinin sarkoplazmik retikulum membranlarına bağlanarak sarkoplazmik retikulum Ca ATP'azını aktive etmesinin rolü olduğu bildirilmiştir (Gupta ve ark., 1989). Yapılan çalışmalarda, GİK infüzyonu ile iskemik kalp yetmezliği olan hastalarda kontraktıl fonksiyonların düzelmesi, GİK tedavisinin koroner kan akımında artış ve iskemik miyokartta metabolik koruyucu etkisi ile açıklanmıştır (Cottin ve ark., 2002; Sasso ve ark., 2000).

GİK infüzyonunun miyokart infarktüsünün (MI) akut fazında predominant enerji substratı olan serbest yağ asitlerinde bir azalmaya neden olduğu, bu etkinin uzun zincirli açıl CoA'nın birikiminin önlenmesi sonucu, serbest yağ asit metabolizmasının artmasına bağlı olduğu ileri sürülmüştür (Apstein ve Taegtmeyer, 1997; Eberli ve ark., 1991). Hem dilate kardiyomyopati de hem de akut miyokart infarktüsünde oksidatif stresin arttığı bilinmektedir (Hill ve Singal, 1996; Kaul ve ark., 1993). Bununla birlikte, akut miyokart infarktüslü hastalarda GİK tedavisinin metabolik aktiviteyi düzenleyerek oksidatif stresi azaltıp azaltmadığını araştırmaya yönelik çalışma olmakla birlikte (Díaz-Araya ve ark., 2002), dilate kardiyomyopatideki durum araştırılmamıştır.

İskemi, organa gelen kan akımının yetersizliği veya dokunun bozulmuş perfüzyonu olup, uzayan iskemi durumunda hücrelerin bütünlüğü kaybolup hücre sel ölüm oluşabilmektedir. Kardiyak dokudaki bozuk perfüzyon enerji yetersizliğine ve oksijenden yoksun miyokard dokusunun kontraktıl aktivitesinin kaybına yol açar. Etkilenen hücrelerde kardiyak metabolizma artıklarının birikmesi yanında sarkolemma boyunca iyon dengesi de bozular. Kardiyak hücrelerde iskeminin uzamasına bağlı olarak hücre bütünlüğü kaybolur ve

hücre ölümü gerçekleşir. Sitoplazmik proteinlerin aşırı salınımı hücre membranının geçirgenliğini kaybettiğini gösterir ve iskemik atak esnasında internal membranlarda ultrastrüktürel değişiklikler görülür (Kukreja ve ark., 1986). Miyokardiyal iskeminin sebebi ne olursa olsun sonuçları daima aynıdır: miyokardiyal yeterli oksijen ve metabolizmayı devam ettirmeye yetecek miktarda substrat ulaşamaz. İskeminin ilk dakikalarında glikolitik yol büyük ölçüde stimüle olur, fakat daha sonra doku asidozunun gelişmesi, NADH, sitrat ve laktat birikmesi sonucu glikolitik yol inhibe olur (Kukreja ve ark., 1986). Tüm bu olaylar sırasında, metabolik reaksiyonlardan açığa çıkan serbest radikaller eğer ortamda insülin yoksa veya insüline karşı direnç varsa kardiyomiyositlerde direkt toksik etkiler yapar. Bu toksik etkiler sonucu miyositlerin kontraktilitesinin azalmasının yanında, bu serbest oksijen radikallerin apoptozisi artırarak hücre hasarını daha da artırması göz önüne alındığında GİK infüzyonunun oksidatif stresi azaltması çok önemlidir (Wei ve Lee, 2002).

Çalışmamızın en önemli kısıtlılığı, bazı değerlerde beklenen istatistikî farklılığın ortaya çıkmasına engel olan hasta sayısının azlığıdır. Bunun yanında, oksidatif stresi ortaya koymak için kullandığımız antioksidan enzim aktivitesine ek olarak, ortamdaki serbest radikallerin ve lipid peroksidasyon ürünlerinin gösterilmesi çalışmamıza katkı sağlayabilirdi.

Sonuç olarak serbest oksijen radikalleri konjestif kalp yetersizliğinin başlangıcında ve devamında rol oynamaktadır. Serbest radikaller kalp kası fonksiyon bozukluğuna yol açarak, kardiyak fonksiyonlarda bozulmayı artırabilir. Dilate kardiyomiyopatili hastalarda standart tedaviye ek olarak GİK solüsyonunun verilmesi, miyokardiyal oksidatif stresi azaltarak metabolik anlamda düzelmeye sağlayabilir. Bu da, devam eden miyosit kaybını engelleyerek hastaların daha iyi klinik seyir izlemesinde katkı sağlayabilir. Ancak, GİK infüzyonunun bu hastalarda standart tedavi seçenekleri arasına girebilmesi için daha büyük ve ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

- Adalı M, 1998.** Hipertroidili hastalarda lipid peroksidasyonu ve antioksidan duruma propiltiourasil, propranolol ve vitamin E'nin etkisi. Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Eskişehir.
- Akkuş İ, 1995.** Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, 38, Kuzucular Ofset, Konya.
- Alan S, Ulgen MS, Dedeoglu I, Kaya H, Toprak N, 2003.** Long-term glucose insulin potassium infusion improves systolic and diastolic function in patients with chronic ischaemic cardiomyopathy. *Swiss Med Wkly*;133:419–422.
- Ambrosio G, Tritto I, 1999.** Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am Heart J*;138:S69-S75.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM, 1993.** Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90;7915-22.
- Apstein CS, Taegtmeyer H, 1997.** Glucose-insulin-potassium in acute myocardial infarction: the time has come for a large, prospective trial. *Circulation*;96:1074-7.
- Aral H, Türkmen S, 2002.** Oksidatif stres ve hastalıklarla ilişkisi. *Folia*;4:1-5.
- Bayraktutan U, Draper N, Lang D, Shah AM, 1998.** Expression of functional neutrophil-type NADPH oxidase in cultured rat coronary microvascular endothelial cells. *Cardiovasc Res*;38:256-62.
- Beswick RA, Dorrance AM, Leite R, et al., 2001.** NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension*.;38:1107–11.
- Bolli R, 1990.** Mechanisms of myocardial stunning. *Circulation*;82:723-38.
- Burton KP, McCord JM, Ghai G, 1984.** Myocardial alterations due to free radical generation. *Am J Physiol*;246:H776-H783.
- Clark IA, Cowden WB, Hunt NH, 1985.** Free radical-induced pathology. *Med Res Rev* 5(3):297-332.
- Cottin Y, Lhuillier I, Gilson L, et al., 2002.** Glucose insulin potassium infusion improves systolic function in patients with chronic ischemic cardiomyopathy. *Eur J Heart Failure*;4:181-4.
- Çakır M, 1997.** Aspirin ve vitamin E'nin farelerde (mus musculus) karaciğer total süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerine etkisi. Ondokuz Mayıs Üniv. Fen Bilimleri Ens. Yüksek Lisans Tezi, Samsun.
- Çebi A, 2001.** Karaciğerde detoksifikasyon. Yüksek lisans semineri.

Díaz-Araya G, Nettle D, Castro P, Miranda F, Greig D, Campos X, Chiong M, Nazzari C, Corbalán R, Lavandero S, 2002. Oxidative stress after reperfusion with primary coronary angioplasty: Lack of effect of glucose-insulin-potassium infusion. *Crit Care Med*;30:417–21.

Dieterich S, Bielick U, Beulich K, Hasenfuss G, Prestle J, 2000. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart. Increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation*;101:33-9.

Eberli FR, Weinberg EO, Grice WN, Horowitz GL, Apstein CS, 1991. Protective effect of increased glycolytic substrate against systolic and diastolic dysfunction and increased coronary resistance from prolonged global underperfusion and reperfusion in isolated rabbit hearts perfused with erythrocyte suspensions. *Circ Res*;68:466-81.

Engler R, Gilpin E, 1989. Can superoxide dismutase alter infarct size? *Circulation*;79:1137-42.

Fantone JC, Ward PA, 1982. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 107(3):395-418.

Fışkın K, Yeşilada Ö, Yılmaz İ, Hamamcı D, Şare M, Temel İ, 1995. The role of radical scavengers, reduced glutathione, in hepatic ischemia/reperfusion injury and the protective effects of allopurinol, superoxide dismutase, verapamil and vitamin E. *Tr J Biology* 19;129-136.

Flitter WD, 1993. Free radicals and myocardial reperfusion injury. *Br Med Bull*;49:545-55.

Flohe L, Otting F, 1984. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol*;105:93-104.

Fridovich I, 2001. Reflections of a fortunate biochemist. *J Biol Chem*;276:28629–36.

Gamble SC, Wiseman A, Goldfarb PS, 1997. Selenium dependent glutathione peroxidase and other selenoproteins: their synthesis and biochemical roles. *J Chem Tech Biotechnol*;68:123-34.

Griendling KK, FitzGerald GA, 2003. Oxidative stress and cardiovascular injury-Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of RAS. *Circulation*;108:1912-6.

Griendling KK, Sorescu D, Fukui MU, 2000. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*;86:494-501.

Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G, 1991. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem*;37(11):1932-7.

Gupta M, Singal PK, 1989. Time course of structure, function and metabolic changes due to an exogenous source of oxygen metabolites in rat hearts. *Can J Physiol Pharmacol*;67:1549-59.

Gupta MP, Lee S, Dhalla NS, 1989. Activation of heart sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -stimulated adenosine triphosphate by insulin. *J Pharmacol Exp Ther*;249:623-30.

Gutteridge JMC, 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*;41:1819-28.

Gümrükçüoğlu A, 2001. Serbest radikaller. Seminer

Haber F, Weiss JJ, 1934. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc Lond Ser* 147;332-351.

Halliwell B, 1987. Free radicals and metal ions in health and disease. *Proceeding of the Nutrition Society* 46;13-26.

Halliwell B, Arumoa OI, 1991. DNA damage by oxygen derived species. Its mechanisms and measurement in mammalian species.(letter) *FEBS*;281:9-19.

Halliwell B, Chirico S, 1993. Lipid peroxidation, its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr*;57(suppl 1):715-25.

Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H, 2003. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol*;91(suppl):7A-11A.

Heinecke JW, 2003. Oxidative stress: new approaches to diagnosis and prognosis in atherosclerosis. *Am J Cardiol*;91(suppl):12A-16A.

Hess ML, Krause S, Kontos HA, 1983. Mediation of sarcoplasmic reticulum disruption in the ischemic myocardium: proposed mechanism by the interaction of hydrogen ions and oxygen-free radicals. *Adv Exp Med Biol*;161:377-89.

Hill MF, Singal PK, 1996. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Am J Pathol*;148:291-300.

Houston M, Estevez A, Chumley P, Aslan M, Marklund S, Parks DA, Freeman BA, 1999. Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. Kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling. *J Biol Chem*;274:4985-94.

Irani K, 2000. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival. A review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res*;87:179–83.

İnan D, 1998. CuZnSOD, GSHPx ve TAS düzeylerinin, diyabetik vakalara verilen antioksidan tedavi sonrası değişimi. T.C. Sağlık Bakanlığı, Ankara.

Johnson RJ, Couser WG, Chi EY, Adler S, Klebanoff SJ, 1987. New mechanism for glomerular injury. Myeloperoxidase-hydrogen peroxide-halide system. *J Clin Invest* 79(5):1379-87.

Jun T, Ke-yan F, Catalano M, 1996. Increased superoxide anion production in humans: a possible mechanism for the pathogenesis of hypertension. *J Hum Hypertens*;10:305-9.

Kaul N, Siveski-Iliskovic N, Hill M, Slezak J, Singal PK, 1993. Free radicals and the heart. *J Pharmacol Toxicol Methods*;30:55-67.

- Keleş İ, 2002.** Serbest oksijen radikalleri ve kardiyovasküler sistem. İ.Ü. Kardiyoloji Enstitüsü Dergisi;2:38-43.
- Khaper N, Singal PK, 1997.** Effects of afterload reducing drugs on the pathogenesis of antioxidant changes and congestive heart failure in rats. *J Am Coll Cardiol*;29:856-61.
- Khoury VK, Haluska B, Prins J, Marwick TH, 2003.** Effects of glucose-insulin-potassium infusion on chronic ischemic left ventricular dysfunction. *Heart*;89:61-5.
- Kılınç K, 1985.** Oksijen radikalleri: Üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri. *Biyokimya Der*;10,2.
- Kilgore KS, Friedrichs GS, Johnson CR, et al., 1994.** Protective effects of SOD-mimetic SC-52608 against ischemia/reperfusion damage in the rabbit isolated heart. *J Mol Cell Cardiol*;26:995-1006.
- King LM, Opie LH, 1998.** Glucose delivery is a major determinant of glucose utilisation in the ischemic myocardium with a residual coronary flow. *Cardiovasc Res*;39:381-92.
- Kinugawa S, Tsutsui H, Hayashidani S, et al., 2000.** Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction in mice: role of oxidative stress. *Circ Res*;87:392–398.
- Kojda G, Harrison D, 1999.** Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovascular Res*;43:562-71.
- Ku DD, 1982.** Coronary vascular reactivity after acute myocardial ischemia. *Science*;218:576-8.
- Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF, 1986.** PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res*; 59:612-9.
- Kunsch C, Medford RM, 1999.** Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res*;85:753–66.
- Laurindo FR, Pedro Md, Barbeiro HV, Pileggi F, Carvalho MH, Augusto O, da Luz PL, 1994.** Vascular free radical release: ex vivo and in vivo evidence for a flow-dependent endothelial mechanism. *Circ Res*.;74:700 –709.
- Lawrence RA, Burk RF, 1976.** Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*;71(4):952-8.
- Lazar HL, Zhang X, Rivers S, Bernard S, Shemin RJ, 1995.** Limiting ischemic myocardial damage using glucose-insulin potassium solutions. *Ann Thorac Surg*;60:411-6.
- Lell WA, Nielsen VG, McGriffin DC, Schmidt FE, Kirklin JK, Stanley AW 2002.** Glucose-insulin-potassium infusion for myocardial protection during off-pump coronary artery surgery. *Ann Thorac Surg*;73:1246-52.

- Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Herman B 1997.** The mitochondrial permeability transition in toxic, hypoxic and reperfusion injury. *Mol Cell Biochem*;174:159-65.
- Lenda DM, Sauls BA, Boegehold MA, 2000.** Reactive oxygen species may contribute to reduced endothelium-dependent dilation in rats fed high salt. *Am J Physiol*;279:H7-H14.
- Lesnefsky EJ, Tandler B, Ye J, Slabe TJ, Turkaly J, Hoppel CL, 1997.** Myocardial ischemia decreases oxidative phosphorylation through cytochrome oxidase in subsarcolemmal mitochondria. *Am J Physiol*;273:H1554.
- Lowry OH, Rosebrough HJ, Farr AL, Randall RJ, 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*;193(1):265-75.
- Lucchesi BR, 1990.** Modulation of leucocyte-mediated myocardial reperfusion injury. *Ann Rev Physiol*;52:561-76.
- Lück H, 1963.** In *Methods of Enzymatic Analysis*. 2nd Edition. Bergmeyer, H. U. ed. pp.885-888. Verlag Chemie New York, Weinheim and Academic Press.
- McCord JM, Fridovich I, 1969.** Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem*;244(22):6049-55.
- Mehta JL, Nichols WW, Donnelly WH, et al., 1989.** Protection by superoxide dismutase from myocardial dysfunction and attenuation of vasodilator reserve after coronary occlusion and reperfusion in dog. *Circ Res*;65:1283-95.
- Milne BD, 1999.** Trace elements. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. *Tietz. Textbook of clinical chemistry*. W.B. Saunders Company 3th ed. Philadelphia;1043-4.
- Nakazano K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, Inoue M, 1991.** Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci USA*;88:10045-8.
- Nedeljkovic ZS, Gokce N, Loscalzo J, 2003.** Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction. *Postgrad Med J*;79:195–200.
- Neely JR, Whitmer JI and Rovetto MJ, 1975.** Effects of coronary blood flow on glycolytic flux and intracellular pH in isolated rat hearts. *Circ Res*; 37:733-741.
- Nishizawa T, Iwase M, Kanazawa H, et al., 2004.** Serial alterations of β -adrenergic signaling in dilated cardiomyopathic hamsters: possible role of myocardial oxidative stress. *Circ J*;68:1051–60.
- Oğuz M, 1990.** Oksijen radikalleri, Gazi Üniv. Tıp Fakültesi Dergisi 12;2.
- Pigeolet E, Corbisier P, Houbion DL, et al., 1990.** Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. Mechanism of ageing and development. *Mech Ageing Dev*; 51: 283-97.

Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, et al., 1996. Angiotensin II mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*;97:1916–23.

Rathaus M, Bernheim J, 2002. Oxygen species in the microvascular environment: regulation of vascular tone and the development of hypertension. *Nephrol Dial Transplant*;17:216-21.

Sasso FC, Carbonara O, Cozzolino D, Rambaldi P, Mansi L, Torella D, Gentile S, Turco S, Torella R, Salvatore T, 2000. Effects of insulin-glucose infusion on left ventricular function at rest and during dynamic exercise in healthy subjects and noninsulin dependent diabetic patients: a radionuclide ventriculographic study. *J Am Coll Cardiol*;36:219-26.

Sawyer DB, Colucci WS, 1998. Nitric oxide in the failing myocardium. *Cardiol Clin*;16:657-64.

Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS, et al, 2002. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol*;34:379–88.

Schnackenberg CG, Welch WJ, Wilcox CS, 1998. Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension*;32:59-64.

Sezgin N, Sezgin AT, Karabulut A, Topal E, Barutçu I, Gözükara EM, 2004. Miyokard Disfonksiyonu Olan Hastalarda Disfonksiyonun Derecesi ile Antioksidan Enzim Düzeylerinin Karşılaştırılması. *Anadolu Kardiyol Derg*;4:130-4

Singal PK, Beamish RE, Dhalla NS, 1983. Potential oxidative pathways of catecholamines in the formation of lipid peroxides and genesis of heart disease. *Adv Exp Med Biol*;161:391-401.

Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D, 1998. The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. *Cardiovasc Res*;40:426-32.

Stein G, Weiss J, 1950. Detection of free hydroxyl radicals by hydroxylation of aromatic compounds. *Nature*;166(4235):1104-5.

Stuehr D, Pou S, Rosen GM, 2001. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J Biol Chem*;276:14533-6.

Suzuki H, Swei A, Zweifach BW, Schmid-Schonbein GW, 1995. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats: hydroethidine microfluorography. *Hypertension*;25:1083-9.

Swei A, Lacy F, DeLano FA, Schmid-Schonbein GW, 1997. Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat. *Hypertension*;30:1628-33.

- Takeuchi N, Matsumiya K, Takahashi Y, Higashino K, Tanaka F, 1977.** Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and lipid metabolism in alpha-tocopherol deficient rats. *Exp Gerontol.*;12(1-2):63-8.
- Tarpey MM, Fridovich I, 2001.** Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ Res*;89:224-36.
- Tarr M, Valenzano DP, 1993.** Reactive oxygen-induced modification of cardiac electrophysiology: a comparison of the effects of Rose Bengal and other reactive oxygen generators. In: Tarr M, Samson F, eds. *Oxygen free radicals in tissue damage*. Boston: Brinkhauser:267-84.
- Tune JD, Mallet RT, Downey HF, 1998.** Insulin improves contractile function during moderate ischemia in canine left ventricle. *Am J Physiol*;274:1574–81.
- Ulker S, McMaster D, McKeown PP, Bayraktutan U, 2003.** Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation. *Cardiovasc Res*;59:488-500.
- Vanhoutte PM, 2001.** Endothelium-derived free radicals: for worse and for better. *J Clin Invest*;107:23-5.
- Wattanapitayakul SK, Bauer JA, 2001.** Oxidative pathways in cardiovascular disease: roles, mechanisms, and therapeutic implications. *Pharmacol Ther*;187-206.
- Wei YH, Lee HC, 2002.** Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med* 227:671–682,.
- Weiss JN, Goldhaber JI, Sen J, 1993.** Oxygen free radicals in the pathophysiology of myocardial ischemia/reperfusion. In: Tarr M, Samson F, eds. *Oxygen free radicals in tissue damage*. Boston: Brinkhauser:250-66.
- West NEJ, Guzik TJ, Black E, Channon KM, 2001.** Enhanced superoxide production in experimental venous bypass graft intimal hyperplasia: role of NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;21:189-94.
- Yazıcı M, Demircan S, Aksakal E, Soylu K, Şahin M, Sağkan O, 2004.** Kronik iskemik kalp yetersizliğinde glukoz-insülin-potasyum infüzyonunun endotelin-1 düzeyleri ve miyokart hasarına etkisi. *Türk Kardiyol Dern Arş*;32:91-9.
- Yucel D, Aydogdu S, Cehreli S, et al., 1998.** Increased oxidative stress in dilated cardiomyopathic heart failure. *Clin Chem*; 44: 148-54.
- Yurdakul Z, 2003.** Oksijen ve canlılar. Seminer.
- Zweier JL, Kuppasamy PA, Lutty GA,1988.** Measurement of endothelial cell free radical generation: evidence for a central mechanism of free radical injury in postischemic tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*;85:4046-50.

ÖZGEÇMİŞ

27.01.1979 tarihinde Almanya'nın Linz kentinde doğdum. İlkokulu Samsun Cumhuriyet İlkokulu, ortaokulu 23 Nisan İlköğretim Okulu, liseyi yabancı dil ağırlıklı Mithat Paşa Lisesi'nde okudum. 1997 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandım. 2001 yılında üniversite eğitimimi tamamladım. Aynı yıl O.M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans hakkı kazandım. 2002 şubat ayında yüksek lisans öğrenimine başladım. 2001 Aralık – 2004 Temmuz tarihleri arasında O.M.Ü. Pediatrik Hematoloji laboratuvarında biyolog olarak çalıştım. Evliyim, bir kızım var.