

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

İNTAKT VE ADRENALEKTOMİLİ SIÇANLARDA
KARRAGENİNLE OLUŞTURULAN İNFLAMASYONLU PENÇE
DOKUSUNDA OKSİDAN VE ANTİOKSİDAN PARAMETRELERİN
KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Tuba ÇANDAR

Danışmanı
Prof. Dr. Fatih AKÇAY

Doktora Tezi
Erzurum 2007

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
SUMMARY	VI
ŞEKİL İNDEKSİ	VIII
TABLO İNDEKSİ	IX
KISALTMALAR	X
1- GİRİŞ VE AMAÇ	1
2- GENEL BİLGİLER	4
2.1. İnflamasyon ve Fizyopatolojisi	4
2.1.1. Akut İnflamasyon	5
2.1.2. İnflamasyonun Kimyasal Mediatorleri	6
2.2. Adrenal Gland (Böbrek Üstü Bezi)	12
2.2.1. Adrenal Korteks Hormonları	14
2.2.1.1. Mineralokortikoidler	15
2.2.1.2. Glukokortikoidler	15
2.2.1.3. Androsteroidler	17
2.2.2. Adrenal Medulla Hormonları	17
2.2.3. Adrenal Gland ve İnflamasyon	18
2.3. Oksidatif Stres	19
2.3.1. Oksidatif Stresin Biyolojik Sistemlere Etkisi	22
2.3.2. Oksidatif Stres ve İnflamasyon	23
2.4. Antioksidan Savunma Mekanizmaları	25
2.4.1. Enzimler	27
2.4.1.1. Glutasyon Peroksidaz	28
2.4.1.2. Glutasyon S-Transferaz	29
2.4.1.3. Süperoksit Dismutaz	29
2.5. Myeloperksidaz	31
2.6. Nitrik Oksit	32
2.7. Malondialdehit	34
3- MATERYAL VE METOD	36
3.1. Deney Hayvanları	36

3.2. Deney Grupları ve Cerrahi Uygulama	36
3.3. Numunelerin Hazırlanması	37
3.4. Kullanılan Aletler ve Kimyasal Maddeler	37
3.5. Kimyasal Parametrelerin Tayini	40
3.5.1. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Tayini	40
3.5.2. Glutasyon S-Transferaz Aktivitesinin Tayini	42
3.5.3. Myeloperoksidaz Aktivitesinin Tayini	43
3.5.4. Cu/Zn Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Tayini	45
3.5.5. Nitrik Oksit Tayini	47
3.5.6. Malondialdehit Tayini	49
3.5.7. Dokuda Protein Tayini	50
4- VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ	52
5- BULGULAR	53
6- TARTIŞMA	63
7- KAYNAKLAR	71

TEŞEKKÜR

Bilgisi ve tecrübesi ile çalışmanın oluşturulmasında bana yol gösteren ve hoşgörüsünü esirgemeyen kıymetli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Fatih AKÇAY'a, öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Biyokimya Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ebubekir BAKAN'a, değerli hocalarım Prof. Dr. Yaşar Nuri ŞAHİN, Prof. Dr. Nuri BAKAN, Prof. Dr. Leyla YILDIZ, Prof. Dr. Ahmet KIZILTUNÇ, Doç. Dr. Hülya AKSOY, Doç. Dr. Zuhâl UMUDUM, Doç. Dr. Sait KELEŞ, Yrd. Doç. Dr. Abdülkadir YILDIRIM'a; deney aşamasında yardım ve desteklerini esirgemeyen Farmakoloji Ana Bilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Halis SÜLEYMAN, Yrd. Doç. Dr. Zekai HALICI'ya; eğitimimde emeği geçen Sayın Prof. Dr. Sevinç KUŞKAY'a şükranlarımı sunarım. Ayrıca eğitimim süresince desteğini esirgemeyen Dr. Berna DEMİRCAN'a, çalışmamın deney aşamasında desteklerini esirgemeyen Ana Bilim Dalımızdan Arş. Gör. Akar KARAKOÇ'a ve şahsında tüm diğer arkadaşlarıma ve Biyokimya Ana Bilim Dalı çalışanlarına; Farmakoloji Ana Bilim Dalından Arş. Gör. Elif ÇADIRCI'ya ve diğer arkadaşlarıma; öğrenimim süresince sabır, manevi destek ve katkılarını eksik etmeyen eşim B. Olcayto ÇANDAR ve "sevgili aileme" sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Tuba ŞAHAN ÇANDAR

ÖZET

Bu çalışmada, intakt ve adrenaletomize ratların, intakt ve karrageninle oluşturulmuş inflamasyonlu pençe dokularında oksidatif stres, antioksidan cevap ve inflamasyon parametreleri çalışıldı. Ayrıca adrenaletomize ratlarda prednisolon ve adrenalın suplementasyonunun bu parametreler üzerine etkileri de araştırıldı.

Deney hayvanları olarak ağırlıkları ortalama 195 ± 15 gr olan 37 adet Albino Wistar cinsi erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar altı farklı gruba ayrıldı; grup I (n=6): yalnızca adrenaletomili ratlar, grup II (n=7): adrenaletomize + karragenin verilen ratlar, grup III (n=7): adrenaletomize + prednisolon-karragenin verilen ratlar, grup IV (n=7): adrenaletomize + adrenalın-karragenin verilen ratlar, grup V (n=5): yalnızca karragenin verilen ratlar ve grup VI (n=5): intakt ratlar (kontrol grup). Karragenin bir inflamatuvar ajan olarak hayvanların pençelerine enjekte edildi. Bundan 4 saat sonra inflamasyon gelişti. Deneysel işlemlerin sonunda hayvanların pençe dokuları alındı, uygun tamponlara kondu ve daha sonra homojenize edildi. Bunlardan süpernatantlar elde edildi, biyokimyasal analiz gününe kadar -80°C 'de saklandı.

Malondialdehit ve nitrik oksit düzeyleri, miyeloperoksidaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon S-transferaz aktiviteleri ratların pençe dokularından elde edilen süpernatantlarda ölçüldü.

En yüksek ortalama malondialdehit ve nitrik oksit değerleri ve en düşük süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz değerleri grup II'de elde edildi. Prednisolon ve adrenalın, adrenaletomize + karragenin verilen hayvanlarda malondialdehit, nitrik oksit ve miyeloperoksidaz değerlerini belirgin olarak baskıladı, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon S-transferaz değerlerini artırdı.

Diğer yandan grup III ve IV arasında bu çalışılan oksidan ve antioksidan parametreler açısından belirgin bir fark yoktu.

Bu sonuçlar göstermiştir ki adrenalektomi, oksidan parametrelerde artışa, antioksidan parametrelerde azalmalara (özellikle grup II'de olduğu gibi) yol açmıştır. Adrenal gland hormonlarının (prednisolon ve adrenalinin) grup III ve IV'e verilmesiyle oksidan parametrelerde artışı ve antioksidan parametrelerde azalışı baskıladığı görülmüştür.

Bu bulgular, hem adrenalektomili hem de adrenalektomi + inflamasyonlu sıçanlarda adrenal gland hormonlarının antioksidan ve oksidan sistemlerde belirgin rollere sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Adrenalektomi, pençe ödemi, karragenin, oksidan ve antioksidan parametreler.

SUMMARY**THE COMPARISON OF OXIDANT AND ANTIOXIDANT PARAMETERS IN INFLAMMED PAW TISSUE FORMED BY CARRAGEENAN INJECTION IN INTACT AND ADRENALECTOMIZED RATS**

In this study, oxidative stress, antioxidant response and inflammation parameters were investigated in intact and carrageenan-inflamed paw tissues in intact and adrenalectomized rats. Additionally, the effects of prednisolone and adrenaline supplementation on these parameters in adrenalectomized rats were also investigated.

As experimental animals, 37 Albino Wistar male rats with a mean weight of 195 ± 15 gr were used. The animals were divided into six groups as follows: group I: (n=6) only adrenalectomized rats, group II (n=7): adrenalectomized + carrageenan-given rats, group III (n=7): adrenalectomized + prednisolone and carrageenan-given rats, group IV (n=7): adrenalectomized + adrenaline and carrageenan-given rats, group V (n=5): only carrageenan-given rats and group VI (n=5): intact rats (control group). Carrageenan was used as the inflammatory agent and was injected to the paws of the animals. Inflammation was developed in four hours after carrageenan injection. At the end of experimental procedures, the paw tissues of the animals were obtained and placed in suitable buffers and homogenised. The supernatants obtained were kept (at -80°C) for biochemical analyses.

Malondialdehyde and nitric oxide levels, myeloperoxidase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activities were measured in the supernatants obtained from paw tissues of the rats.

The highest mean malondialdehyde and nitric oxide values and the mean lowest superoxide dismutase and glutathione peroxidase values were determined in group II. It

was also observed that the administration of prednisolone (group III) and adrenaline (group IV) in adrenalectomized + carrageenan-given animals significantly suppressed malondialdehyde, nitric oxide and myeloperoxidase values and increased superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase values. On the other hand, there was not any significant difference between group III and IV in terms of the oxidant and antioxidant parameters studied.

These results reveal that adrenalectomy resulted in increases in oxidant parameters and decreases in antioxidant parameters, particularly in an inflammatory condition like in group II. Administration adrenal gland hormones (prednisolone and adrenaline) significantly suppressed the increases in oxidant parameters and decreases in antioxidant parameters in adrenalectomized + carrageenan-given rats.

These findings indicate that adrenal gland hormones might have significant roles in oxidant and antioxidant systems both in adrenalectomized and adrenalectomized + carrageenan-given rats.

Key Words: Adrenalectomy, paw edema, carrageenan, oxidant and antioxidant parameters.

ŞEKİL İNDEKSİ

Şekil 2.1. Bazı İnflamasyon Mediatorlerinin Oluşum Yolları Ve İlişkileri	9
Şekil 2.2. Böbrek Üstü Bezi Tabakaları	13
Şekil 2.3. Kortikal Hormonların Biyosentezine Genel Bakış	14
Şekil 2.4. Aktive Edilmiş Nötrofillerin Yaptığı Fagositik Solunum Patlaması Esnasında Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşması	24
Şekil 2.5. GPx Aracılığıyla Glutatyonun İnaktive Edilmesi	28
Şekil 2.6. Lipid Peroksidasyonu; Bir Serbest Radikal Zincir Tepkimesi	35
Şekil 3.1. Formazan oluşumu ve SOD ile inhibisyon	45
Şekil 5.1. MDA Ölçümlerinin Gruplara Göre Dağılımı	56
Şekil 5.2. NO Ölçümlerinin Gruplara Göre Dağılımı	57
Şekil 5.3. SOD Ölçümlerinin Gruplara Göre Dağılımı	58
Şekil 5.4. GPx Ölçümlerinin Gruplara Göre Dağılımı	58
Şekil 5.5. GST Ölçümlerinin Gruplara Göre Dağılımı	59
Şekil 5.6. MPO Ölçümlerinin Gruplara Göre Dağılımı	60

TABLO İNDEKSİ

Tablo 2.1. İnflamasyon Mediatorleri ve Etkileri	12
Tablo 2.2. Glukokortikoidlerin antiinflamatuvar etkileri	16
Tablo 2.3. Reaktif Oksijen Türleri	20
Tablo 2.4. Reaktif Oksijen Türlerinin Enzimatik Kaynakları	21
Tablo 2.5. Reaktif Oksijen Türlerinin Enzimatik Olmayan Kaynakları	22
Tablo 2.6. Antioksidanlara Genel Bakış	27
Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan Alet ve Cihaz Bilgileri	38
Tablo 3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	39
Tablo 3.3. GPx Çalışma Prosedürü	41
Tablo 3.4. GST Çalışma Prosedürü	42
Tablo 3.5. MPO Çalışma Prosedürü	44
Tablo 3.6. Cu/Zn SOD Çalışma Prosedürü	46
Tablo 3.7. NO Çalışma Prosedürü	48
Tablo.3.8. Peñçe Dokusunda MDA Çalışma Prosedürü	49
Tablo.3.9. Bradford Yöntemiyle Dokuda Protein Tayini	51
Tablo 5.1. Sıçan Peñçe Dokusuna Ait Ölçüm Değerleri Tablosu	54
Tablo 5.2. Gruplar Arası Fark / "p" Değerleri Tablosu	55
Tablo 5.3 Korelasyonlar	62

KISALTMALAR

NO: Nitrik Oksit

MPO: Miyeloperoksidaz

SOD: Süperoksit Dismutaz

CAT: Katalaz

GPx: Glutatyon Peroksidaz

MDA: Malondialdehit

LOX: Lipoksijenaz

AA: Araşidonik Asit

COX: Siklooksijenaz

TX: Tromboksan

PGI₂: Prostrasiklin

PG: Prostaglandin

LT: Lökotrien

TNF: Tümör Nekroz Faktör

IL: İnterlökin

ACTH: Adrenokortikotrop Hormon

CRH: Kortikotropin Salıverici Hormon

DHEA: Dehidroepiandrosteron

GSH: İndirgenmiş Glutatyon

GSSG: Okside Glutatyon

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

1-GİRİŞ VE AMAÇ

Herhangi bir atom veya molekülün dış orbitallerinde bir veya daha fazla paylaşılmamış elektronun bulunması, söz konusu kimyasal türün reaktivitesini artırır. Dış orbitallerinde paylaşılmamış elektron içeren bu türler radikal veya serbest radikal olarak isimlendirilir¹. Radikalin diğer maddelerden bir elektron kazanma eğilimi onu oldukça reaktif yapar. Bununla beraber tüm reaktif oksijen türleri serbest radikal değildirler².

Reaktif oksijen türleri, serbest oksijen radikalleri veya hücrelerde serbest radikallere kolayca çevrilen oksijen içeren bileşiklerdir (H_2O_2 gibi). Reaktif oksijen türleri hücrenin lipidleri, proteinleri ve DNA'sını ileri derecede tahrip ederler. Oksijen radikalleri yıkıcı harabiyet yapmaları yönünden serbest radikal nitrik oksit (NO) ve diğer reaktif oksijen türleri ile (örnek olarak hipokloröz asit) bağlantılıdır. Özellikle enfeksiyöz ajanlar ve diğer uyarılara yanıt olarak inflamasyonda, bağışıklık sisteminin fagositoz yapan hücreleri solunum patlaması adı verilen hızlı bir O_2 tüketimi gösterir. Bu olay süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^{\cdot}), hipokloröz asit (HOCl) ve reaktif azot-oksijen türlerinin ana kaynağı olarak kabul edilir. H_2O_2 'den HOCl oluşması sadece bağışıklık sisteminin fagositer hücrelerinde bulunan miyeloperoksidaz (MPO) enzimi ile katalizlenir³. İnflamasyonlu dokuda polimorfonükleer lökositler serbest oksijen radikalleri olan süperoksit anyonu ve hidroksil radikali'ni kontrolsüz şekilde aşırı miktarda üretirler^{4,5}.

Hücreler reaktif oksijen türleri ve diğer radikallerin yaptığı hasara karşı kendilerini, onarım olayları, savunma enzimleri ve serbest radikal süpürücüler denilen içsel ve dışsal antioksidanlar ile korur³. Enzimatik savunma süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimler ile yapılır⁶. SOD,

süperoksit serbest radikallerini uzaklaştırır. GPx, H₂O₂ ve lipid peroksidleri ortadan kaldırır³.

Oksidatif hasar, lipid peroksidasyon seviyelerinin ölçümü ile gösterilir⁷. Serbest oksijen radikalleri aracılığıyla oluşan lipid peroksidasyonu, hücre membran hasarının önemli bir nedenidir ve membran geçirgenliğini etkileyerek hücre içinde aşırı Ca⁺² birikmesine yol açar^{8,9}. Hücre membran disfonksiyonu da hücre şişmesi ve hücre ölümü ile sonuçlanır. Malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyonunda bir son üründür ve oksidatif hasarın düzeyini göstermede kullanılmaktadır¹⁰⁻¹².

Vücuttaki antioksidan savunma sistemleri homeostazisin sağlanıp korunmasında önem taşımaktadır. Benzer şekilde endokrin sistem de aynı görevi üstlenir. Bu sistemin bir parçası olan adrenal bez hem korteks hem medulla hormonları sayesinde bu görevin önemli bir parçasını oluşturur. Adrenal bez salgıları içsel ve dışsal uyarılarla kontrol edildikleri gibi kendileri de homeostazisin sağlanması için ortaya çıkan başka fonksiyonları etkilerler. Yapılan çalışmalarla, fiziksel ve emosyonel travma, ağır enfeksiyonlar, sepsis ve cerrahi girişimler gibi stres kaynağı bir çok durum üzerinde adrenal korteks salgılarının rolünün büyüklüğü gösterilmiştir¹³⁻¹⁵.

Bazı çalışmalarda inflamasyonlu dokularda glukokortikoid düzeyinin yükseldiği (inflamasyonu baskılamak üzere) ve inflamasyonda artmış olan NO üretiminin de glukokortikoidler tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir^{16,17}. Ayrıca glukokortikoidlerin, kortikosteroid reseptörleri bulunduran periferel dokularda antioksidan enzimler için düzenleyici bir faktör olduğu da yapılmış çalışmalarla gösterilmiştir^{18,19}. Çalışmamızda kullanacağımız bir lokal inflamatuvar ajan olan karrageninin, NO'nin periferel salınımını arttırdığı bir çalışmayla gösterilmiştir²⁰. Adrenaektomili sıçanlarda karrageninin oluşturduğu şiddetli inflamasyon hücre

membran hasarına yol açmış olabilir. Çünkü adrenaletomili hayvanlarda karragenin inflamasyonu intakt hayvanlara göre daha şiddetlidir²¹.

Adrenaletomili sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, subkutan glukokortikoid enjeksiyonunun beyin dokusunda antioksidan defans sistemini zayıflattığı, karaciğer dokusunda ise SOD aktvitesini arttırırken GPx aktivitelerini azalttığı gösterilmiştir²². Yine bir başka çalışmada da adrenomedullektomili sıçanların peritoneal makrofaj hücrelerinde, SOD ve GPx aktiviteleri ve H₂O₂ üretiminin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde düştüğü, bu düşüşün deksametazon verilen grupta daha az olduğu ifade edilmiş ve bu hücrelerde glukokortikoidler ve adrenalinin, antioksidan enzim aktivitelerini fizyolojik olarak kontrol edebileceği ifade edilmiştir²³.

Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamızda, adrenaletomi yapılan ve lokal inflamasyon oluşturulan sıçan pençesi dokusunda; inflamasyona etkisi olan, oksidan ve antioksidan parametrelerin karşılaştırılmasını; adrenaletominin ve lokal inflamasyonun oksidan ve antioksidan parametreler üzerindeki etkilerini; ayrıca haricen verilen glukokortikoid (prednisolon) ile adrenalinin bu parametreler üzerine etkilerini incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnflamasyon ve Fizyopatolojisi

İnflamasyon canlı dokuların her çeşit zedelenmeye karşı gösterdiği bir reaksiyondur⁴. İlk kez M.S. 1. y.y.'da yaşamış olan Celsus tarafından kızarıklık (color), ısı artışı (rubor), ağrı (dolor), ve şişme (tumor) ile karakterize, canlılığın bütünlüğünü sağlamaya yönelik bir olay olarak tanımlanmıştır^{2,4}.

İnflamasyon terimi zedelenme alanında vasküler, nörolojik, hümöral ve hücreyel yanıtları içerir⁴. İnflamasyon,

a- Lokal damarlarda vazodilatasyon ve buna bağlı lokal kan akımı artması,

b- Kapiller permeabilitenin artması ile interstisyel alana büyük miktarda sıvı sızıntısı,

c- Bu alanlara kapillerlerden çok miktarda fibrinojen ve öteki proteinlerin sızmasıyla çok kez sıvının pıhtılaşması ve

d- Hücrelerin şişmesiyle karakterizedir²⁴. Bu reaksiyonlara neden olan pek çok doku ürünüden bazıları şunlardır: Histamin, bradikinin, serotonin, prostaglandinler, kompleman sisteminin birçok ürünü ve lenfokinler. Vasküler kan akışı ve çapta değişiklikler doku hasarından hemen sonra başlar. Hasarın ardından nörojenik kaynaklı kısa süreli bir vazokonstrüksiyon ve devamında vazodilatasyon meydana gelir^{4,24-26}.

İnflamasyonun genişliği, genellikle doku hasarının derecesiyle orantılıdır²⁴. İnflamasyonla ilgili birden fazla sınıflama olsa da kabul gören inflamatuvar cevabın süresi göz önüne alınarak yapılan sınıflandırmadır. Buna göre inflamasyon akut ve kronik olmak üzere ikiye ayrılır^{27,28}.

Aşağıda akut inflamasyona deneyde oluşturulan model olması nedeniyle ayrıntılı olarak değinilecektir.

Kronik inflamasyon ya akut inflamasyonu izler ya da başlangıcından beri kroniktir. Kronik inflamasyonda haftalar ve aylarca süren zedeleyici uyarı sonucunda mononükleer hücre infiltrasyonu ve fibroblast proliferasyonuna yol açan bir proses vardır⁴. Kronik inflamasyonda persistan ağrı, şişme ve hücresel proliferasyon hakimdir^{27,29}.

2.1.1. Akut İnflamasyon

Akut inflamasyon zedeleyici etkene karşı birdenbire ve erken yanıtı içerir. Birkaç dakika ile birkaç gün içinde sonuçlanan göreceli bir süre mevcuttur^{4,30}. İnflamatuar cevabı başlatan uyaranlar çok çeşitlidir. Bunlar; mekanik travma, sıcak-soğuk-radyan enerji gibi fiziksel etmenler, elektriksel uyaranlar, kimyasal maddeler, enfeksiyöz ajanlar ve toksik ürünler, immün cevap ve iskemidir^{4,27-29,31}.

Akut inflamasyonun üç önemli bileşeni;

a- Kan akış hızı artımına yol açan vasküler çap değişiklikleri,

b- Mikro dolaşımda plazma proteinleri ve lökositlerin dolaşımdan çıkmasına olanak tanıyan yapısal değişiklikler ve

c- Lökositlerin zedelenme alanında birikimidir⁴. İnflamatuar cevapta en erken oluşan vazokonstriksiyon ve takiben arterioler kapiller yatak ve venüllerde oluşan vazodilatasyon bölgesel kan akımını artırarak intravasküler hidrostatik basınç yükselmesine neden olur^{25,26,32}. Bu sırada kapillerlerden doku aralığına bir sızıntı başlar. Ekstravasküler alanda ilk başlarda protein içeriği düşük ancak daha sonra artan ve lökosit de içeren “eksuda” adı verilen bir sıvı birikir^{4,28}. Zedelenme ciddiyetine bağlı olarak akut inflamasyon alanında ödem ve eksudasyon oluşma zaman ve hızı değişir. Bu dönemde inflamatuvar eksudanın doku aralığına birikmesi, iritan ve toksik maddelerin dilüe edilmesine, lökositlerin, antikorların ve kompleman faktörlerinin

inflamasyon alanına taşınmasına neden olur ve böylece inflamasyonlu bölgede hasar verici ajan izole edilerek nötralizasyonu sağlanır^{4,27,28,30}.

Zedelenme alanında nötrofil ve monositler inflamatuvar reaksiyonun en önemli yönünü oluştururlar. Lökosit kümelenmesi ve inflamasyon alanındaki etkilerini şu başlıklarda toplayabiliriz:

a- Marginasyon ve damar yüzeyine yayılma ki burada lökositler damar içinde perifere doğru yer değiştirerek vasküler endotelle karşı karşıya gelirler,

b- Adhezyon denilen aşamada endotele “selektin” adı verilen Ca^{+2} bağlayıcı transmembran proteinleri (integrinler) vasıtasıyla sıkı bir şekilde yapışırlar²,

c- Emigrasyon aşamasında lökositler endotel dışına göç ederler,

d- Kemotaksis ve fagositoz aşamasında ise ekstravasküler boşluğa çıkan lökositler hasarlı bölgede mikroorganizmaları öldürüp, nekrotik dokuları ve yabancı antijenleri parçalayıp, kimyasal mediatörleri ve oksijen radikallerini serbestleştirerek doku hasarına yol açarlar^{4,27,28,33-36}.

2.1.2. İnflamasyonun Kimyasal Mediatörleri

- 1- Vazoaktif aminler
- 2- Plazma proteazları
- 3- Araşidonik asit metabolitleri
- 4- Lökosit ürünleri (Lizozomal enzimler, sitokinler)
- 5- Diğer türler (Oksijen türevi serbest radikaller)

Vazoaktif Aminler

Vazoaktif aminlere örnek olarak histamini verebiliriz.

Histamin: Histamin, histidin aminoasitinin dekarboksilasyonu sonucu çeşitli organlarda özellikle de mast hücrelerinde oluşan bir amindir^{4,2,37}. Çeşitli uyaranlara

karşı yanıt olarak mast hücre degranülasyonu ile serbestleşir. Antijen-antikor kompleksi, travma, sıcaklık artışı, ilaçlar, toksinler ve kimyasal ajanlar histamin salınımına yol açarlar^{4,38}. Histaminazla inaktive olan histamin, barsaklar ve bronşlar gibi organların düz kaslarında H₁ reseptörlerine bağlanarak kasılmaya ve H₂ reseptörlerine bağlanarak mide salgısının artmasına yol açmaktadır^{4,37}. Histamin diğer α metil aminoasitler gibi vazodilatasyon etkisi nedeniyle antihipertansif etki gösterir².

Histamin damar dışındaki düz kasları nadiren gevşetir, genellikle kasar. Damarlardaki etkisi arteriol dilatasyonu ve venüllerde vasküler permeabilite artışıdır. Birdenbire vasküler permeabilite artışına yol açan venül endotel kontraksiyonu ve endoteller arası hücre bileşkelerinin genişlemesindeki temel mediatördür. Böylece inflamasyonda ekstrasvasküler alana plazma, protein ve sıvı sızmasını sağlar^{4,39,40}.

Cilt içine küçük dozda histamin enjeksiyonu “Lewis Üçlü Cevabı” adı verilen bir reaksiyonun oluşmasına neden olur. Buradaki inflamasyon patogenezi histamin tarafından damarların genişletilmesi, kapiller permeabilite artışı ve afferent sinir uçlarının stimüle edilmesine dayanır^{41,42}. Vasküler olaylardaki rolüne ek olarak histaminin eozinofiller için özgül kemotaktik olduğu bildirilmiştir⁴.

Plazma Proteazları

İnflamasyonda rol alan plazma bileşenleri üç grupta incelenir:

Kinin Sistemi: Bu sistemin aktivasyonu bradikinin oluşumuna yol açar. Bradikinin de histamine benzer şekilde vasküler permeabiliteyi artırır, arterioler dilatasyon yapar ve damar dışı düz kas kontraksiyonuna yol açar. Histaminden farklı olarak lökositler için kemotaktik değildir, fakat deriye enjekte edildiğinde ağrıya yol açarlar^{4,43,44}. Sıçanların ayak pençesine formalin enjekte edilerek oluşturulan inflamatuvar ağrı patogenezinde kininlerin rol oynadığı bilinmektedir⁴⁵.

Kininler etkilerini B₁ ve B₂ olarak adlandırılan iki tip reseptörle oluştururlar. B₁ reseptörleri doku hasarı ve inflamasyon gibi patolojik durumlarda indüklenir ve normal dokularda bulunmaz. B₂ reseptörleri afferent sinir sisteminde ve santral sinir sisteminde bulunur, ağrı reseptörlerinin duyarlılığını artırır^{43,46,47}.

Kompleman Sistemi: Kompleman sistemi bağışıklık ve inflamasyonda önemli rolleri olan plazma proteinlerini içerir. Pozitif akut faz proteinleri grubundadırlar. C1'den C9'a kadar numaralanan kompleman bileşenleri normalde plazmada inaktif haldedirler. Kompleman biyolojik işlevlerinde en kritik aşama C3'ün aktivasyonudur. Açığa çıkışı antijen antikor kompleksi tarafından klasik yol uyarımı ile ya da endotoksin gibi bakteriyel polisakkaritler veya insan IgA'sı ile uyarılarak alternatif yol uyarımı ile olur. Her iki yol da C3'ün ayrışmasından sonra ortak yol izler^{4,37,48,49}.

Kompleman türevi faktörler aşağıda sıralanan inflamasyonda rol alan çeşitli olguları etkiler:

a- Vasküler Olgu: Anafatoksin olarak adlandırılan C3a ve C5a mast hücrelerinde histamin serbestleştirerek vasküler permeabilite artışı ve vazodilatasyona yol açarlar. Ve artmış kan akımını daha da artırarak kapillerlerden dokuya protein sızmasını sağlarlar. C5a aynı zamanda nötrofil ve monositlerde araşidonik asit (AA) metabolizmasındaki lipoksijenaz (LOX) yolunu uyararak inflamasyonun başka mediatörlerinin yapımına ve serbestleşmesine yol açarlar.

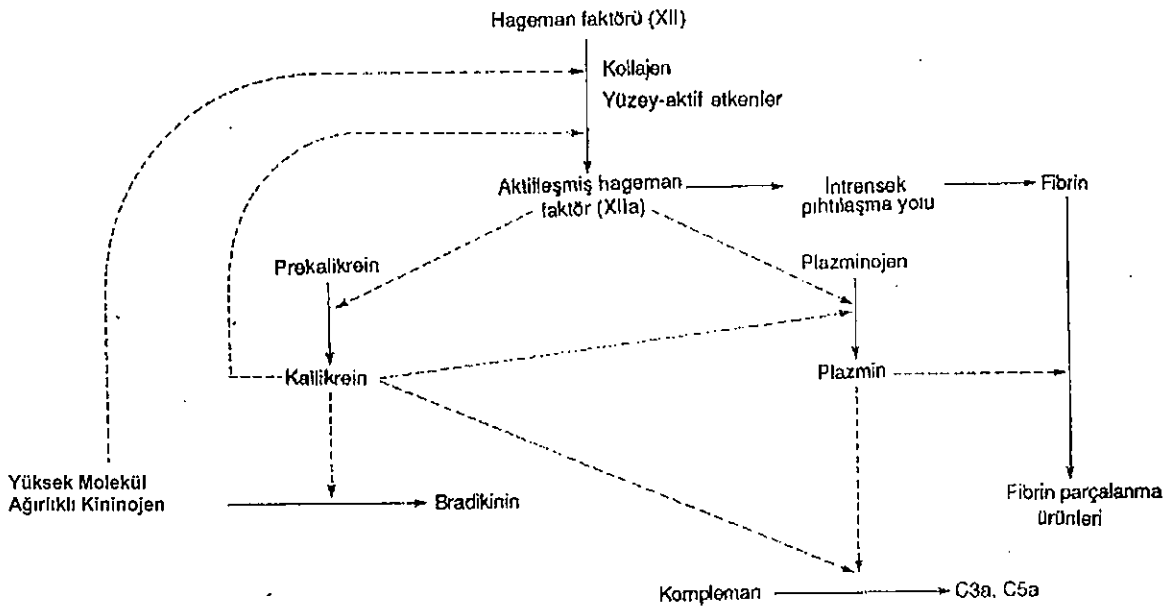
b- Kemotaksi: C5'in parçalanma ürünü olan C5a, endotele nötrofillerin yapışmasını sağlar ve monositler ile nötrofiller için kemotaktiktir⁴.

c- Fagositoz: C3b bakteri hücre duvarına bağlanarak "opsonin" etkisi oluşturduğu gibi hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanarak nötrofil ve makrofajların fagositozunu da uyarır^{4,49}.

Kompleman bileşenleri arasında kuşkusuz C3 ve C5 en önemli mediatörlerdir. Bahsedilen mekanizmalara ek olarak C3 ve C5 inflamatuvar eksudada var olan proteolitik enzimlerle de aktive edilebilirler.

Pıhtılaşma Sistemi:

Burada kanın travmaya uğramasıyla (doku zedelenmesiyle inflamasyonun başlaması esnasında) Faktör XII (Hageman Faktörü) aktive olur. Bu olay kompleman aktivasyonu ve kinin sistemlerinin aktivasyonunun bir araya gelişiyle çeşitli reaksiyonlara (Şekil 2.1.) yol açar.



Şekil 2.1. Bazı İnflamasyon Mediatörlerinin Oluşum Yolları ve İlişkileri

Araşidonik Asit Metabolitleri

Araşidonik asit çoğu memelide beslenmeye bağımlı esansiyel bir yağ asidi olan linoleik asitten sentezlenen poliansatüre bir yağ asidi olup hücre membranındaki fosfolipidlerde önemli oranda yer alır. Hücresel fosfolipazların aktivasyonu ile membran fosfolipidlerinden serbestleşir. AA metabolizmasından kaynaklanan ürünler

başta inflamasyon, ateş, ağrı, hemostaz olmak üzere birçok biyolojik olay üzerine etkilidir^{4,50,51}. AA metabolizması reaksiyonları başlatan enzimlerden adını alan iki ana yolla başlar:

Siklooksijenaz (COX) Yolu: Başlangıçta COX etkisiyle AA'den siklik endoperoksit oluşur. Bu da PGG₂'yi ve o da peroksidaz aracılığıyla PGH₂'yi oluşturur. PGH₂ ileri derecede dayanıksız olup COX yolunun biyolojik aktif son ürünleri için bir ön maddedir. Özgül enzimlerin etkisiyle PGE₂, PGD₂, PGF₂, PGI₂ ve TXA₂'ye dönüşür^{4,52}.

Prostaglandinler, inflamasyonun her basamağında yer almaktadırlar. PGE₂ ve PGD₂'nin düşük konsantrasyonlarının bile, histamin ve karragenin ile oluşturulan vasküler permeabilite artışını çok belirgin olarak artırdığı bildirilmiştir^{4,53,54}. Vazodilatasyon yapan ve ödem oluşumunu artıran PGD₂, PGE₂ ve PGF₂ üzerinden etkilidir. PGD₂, COX yolunun mast hücrelerindeki ana metabolitidir.

TXA₂ güçlü trombosit kümeleştirici bir maddedir ve vazokonstriktördür. Oysa PGI₂ zıt olarak vazodilatasyon ve kuvvetli bir trombosit kümelenme inhibitörü etkisi yapar^{4,55}.

Lipoksijenaz Yolu: Bu yolun önemi inflamasyon öncesi güçlü molekülleri oluşturmasındandır. İlk reaksiyon 5-, 12- ya da 15-LOX enzimleriyle araşidonik aside 5-, 12- ya da 15-. karbon pozisyonlarında hidroperoksi gruplarının eklenmesidir. 5-LOX ürünü olan lökotrien A₄ (LTA₄) diğer beş LT'in öncüsüdür. LTA₄'den türeyen LTB₄ kuvvetli kemotaktik bir maddedir ve nötrofillerin kümeleşmesine yol açar. LTC₄ ve LTD₄ birlikte önceleri anafleksinin yavaş etkileyen maddesi olarak bilinen biyolojik aktif maddelerdir. LTD₄ en güçlü bronkokonstrüktördür ve kapiller permeabilite artırıcı etkiye sahiptir. LT'ler inflamatuvar yanıtta merkezi role sahiptirler^{4,39,56,57}.

Lökosit Ürünleri

Lizozomal Enzimler: Hücre içine endositoz ile alınan proteoglikanlar, glikoproteinler ve glikolipidler lizozomal enzimlerle yıkılmaktadır. Özellikle elastaz, kollajenaz ve katepsin gibi proteazları içeren lizozomal enzimler doku proteinlerini parçalayarak dejenerasyon yaparlar^{27,37}. Proteazlar C3 ve C5'i parçalayarak doğrudan anaflatoksinleri oluşturur, lizozomlardan kaynaklanan kallikrein, bradikinin oluşumunu uyarırlar.

Sitokinler: Antijenlere karşı duyarlı lenfositler inflamasyon alanında makrofaj birikimi ve aktivasyonunu sağlayan lenfokin olarak adlandırılan, kronik inflamasyonda da önemli olan biyolojik aktif ürünleri serbestleştirirler⁴. Sitokin adı da verilen bu maddeler polipeptid yapıdadırlar. Vücutta pek çok olayın yanında inflamasyonda da önemli rolleri vardır. İnflamasyonda rol alan sitokinler TNF (Tümör nekroz faktör) ve IL (İnterlökin)'lerdir. IL-1 endojen pirojen olarak tanımlanmıştır ve ateş oluşumunda, IL-8 ise nötrofil aktivasyonu ve kemotaksiste önemli role sahiptir. TNF, nötrofil aktivasyonu ve toplanmasına neden olur. Mezenşimal hücrelerden proteolitik enzimleri serbestleştirir⁵⁹⁻⁶¹.

Diğer Türler

Oksijen Türevi Serbest Radikaller: Daha ilerde Oksidatif Stres başlığı altında oksijen türevi tüm serbest radikallere değinilecektir. Burada özellikle nitrik oksitin inflamasyonda birçok rolü bulunduğundan söz edebiliriz. Bunlar damar düz kas gevşemesi, trombositlerin çeşitli aşamalarda aktivasyonu, aktive makrofajlarda mikroorganizmaları öldüren ajan olması, lökosit endotel ilişkisinin sağlanması, endotel hücre adhezyon moleküllerinin salınımı, lenfosit proliferasyonu şeklinde özetlenebilir^{1,62-64}.

Tablo 2.1.'de özet olarak inflamasyon mediatörleri ve etkileri gösterilmiştir.

Tablo 2.1. İnflamasyon Mediatörleri ve Etkileri

Etki	Mediatör
Vazodilatasyon	Histamin, Bradikinin, Prostaglandinler (PGE ₂ , PGD ₂ , PGF _{2α} , PGI ₂)
Vasküler permeabilite artışı	Histamin, Bradikinin, C3a ve C5a (anaflatoksinler), Lökotrien C ₄ , D ₄ , E ₄ , Platelet Aktive Edici Faktör, Oksijen metabolitleri
Marginasyon	LTB ₄ , C5a
Kemotaksis	LTB ₄ , C5a, Bakteriyel ürünler Nötrofil katyonik proteinleri Lenfokinler
Ateş	Endojen pirojen IL-1 PGE ₂ ,
Ağrı	PGE ₂ , Bradikinin

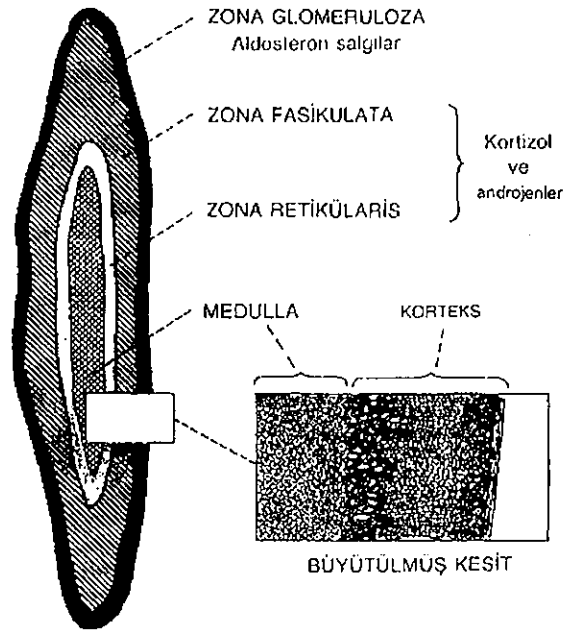
2.2. Adrenal Gland (Böbrek Üstü Bezi)

İnsanda her biri ortalama 4 gr ağırlığında, her iki böbreğin üst kısmına lokalize, retroperitoneal yerleşimli, işlevsel olarak iki farklı bölümden oluşan bir çift iç salgı bezidir. Embriyolojik gelişim ve fonksiyonları tamamen birbirinden farklı iki kesim, adrenal korteks ve adrenal medulla olarak adlandırılmaktadır⁶⁵⁻⁶⁷.

Adrenal bezler, vücudun homeostazisinde çok önemli rol oynarlar. Bu rolde büyük katkısı olan adrenal korteks, bezin %80'lik bölümünü oluşturan, yapı ve

fonksiyon bakımından üç farklı tabaka halinde incelenen bir yapıdır. Bunlar dıştan içe doğru:

- Zona Glomeruloza
- Zona Fasikulata
- Zona Retikularis olmaktadır^{24,68}.



Şekil 2.2. Böbrek Üstü Bezi Tabakaları

Böbrek üstü bezi korteksinden kolesterolden sentezlenen, kortikosteroidler olarak adlandırılan geniş bir grup hormon salınır. Korteksten 30'dan fazla sayıda steroid izole edilmiştir²⁴.

Zona Glomeruloza adını alan kapsülün hemen altında yer alan dış bölümden su ve tuz metabolizmasını kontrol eden mineralokortikoidlerin, en önemlisi aldosteron olmak üzere, sentez ve salınımı gerçekleşir. Zona Fasikulata'dan ise diğer önemli

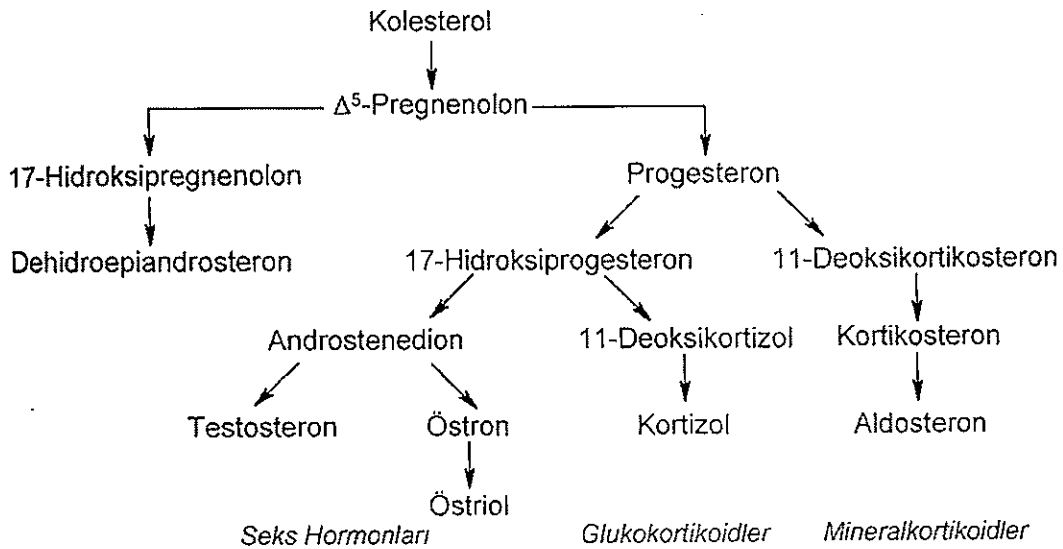
steroid grup olan karbonhidrat metabolizmasına etki eden glukokortikoidlerin, en önemlisi kortizol olmak üzere, sentez ve salınımı gerçekleşir. Derin tabaka Zona Retikularis'ten de androsteroidlerin, en önemlisi androjen olmak üzere, sentez ve salınımı söz konusudur.

İnsanda kortizol yapımı için gerekli 17- hidroksilaz Zona Glomeruloza'da bulunmaz. Bu nedenle orada glukokortikoid yapımı yoktur. Ancak Zona Fasikülata'da az bir miktar androsteroid, Zona Retikularis'te de az bir miktar glukokortikoid yapımı söz konusudur^{24,69,70}.

Adrenal medulla ise bezin %20'lik iç bölümünü oluşturan fonksiyonel olarak sempatik sinir sistemi ile ilişkili kısımdır.

2.2.1. Adrenal Korteks Hormonları ve Etkileri

Öncül maddesi kolesterol olan adrenal korteks hormonlarının biyosentezine genel bir bakış Şekil 2.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Kortikal Hormonların Biyosentezine Genel Bakış

2.2.1.1. Mineralokortikoidler

Adrenal korteksin en üst tabakasından salınan mineralokortikoidler ekstraselüler sıvının elektrolitlerini, özellikle sodyum ve potasyumu etkiledikleri için bu ismi taşımaktadırlar. Ana maddeleri diğer korteks hormonlarında olduğu gibi kolesteroldür. Mineralokortikoidlerin en etkili olan aldosteron sentezi, deoksikortikosteron ve kortikosteron üzerinden gerçekleşmektedir.

Aldosteron salınımının düzenlenmesinde esaslı rol alan dört farklı faktör bilinmektedir. Bunlar önem sıralarına göre:

- 1- Ekstraselüler sıvının potasyum iyon konsantrasyonu,
- 2- Renin- anjiyotensin sistemi,
- 3- Vücutta bulunan sodyum miktarı ve
- 4- Adrenokortikotrop hormon (ACTH) olmaktadır^{24,37}.

2.2.1.2. Glukokortikoidler

Zona Fasikülata'dan salınan glukokortikoidler ise kan glukoz konsantrasyonunu artıran önemli fonksiyonları nedeniyle bu adı almışlardır. Ayrıca glukokortikoidlerin protein ve yağ metabolizması üzerine etkileri de, karbonhidrat metabolizmasına olandan daha önemli olmasa bile ona eşit düzeydedir.

Temel glukokortikoidler kortizol ve kortikosteron olmaktadır ki kortizol, metabolitleri ile birlikte glukokortikoid aktivitenin büyük kısmından sorumludur. Kortizolün sentez ve salınımı, hipotalamik kortikotropin salıverici hormonun (CRH) kontrolü altındaki ACTH tarafından düzenlenmektedir. Glukokortikoidlerin birden çok etki mekanizması kullanarak gerçekleştirdikleri sonuç etkilerini şu temel gruplar altında toplayabiliriz:

- 1- Kan glukozunu artırır,
- 2- Protein katabolizmasını artırır, protein sentezini azaltır,
- 3- Birçok dokuda nükleik asit sentezini inhibe eder ancak karaciğerde RNA sentezini uyarır,
- 4- Hücrelerel lipaz aktivasyonunu sağlayarak yağ asitlerinin mobilizasyonunu düzenler ve
- 5- Antiinflatuar etkiye sahiptir: Bu etkilerinin erken dönemde ödem, fibrin birikmesi, kapiller dilatasyon, lökosit göçü ve fagositik etkinin baskılanması gibi yollarla; geç olarak ise kapiller ve fibroblast oluşumunun baskılanması, kollojen birikiminin engellenmesi gibi yollarla olduğu bilinmektedir. Bu etkiler bir makalede Tablo 2.2.'de olduğu gibi gruplandırılmıştır¹³.

Tablo 2.2. Glukokortikoidlerin antiinflatuar etkileri

<p><u>Membran üzerine olan etkiler:</u> Lizozomal membranların stabilizasyonu ile lizozomal enzim salınımının inhibisyonu Lipokortin sentezinin indüksiyonu ile fosfolipaz A₂'nin inhibisyonu (AA ürünlerinin azalmasıyla sonuçlanır) Lökosit birikiminin inhibisyonu Kompleman bağımlı polimorfonükleer nötrofil (PMN) agregasyonu Azalmış kapiller geçirgenlik</p>
<p><u>Nükleus üzerine olan etkiler:</u> Sitokin üretiminin inhibisyonu (IL-1, TNF, IL-2, IL-6, granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör, γ IF) Kinin ve proteaz salınımının inhibisyonu Sitokinlere lenfosit cevabının inhibisyonu NO sentaz inhibisyonu Azaltılmış endotelin-1 üretimi Lipokortin sentezinin indüksiyonu</p>
<p><u>Karışık antiinflatuar etkiler:</u> Azaltılmış PMN kemotaksisi Endotelial hücrelere azaltılmış PMN adhezyonu Apoptozis nedeniyle lenfopeni T ve B hücre proliferasyonunun inhibisyonu Makrofaj fonksiyonu ve farklılaşmasının inhibisyonu</p>

2.2.1.3. Androsteroidler

Adrenal korteks tarafından sentezlenen androjenlerin öncül bileşiği dehidroepiandrosterondur (DHEA). Orta derecede androjenik aktivite gösterir. DHEA-SO₄ ve androstenedion diğer temel adrenal androjenleri oluşturmaktadır. DHEA ve androstenedion dokularda testosterona çevrilerek etkilerini göstermektedirler. ACTH tarafından salınımları uyarılan adrenal androjenler, gonadotropinlerce etkilenmemektedirler.

Normal insan fizyolojisinde adrenal androjenler çok önemli bir etkiye sahip olmamakla beraber çocukluk çağında erkek seks organlarının ilk gelişmesinde, kadında ise sadece puberte öncesinde değil tüm yaşam boyunca hafif etkili olabilir.

DHEA, idrarla atılan 17-ketosteroidlerin temel öncü bileşiğidir. Erkeklerde 17-ketosteroidlerin 2/3 kadarını adrenal metabolitleri oluşturmaktadır. Kadınlarda ise neredeyse tamamı adrenal kaynaklıdır. Yapılan bir çalışmada 17 α -estradiol ve 17 β -estradiolün önemli antioksidan özellik gösterdiği ifade edilmiştir⁷⁷. Ayrıca DHEA'nın da bazı antioksidan özelliklere sahip olduğunu gösteren yayınlar da mevcuttur^{78,79}.

2.2.2. Adrenal Medulla Hormonları

Adrenal medulla hormonları norepinefrin (noradrenalin) ve epinefrin (adrenalin) olmakta ve genel olarak katekolaminler olarak isimlendirilmektedir. Adrenal medullada tirozinden sentez edilen dopaminin yan zincirindeki β -karbonun, kromaffin taneciklerindeki dopamin β -hidroksilazla daha ileri hidroksilasyonu sonucu noradrenalin oluşmaktadır. Bunun bir kısmı salgılanması için uyarı alıncaya kadar salgılayıcı taneciklerde depo edilmektedir. Daha büyük bir kısmı ise S-adenozil metiyoninden aktarılan metil grubu ile metillenerek adrenalini oluşturmaktadır³⁷.

Adrenal medulladan adrenalin ve noradrenalin salınımı ağrı, kanama, egzersiz, hipoglisemi ve hipoksi dahil çeşitli stresler tarafından uyarılmaktadır. Katekolaminler, hedef hücrelerin plazma zarları üzerindeki α adrenerjik ve β adrenerjik reseptörler yoluyla etki ederler. Adrenalin tüm kan damarlarında konstrüksiyon yapıcı, kalp aktivitesini artırıcı, gastrointestinal kanalda inhibisyon yapıcı, gözde pupilla genişletici etkilere sahiptir. Ayrıca karaciğer ve kasta glikojenolizi ve kana glikoz serbestlenmesini artırıcı etkiye sahiptir. Adrenalinin metabolizma üzerindeki etkileri noradrenaline göre birkaç kat daha güçlüdür.

Adrenalinin kandaki yarı ömrü kısadır. Katekolaminler reseptörlerine düşük affinite ile bağlandıkları gibi reseptörlerinden de hızla ayrılarak kısa süreli biyolojik cevap oluştururlar. Böylece otonom sinir sisteminin sempatik ve parasempatik etkilerinden sorumludurlar.

Yapılan bir çalışmada adrenalectomi ve 6-OH dopamin tedavisi uygulanmasına cevap olarak adrenalin ve noradrenalin seviyelerinin azaldığı; farklı dokularda antioksidan cevap seviyeleri üzerinde sempatektominin farklı etkileri olduğu gösterilmiştir⁸².

2.2.3. Adrenal Gland ve İnflamasyon

Adrenal korteks hormonları özellikle de glukokortikoidler ciddi stres adaptasyonunun bir parçasıdır. Mineralokortikoidler normal Na ve K dengesi için gereklidir. Her iki grubun da sentetik analogları terapötik olarak kullanılır. Özellikle de glukokortikoid analoglarının bir çoğu potent anti-inflamatuar ajanlardır².

Glukokortikoidler immün cevabı baskırlar. Bu hormonlar, lenfositlerin hücrel tip spesifik lizisine neden olurlar. Ayrıca inflamatuvar cevabı da baskırlar. Dokularda lökosit göçünü ve artışını baskırlayarak fibroblast proliferasyonunu inhibe

ederler. Fosfolipaz A2 inhibisyonuyla lipokortinleri uyarırlar. Potent antiinflamatuvar moleküller olan prostaglandin ve lökotrien üretimini keserler².

Adrenal hormonlar glukoz dengesinde, sodyum retansiyonu ve kan basıncı kontrolünde, otoimmün mekanizma (host-defense mechanism), stres cevabında ve genel protein yapının düzenlenmesinde merkezi rol oynarlar.

Sempatoadrenal sistem hormonları yaşam için gerekli değilken akut ve kronik stres adaptasyonunda gereklidir. Adrenalin, noradrenalin ve dopamin ciddi stres cevabında en önemli unsurlardır².

Strese karşı adrenokortikal cevabın inflamatuvar hadisede faydalı olduğu, önceki çalışmalarla gösterilmiştir. Yapılan deneylerde adrenalektomili hayvanlarda, adrenal fonksiyonun desteklenmesiyle endojen adrenokortikal fonksiyon gibi koruma sağladığı ifade edilmiştir. Günümüzde ise kortizol üretiminin inhibisyonu ve/veya inflamatuvar hadisedeki mekanizması tanımlanmıştır. Örneğin adrenalektomide vazoaktif aminlerin yüksekliği, yüksek TNF ve IL-6 gibi daha büyük endojen cevap sonucu alınır. Ve inflamatuvar uyarıdan sonra da daha küçük akut faz reaktanlarına sebep olduğu ifade edilmektedir. Ancak inflamasyon esnasında bazal ve uyarılmış kan kortizol seviyesindeki yükselmenin ciddi inflamasyonda adrenokortikal cevapta artıştan ziyade bir baskılanmaya yol açacağı tahmin edildiği de söylenmektedir^{13,14}.

2.3. Oksidatif Stres

Oksijen, aerobik yaşam sürecinde mutlak surette bulunması gerekli bir molekül olmasına rağmen, aerobik şartlarda hücreler reaktif oksijen türlerinin tehdidi altında kalmaktadırlar. Bunlar ise insan vücudundaki antioksidan sistemlerce büyük ölçüde kontrol altına alınabilmektedir.

Reaktif oksijen türlerinin etkilerinden bahsetmek için öncelikle serbest radikal kavramını ifade etmek gereklidir. Serbest radikal paylaşılmamış bir ya da daha fazla elektronu bulunan atom ya da moleküldür. Başka bir maddeden elektron alma ihtiyacına olan eğilim serbest radikali oldukça reaktif bir hale getirir². Reaktif oksijen türleri ise ileri derecede serbest radikal olan veya hücrede kolayca serbest oksijen radikallerine çevrilen oksijen içeren bileşiklerdir. Oksijenin tek elektron indirgenmesi ile oluşan ana oksijen metabolitleri reaktif oksijen türleri olarak sınıflandırılırlar³. Bununla beraber tüm reaktif oksijen türleri serbest radikal değildir, örneğin singlet oksijen ve H₂O₂ gibi². Reaktif oksijen türleri, radikal olan ve olmayanlar belirtilerek Tablo 2.3'de gösterilmiştir.

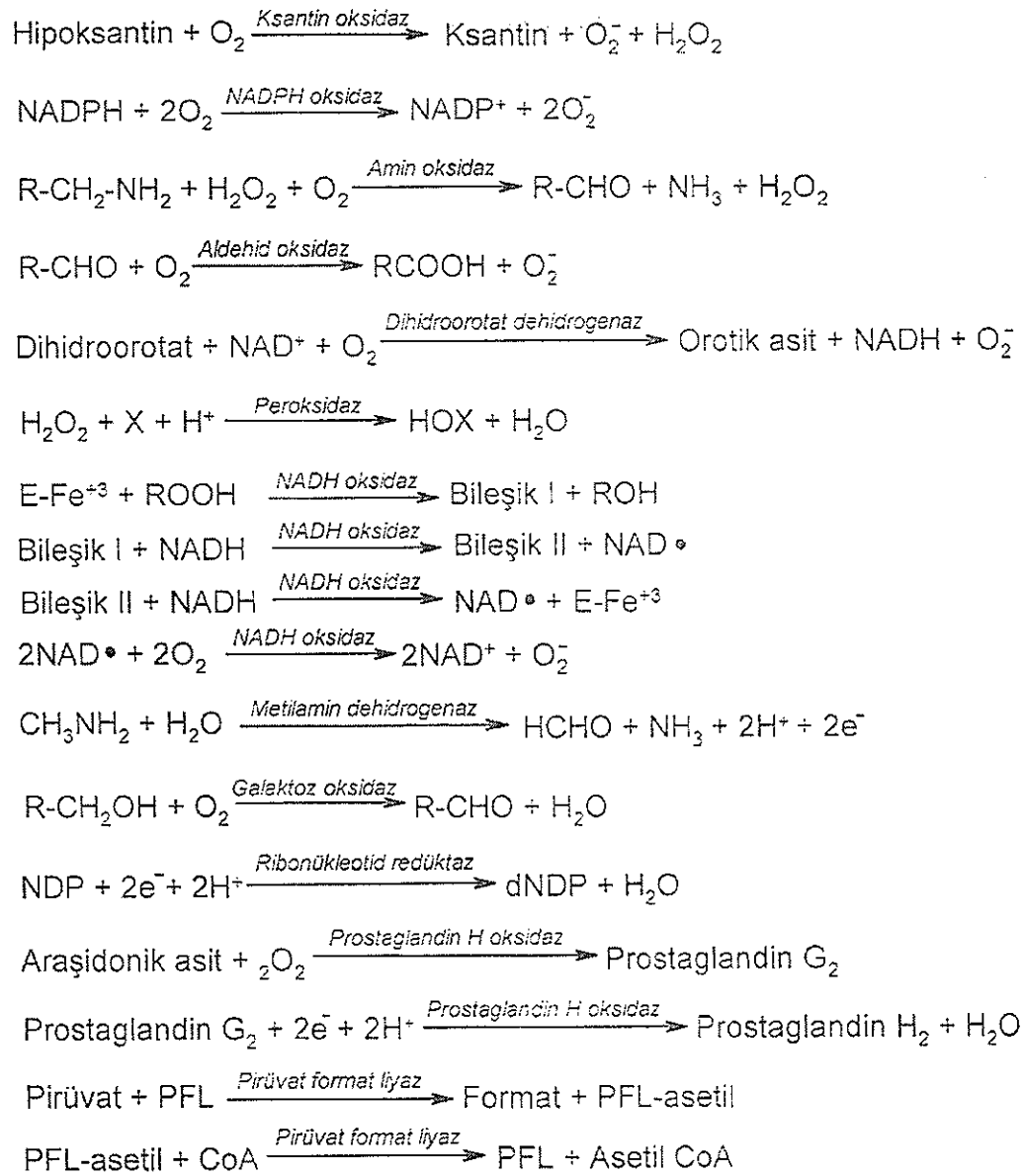
Tablo 2.3. Reaktif Oksijen Türleri

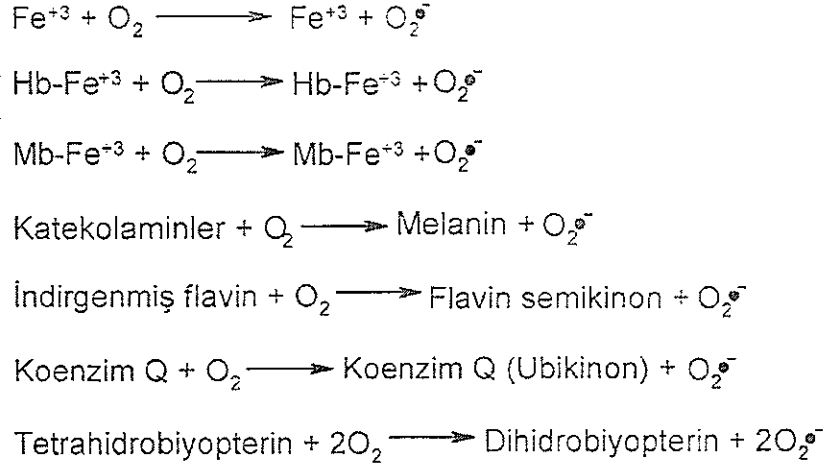
Radikaller	Radikal olmayanlar
Superoksit anyon radikali (O ₂ ^{•-})	Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)
Hidroksil radikal (OH [•])	Lipid hidroperoksit (LOOH)
Peroksil radikal (ROO [•])	Hipohalöz asit (HOX)
Alkoksil radikal (RO [•])	N-halojenli aminler (R-NH-X)
Semikinon radikal(HQ [•])	Singlet oksijen(¹ O ₂) ₂
Hemoproteine bağlı serbest radikaller	Ozon (O ₃)
Organik radikaller R [•]	Azot dioksit (NO ₂)
Organik peroksit radikali RCOO [•]	Hipokloröz asit (HOCl)
Nitrik oksit (NO [•])	Peroksinitrit (ONOO [•])

Hücrelerimizde O₂'den reaktif oksijen türlerinin üretilmesi her gün görülen bir olaydır. Bunlar enzimatik olan veya olmayan tepkimelerin kazara meydana gelmiş yan ürünleri olarak üretilir. Bazen enzimle katalize edilen tepkimelerde istemli olarak sentez edilir. Havadaki kirlilikler ve mor ötesi ışınlar toksik, oksijen içeren bileşiklerin oluşmasını artırabilir³. Oksijen içeren tepkimeleri katalizleyen enzimler oksidazlar veya oksijenazlar olarak sınıflandırılmaktadır. Elektronları oksijene aktaran oksidazlar

oksijenin su veya H_2O_2 'e indirgenmesini sağlamaktadır. Oksijenazlar oksijenin bir substratın yapısına katılmasını gerçekleştirmektedirler. Bu gruptaki enzimlerin katalizlediği tepkimelerde serbest radikaller oluşabilmektedir. Bunun yanı sıra enzimatik olmayan şekilde otooksidasyon tepkimeleri sonucu enzimatik olmayan kaynaklardan reaktif oksijen türlerinin oluşması da söz konusudur³⁷. Her iki duruma ait örnek tepkimeler Tablo 2.4 ve Tablo 2.5'de gösterilmiştir.

Tablo 2.4. Reaktif Oksijen Türlerinin Enzimatik Kaynakları



Tablo 2.5. Reaktif Oksijen Türlerinin Enzimatik Olmayan Kaynakları

Serbest radikal etkileri normalde, canlıda var olan antioksidan savunma mekanizmaları ile dengede tutulur. Bu dengenin serbest radikaller lehine bozulması halinde oksidatif stresden söz edilir. Oksidatif stres halinde, antioksidan savunma sistemi zayıflamış ya da serbest radikal üretimi artmış veya her ikisi de birlikte var olmuş olabilir. Oksidatif stres durumunda serbest radikaller karbonhidrat, protein, lipid ve nükleik asit gibi hücrenin tüm önemli bileşenlerine etki ederler^{80,81,83}.

2.3.1. Oksidatif Stresin Biyolojik Sistemlere Etkisi

Serbest radikaller hücresel yapıları etkileyerek hücre hasarına yol açmaktadır. Protein yapısında bulunan özellikle prolin, histidin, arginin, sistein ve metiyonin amino asitleri radikal hasarına açıktır. Bu amino asitlerin oksidasyonu proteinlerin parçalanmasına, çapraz bağ oluşumuna, agregasyona ve proteinlerin proteolitik parçalanmaya yatkın hale gelmesine neden olabilir^{3,37}.

Memeli hücre membranları peroksidatif hasara karşı çok duyarlı olan büyük miktarda çoklu doymamış yağ asidi içermektedir. Bu yağ asitlerinin peroksidasyonu ile

başlayan bir dizi tepkime sonucu oluşan lipid peroksidasyonu ve kükürt içeren proteinlerin oksidasyonu, membran geçirgenliği ve kırılgenliğini artırmakta ve membran enzimlerinin aktivitesini azaltarak hücreye Ca^{+2} girişini artırmaktadır. Böylece membran geçirgenliğinde değışiklik ve potansiyel kaybına bağı toksik etkide artış olmaktadır. Ayrıca mitokondri harabiyeti, proteaz aktivasyonu ile proteolitik etkinin şiddetlenmesi, katabolik enzimlerin aktivitesinde artış ve endonükleaz aktivitesi ile DNA kırılmaları oluşmaktadır^{3,37}. Oksidatif strese bağı olarak oluşan in vivo DNA ve protein hasarının, lipidlerdeki hasardan daha önemli olduğu öne sürülmektedir⁸⁴. Karbonhidratlara olan etki de diabet, kanser ve sigara içimi ile birliktelik seyreden kronik hastalıkların patogeneğinde rol oynayan, monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu oluşan serbest radikallerin etkileriyle açıklanmaktadır. Özellikle oluşan oksoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanırlar ve aralarında çapraz bağlar oluşturarak kanser gelişimi ve yaşlanma sürecinde rol oynarlar. Çoklu doymamış yağ asidi ve karbonhidrat oksidasyonunun bir ürünü olan “glioksal”ın de hücre bölünmesini inhibe ettiği belirtilmiştir⁸⁵.

Oksidatif stres bu etkilerle birçok hastalığın patolojisinin başlamasında ve gelişmesinde önemli rol oynamaktadır⁵⁸. Hastalıkların primer nedeni olabilen serbest radikal hasarı, komplikasyonların artmasına yol açmakta veya diğer etkenlerle oluşan hücre hasarını artırmaktadır^{37,86}.

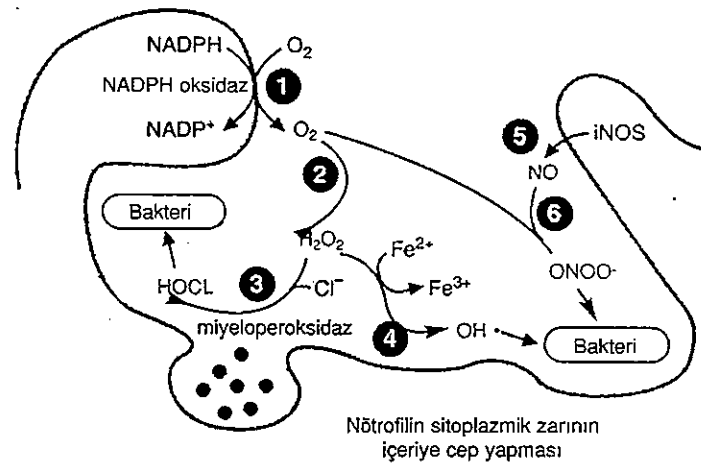
2.3.2. Oksidatif Stres ve İnflamasyon

Birçok hastalığa neden olabilen reaktif oksijen türleri organizmada birçok fizyolojik olayda da yer almaktadır. Bunlardan birisi de fagositozdur. Özellikle nötrofil, monosit, makrofaj ve eozinofiller fagositoz esnasında çok miktarda süperoksit radikali oluştururlar^{3,37,87,88}.

Enfeksiyöz ajanlar ve diğer uyarılara yanıt olarak bağışıklık sisteminin fagositoz yapan hücreleri “solunum patlaması” adı verilen hızlı bir oksijen tüketimi gösterir. Bu olay süperoksit, hidroksil radikali, hidrojen peroksit, hipokloröz asit ve reaktif nitrik oksit sentazın ana kaynağıdır. Serbest radikal üretilmesi insandaki antimikrobiyal savunma sisteminin bir parçasıdır ve amacı, saldırgan mikroorganizmaları, tümör hücrelerini ve uzaklaştırılması hedeflenen diğer hücreleri tahrip etmektir^{3,87}. Fagositozun normal olduğu kronik granülamasyonda solunum patlaması olmamakta ve bu nedene sık sık tekrarlayan enfeksiyonlar görülmektedir. Ayrıca nötrofiller yapılarındaki NADPH oksidaz ile heksoz monofosfat şantı kaynaklı NADPH’ı kullanarak oksijenden süperoksit radikali oluşturmaktadır. (Tablo 2.4)

Bazı bakteriler için doğrudan öldürücü olabilen süperoksit radikali, fagositik vakuolde süperoksit radikalinden H_2O_2 oluşturabilmektedir^{37,87}.

Aktive edilmiş nötrofillerin yaptığı fagositik solunum patlaması esnasında reaktif oksijen türlerinin oluşması ve basamaklar Şekil 2.4’de gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Aktive Edilmiş Nötrofillerin Yaptığı Fagositik Solunum Patlaması Esnasında Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşması. (1) Plazma zarının dış yüzündeki NADPH oksidazın aktive olması solunum patlamasını başlatmakta ve süperoksit oluşmaktadır. Fagositoz sırasında, plazma zarı iç cep yapmakta ve böylece süperoksit vakuol boşluğuna salınmaktadır. (2) Süperoksit (kendiliğinden veya süperoksit dismutaz yoluyla enzimatik olarak) H_2O_2 üretir. (3) Miyeloperoksidaz içeren tanecikler fagozomlar içine

salgılanır ve burada katalizörlüğünde HOCl ve diğer halidler üretilir. (4) H_2O_2 , fenton tepkimesinden hidroksil radikalini de üretebilir. (5) İndükte edilebilir nitrik oksit sentaz aktive olabilir ve NO üretir. (6) NO, peroksinitrit üretmek üzere süperoksitle birleşir ve bu da ilave RNOS oluşturabilir. Olayın sonucu, fagositoza uğratılan hücrelerin zarlarına ve diğer bileşenlerine saldırılması ve en sonunda hücrenin eritilmesidir. Sadece 30-60 dakika sürmesi ve O_2 tüketmesi nedeniyle olayın tümüne solunum patlaması adı verilir.

2.4. Antioksidan Savunma Mekanizmaları

Organizmada, fizyolojik ve metabolik süreçlerin sonucu olarak reaktif oksijen türleri üretilmekte ve zararlı oksidatif reaksiyonlar oluşmaktadır⁸⁹. Hücreler de bu olaylara karşın, oksidanları toksik olmayan moleküllere çeviren, bu şekilde organizmayı oksidatif hasardan koruyan enzimatik ve enzimatik olmayan sistemler geliştirmişlerdir⁹⁰. Bu savunma sistemlerine genel adıyla antioksidanlar denmektedir. Potansiyel toksik oksijen türleri yapmaya yetkin kimyasal bileşikler ve reaksiyonlar da pro-oksidan olarak adlandırılır².

Antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda substratın oksidasyonunu geciktiren veya önleyen tüm maddelerdir ki bu oksidanların direk etki ile inaktivasyonunu ifade eder^{37,91}. Bir başka deyişle peroksidasyon zincir reaksiyonlarını engelleyerek lipid peroksidasyonunu inhibe eden ve/veya reaktif oksijen türlerini tutan maddelerdir⁹².

Tüm antioksidanlar etkilerini başlıca dört farklı şekilde gerçekleştirmektedirler. Bunlar;

1- Oksidanları tutarak toksik olmayan ürünlere dönüştürme işlemi ki bu daha çok antioksidan savunma enzimlerince yapılır.

2- Serbest radikal zincir tepkimelerinin sonlandırıldığı, oksidanlara bir H^+ aktararak etkisizleştirme. Bu da enzimatik olmayan savunma sistemlerinden vitaminler ve flavonoidler gibi bileşiklerce yapılır.

3- Hasar onarıcı sistemler, burada sözü edilen ise hücrede DNA için onarım mekanizmaları ve okside olmuş yağ asitlerini zar lipidlerinden uzaklaştıracak

mekanizmalardır. Proteinlerdeki okside olmuş amino asitler, proteinin yıkılması ve yeni protein sentezi ile sürekli onarılır.

4- Metal sekestrasyonu; bu daha çok metal iyonlarının oksidan moleküllere ya da protein yapılarına bağlanarak olası zincir reaksiyonların engellenmesi ile oluşmaktadır.

Bunun yanı sıra bazı tür reaktif oksijen türlerini üreten enzimlerin, antioksidan enzim taşıyan peroksizomlara hapsedilmesi gibi uzaklaştırıcı etkiler de mevcuttur^{3,37}.

Antioksidan moleküller doğal antioksidanlar ve doğal olmayanlar (ilaçlar) olmak üzere iki genel grupta incelenir. Doğal antioksidanlar da enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sistemleri alt başlıklarında incelenebilir³⁷. Enzimatik olmayan savunma sistemleri, serbest radikalleri enzimatik olmayan tepkimelerle radikal ve toksik olmayan şekillere çevirirler. Bunların çoğu radikale bir hidrojen atomu (bir elektronla birlikte) bağışlayarak serbest radikali nötralize eden antioksidanlardır. Bu tepkimelerle antioksidanlar okside olurken serbest radikal miktarını azaltırlar³. Doğal antioksidanların enzimler başlığı altında glutasyon peroksidaz, glutasyon S-transferaz, süperoksit dismutaz, katalaz, glutasyon redüktaz sayılabilir. Enzimatik olmayan ancak doğal sayılan antioksidanlar arasında transferrin, seruloplazmin, ürik asit, bazı vitaminler, karotenoidler ve fenolik yapılar gibi moleküller sayılabilir. Doğal olmayan ilaç etkili antioksidanlara ise mannitol, trimetozidin, barbitüratlar, indapamid gibi örnekler verilebilir³⁷.

Genel bir ifadeyle Tablo 2.6'da metal iyonlarını bağlayan bileşiklere, düşük molekül ağırlıklı vücutta sentezlenebilen antioksidanlara, diyetle alınan düşük molekül ağırlıklı antioksidanlara, vitaminlere ve bazı enzimlere yer verilmektedir^{2,37}.

Tablo 2.6. Antioksidanlara Genel Bakış

Antioksidan Etkililer	Görevleri
Transferin, laktoferrin, ferritin	Demir bağlayan bileşikler
Seruloplazmin, albumin	Bakır bağlayan bileşikler
Hemoglobin, haptoglobulin, hemopeksin	Hem proteinleri
Metallotioneinler (5-7 adet Zn, Ag, Cd, Hg)	Diğer metal bağlayıcılar
Ürik asit	$O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} ve peroksit radikali tutucusu
Ubikinon (koenzim Q)	Serbest radikal tutucusu
Bilirubin	Peroksil radikali ve singlet oksijen yok edicisi
α - Ketoasitler	Piruvat ve α - ketoglutaratın H_2O_2 ile non enzimatik tepkimeleri
Cinsiyet hormonları	Östradiol, östron, östriol gibi dişi cinsiyet hormonlarının lipid peroksidasyonu inhibisyonu
Melatonin	Antioksidan enzim sentezi uyarıcısı
Melaninler	Melanin polimerlerinin yapılarındaki eşlenmemiş elektronlar ile uv radyasyonun absorpsiyonunu sağlaması
Histidin içeren dipeptidler	Bakır iyonlarının şelatasyonunu sağlayan karnozin, homokarnozin ve anserinin lipid peroksidasyonunu önlemesi
Tiyol içerenler (Glutasyon, N-asetil sistein, metiyonin)	Serbest radikal ve HOCl tutucusu
Vitamin A, β - karoten, vitamin E	Singlet oksijen tutucusu
SOD, vitamin E, β - karoten	Süperoksit serbest radikali tutucusu
Vitamin E, vitamin C	Hidroksil (OH^{\cdot}), alkoksil (RO^{\cdot}), peroksil (ROO^{\cdot}) serbest radikalleri tutucusu
Katalaz, glutasyon peroksidaz	H_2O_2 üzerine etki
GPx	Lipid peroksidleri üzerine etki

2.4.1. Enzimler

Doğal bir süreç halinde seyreden oksidatif stres tüm canlı sistemlerde, çeşitli basamaklarda oluşmaktadır. Bu durumu kontrol altında tutan antioksidan

Okside olmuş glutatyon bir kez oluşunca mutlak surette bir redoks döngüsüyle glutatyon redüktaz tarafından disülfid halinden sülfhidril haline indirgenmelidir³. Hidrojen peroksitin etkisiz hale getirilmesi hem GPx hem de bir diğer antioksidan enzim olan katalaz aracılığıyla gerçekleşir. Ancak CAT yüksek konsantrasyonlardaki H₂O₂ üzerine etkilidir. Bu nedenle GPx, lipid peroksidasyonunu önleyerek biyolojik membranların yapı ve fonksiyonlarının sürdürülmesinde daha önemli bir rol üstlenir⁹³⁻⁹⁵.

2.4.1.2. Glutatyon S-Transferaz

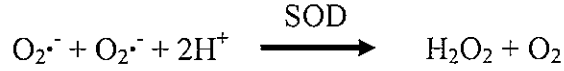
Antioksidan aktivitede önemli bir rol oynayan indirgenmiş glutatyon (GSH), kendisinden başka moleküllerdeki sülfhidril gruplarının korunmasını sağlayarak denge unsuru oluşturur. GSH serbest radikallerin, H₂O₂ ve diğer peroksitlerin inaktive edilmesine katkıda bulunur. Ve çeşitli yabancı bileşiklerin inaktivasyonu da sülfür atomunun bu bileşiklerle birleşmesiyle sağlanır. Bu birleşme reaksiyonu glutatyon S-transferaz enzimi tarafından katalize edilir ve en son merkapturik asit oluşarak ekskrete edilir.

Sitozol ve mitokondride bulunan mikrozomal proteinler içeren bir enzimdir. GST çeşitli substrat moleküller üzerindeki elektrofilik noktalar üzerine redükte glutatyonun sülfhidril grubunun konjugasyonunu sağlar. Bu olay lipid peroksitlerin detoksifiye edilmesi için gereklidir. GST'nin ayrıca transport proteinleri olarak görev yapma ve önceleri "ligandin" adıyla anıldığı gibi toksinleri bağlama fonksiyonları da vardır³.

2.4.1.3. Süperoksit Dismutaz

Süperoksit dismutaz enzimi ilk kez 1969'da Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanmıştır⁹⁶. Serbest radikallerden olan süperoksit anyonunu hidrojen peroksit ve

moleküler oksijene çeviren bir metalloenzimdir. Bu reaksiyona dismutasyon adı verilir ve çoğu kez oksidatif strese karşı birinci savunma hattı olarak adlandırılır^{3,97}. Süperoksit, spontan olarak da H₂O₂ ve O₂'e çevrilir ancak SOD aktivitesi bu reaksiyonun hızını artırır². Reaksiyon şu şekilde gerçekleşir:



SOD, GPx ve CAT birincil enzimatik koruma sistemini oluştururlar⁹⁸. Özellikle inflamasyonda oksijen azlığında Cu/Zn SOD (sitoplazmik) katalaz ile birlikte hareket ederek süperoksit iyonunu oksijene çevirirler ve fagositin bakterisidal etkisini artırır².

SOD enzimi ana substratı olan süperoksit radikallerinin yanı sıra, nitroksil iyonlarının dismutasyonunu da katalizleyerek, reaktif bir nitroksili çok daha az reaktif olan NO'ye çevirir¹.

SOD memeli hücrelerinde üç izoenzim halinde bulunmakta olup Cu/Zn SOD şekli sitozolde, Mn SOD şekli mitokondride ve EC- Cu/Zn SOD şekli ise hücre dışında bulunur³. Çalışmamızda aktivitesini ölçtüğümüz Cu/Zn SOD, memeli hücrelerinde en fazla bulunan izomerdir. Cu/Zn SOD enzimi 32 kDa molekül ağırlığında, iki alt birimden oluşmuş ve bunlar birbirlerine disülfid bağlarıyla bağlanmışlardır^{99,100}. Cu/Zn SOD enziminin aktivitesi, süperoksit üretimini artıran koşullar (hiperbarik oksijen gibi) veya kimyasallar tarafından artırılır³.

Yapılan bir çalışmada deney materyallerindeki süperoksit radikallerinin artışının mitokondriyal hasara neden olabileceğinden savunma olarak SOD aktivitesini uyarılmış olabileceği söylenmektedir¹⁰¹.

Cu/Zn SOD aktivitesinden bakır, stabilitesinden çinko sorumludur¹⁰². Bazı çalışmalarda formaldehite maruz bırakılmış dokularda bakır ve çinko

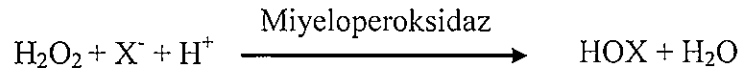
konsantrasyonlarında azalma olduğu ve bunun SOD aktivitesinin inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir^{103,104}.

Mn SOD mitokondride bulunur ve kofaktör olarak manganı kullanır¹⁰⁵. Ektraselüler SOD enziminin kofaktörleri de çinko ve bakırdır. Ektraselüler boşluklardaki süperoksit radikaline karşı (Ör. Proinflamatuvar hücrelerde üretilen) savunma sağladığı düşünülmektedir¹⁰⁶.

2.5. Miyeloperoksidaz

Molekül ağırlığı yaklaşık 150.000 Da olan hem proteininden oluşan çoklu alt üniteleri var olan bir enzimdir. Apoenzime kovalent olarak bağlı iki hem grubu prostetik grup olarak yer almaktadır. Özellikle nötrofilik granüller içinde bulunur. Ve inflamasyon esnasında daha önce söz ettiğimiz solunum patlaması sırasında oluşan H₂O₂'i substrat olarak kullanır.

Miyeloperoksidaz birçok oksidasyon olayını katalizler fakat halid ve hipohalid iyonlarının oksidasyonu en önemli olanlarıdır. Genellikle bu reaksiyonda halojen iyonu olarak Cl⁻ görevlendirilir. Nedeni vücut sıvılarında ve plazmada bol miktarda bulunmasıdır. H₂O₂'in MPO katalizörlüğünde suya çevrilmesi reaksiyonu görülmektedir:



(X⁻ = Cl⁻, Br⁻, I⁻ ya da SCN⁻)
Örn. HOX = HOCl (Hipokloröz asit)

Hipoklorid iyonu hidrojen peroksitin potansiyelinden %50 daha fazla antimikrobiyal potansiyele sahiptir. Nötrofil granülleri içinde çok miktarda bulunan ve irinin yeşil renginden sorumlu MPO antimikrobiyal etkiyi hipokloröz asit oluşturarak

artırmak için H_2O_2 ile reaksiyona girer. Bu reaksiyondaki H_2O_2 , NADPH oksidaz sistemi tarafından üretilmektedir.

Aynı zamanda inflamasyonda var olan bakteri katalaz enzimi azlığı ya da yokluğunda fagolizozomların içerisine az miktarda H_2O_2 salar. Burada bulunan MPO da yukarıda görülen reaksiyonda olduğu gibi bakterisidal ürünler oluşturmak için bu H_2O_2 'i substrat olarak kullanır. Böylece fagositler içindeki bakterisidal aktivitenin ana kaynağı olarak hipohalid iyonları ve MPO aktivitesi gösterilir.

Miyeloperoksidaz yokluğunda peroksitler gibi substratlar hem fagositlerin kendi kendilerine hem de etrafındaki dokulara karşı potansiyel sitotoksik etkilidirler. Böyle bir durumda antioksidan koruma glutasyon, GPx, SOD tarafından sağlanır^{2,87}.

2.6. Nitrik Oksit

Nitrik oksit, ortaklanmamış elektronu bulunan iki atomlu reaktif bir gaz molekülü, serbest radikaldir. Lipofiliktir ve biyolojik membranlardan kolaylıkla diffüze olabilir⁸⁷. NO endotel kaynaklı düz kas relaksasyonu, trombosit agregasyonunun inhibisyonu başta olmak üzere sitotoksitenin de dahil olduğu birçok fizyolojik olayda işlev görmektedir. Düşük derişimlerde iken fizyolojik olarak bir nörotransmitter ve vazodilatasyona neden olduğunda bir hormon olarak görev yapar^{3,37}.

NO argininin guanido grubundan ya da terminal azot atomlarından birinden sitrüllinin olumuyla eş zamanlı olarak sentez edilmektedir. Moleküler oksijen ve NADPH bu sentezde kosubstrat olarak görev alırlar ve reaksiyon nitrik oksit sentaz tarafından katalizlenir⁸⁷. Nitrik oksitin endojen yapımı ve fonksiyonları birbirinden bağımsız, çok sayıda ve farklı yöndeki araştırmalar sonucu tanımlanabilmiştir. Bunları dört grupta toplayabiliriz:

1) Deney hayvanlarında (ratlarda) idrarla atılan nitratın diyetle alınandan fazla olması nitratın in vivo oluşabileceğini düşündürmüştür. Benzer şekilde enfeksiyöz ishal durumunda insanda da nitrat yapımının arttığı görülmüştür. Ratlarda E. Coli lipopolisakkaritinin enjeksiyonu idrarla bol miktarda nitrat atılımına neden olmuş ve bu bulgulardan, inflamasyonun nitrat yapımını artırdığı sonucu çıkarılmıştır. İnflamatuar veya enfeksiyon ajanlarının deney hayvanlarında nitrat yapımını 10 kez artırdığı tespit edilmiştir. Nitrat oluşumunun hücrel kaynağı araştırıldığında bu kaynağın makrofajlar olduğu belirlenmiştir⁴⁴.

2) Makrofajların bakteri, mantar ve tümör hücrelerini nasıl öldürdüklerinin in vitro koşullarda araştırılması, NO'nin önemli bir biyolojik molekül olarak tanımlanmasına yardımcı olmuştur. Bu çalışmalarda makrofajın bakteriyi öldürmesi için arginin amino asitinin gerekli olduğu, ortamdaki arginin uzaklaştırılmasının makrofaj kültürlerinde bakterinin öldürülmesi ile nitrit ve nitrat oluşumunun önlenmesi gözlemlenmiştir. Ortama NO üreten bir bileşik eklenmesi makrofajların sitotoksik etkisini artırmaktadır.

3) Endotel kaynaklı gevşeme faktörü olarak adlandırılan molekülün tanımlanması, memelilerde NO'nin sentezinin aydınlatılmasında önemli bir anahtar rolü oynamıştır. Yapılan çalışmalar endotel kaynaklı gevşeme faktörünün NO'den başka bir molekül olmadığını gösterdi. Hemoglobin NO'yi nitrata oksitleyerek, başka moleküller ise süperoksit radikali aracılığıyla NO'yi ortamdaki uzaklaştırarak etki göstermektedirler. Ayrıca bazı ilaçların antianjinal, antihipertansif etkilerinin de NO yapımında öncül görev görmelerinden kaynaklandığı gösterilmiştir.

4) Nitrik oksit biyomolekül olarak önemini gösteren çalışmaların bir kısmı da bu molekülün sinir sistemindeki rolü ile ilgilidir⁴⁴. Bu etkinin mekanizmalarından biri

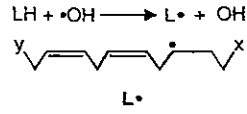
guanilat siklazın uyarılmasıdır. Guanilat siklaz, siklik guanozin monofosfattan, guanozin trifosfat oluşumunu katalizler. NO hem demirine bağlanma yoluyla guanilat siklazı aktive eder⁸⁷.

Vücutta nitrik oksit sentazın nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS, izoform I), indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS, izoform II) ve endoteliyal nitrik oksit sentaz (eNOS, izoform III) olarak üç farklı, dokuya özgü izoformu bulunmakta olup bunların her biri farklı bir gen tarafından şifrelenmiştir. İçlerinden iNOS, bağışıklık sisteminin birçok hücrelerinde, makrofajlar ve astroglialar gibi benzer bir hattan gelen hücre tiplerinde bulunur. iNOS saldırgan mikroorganizmaların öldürülmesine yardım etmek için yüksek ve toksik düzeylerde NO üretirir. İşte bu yüksek NO düzeylerine, tepkici azot-oksijen türleri ve NO toksisitesinin gelişmesine eşlik eder³.

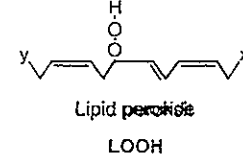
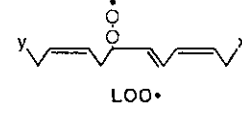
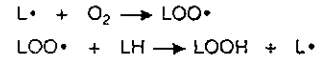
2.7. Malondialdehit

Zarlarda lipid serbest radikalleri ve lipid peroksitleri oluşturan zincir tepkimeler reaktif oksijen türlerinin indüklediği mekanizmalara ana katkı sağlar. Bu tepkimeler zinciri bir başlatıcı ile başlar³. Başlatıcı mevcut bir serbest radikal, ışık ya da metal iyonları olabilir. Oksijenin lipit peroksi radikalleri ve lipit peroksitleri yapmak üzere eklenmesi ile tepkime ilerler. En sonunda lipit bozunmaya uğrar ve lipit peroksidasyonunun ölçümü olarak kullanılan, üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinden gelen MDA, ω 3 yağ asitlerinin terminal iki karbonundan gelen etan ile ω 6 yağ asitlerinin terminal beş karbonundan gelen pentan gibi ürünler oluşur^{2,3}(Şekil 2.6.). Malondialdehit kan ve idrarda bulunabilir, serbest radikal harabiyetinin belirteci olarak kullanılır³.

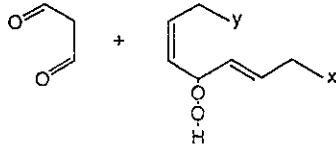
A. Başlama



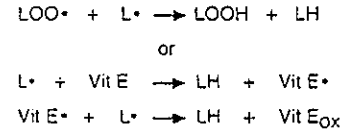
B. İlerleme



C. Yıkım



D. Sonlanma



Şekil 2.6. Lipid Peroksidasyonu; Bir Serbest Radikal Zincir Tepkimesi. (A) Tepkimeler çoklu-doymamış bir lipidden "LH" bir hidrojen atomu söken ve böylece bir lipid radikali "L·" yapan bir hidroksil veya diğer bir radikalle başlar (B) Oluşan lipid radikali O_2 ile tepkimeye girip lipid peroksi radikali "LOO·" ve lipid peroksit üreterek ilerler (C) Tek elektronun yeniden düzenlenmesi lipid yıkımı ile sonuçlanır ve oluşan ürünlerden biri olan MDA suda çözünür, kanda belirir (D) Zincir tepkimesi tek tek elektron bağışlayan E vitamini gibi lipide çözünür antioksidanlar tarafından bitirilir ve daha sonraki iki indirgenme basamağı ile kararlı, okside olmuş bir antioksidan oluşur.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmaya Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü Etik Kurulu'nun 13.12.2006 tarihli 1921 sayılı onayı alındıktan sonra başlandı. Çalışmada yer alan deney hayvanları Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden sağlandı. Ağırlıkları ortalama 195 ± 15 gr olan 37 adet Albino Wistar cinsi erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar deney öncesi normal oda sıcaklığında (22°C) barındırılarak aynı cins yem ve su ile beslendi.

3.2. Deney Grupları ve Cerrahi Uygulama

Deney hayvanları çalışmanın amacına uygun olarak aşağıda belirtilen altı gruba ayrıldı:

Grup I: Adrenalektomi uygulanan (6 örnek)

Grup II: Adrenalektomi uygulanan + Karragenin inflamasyonu oluşturulan (7 örnek)

Grup III: Adrenalektomi uygulanan + Prednisolon zerk edilen + Karragenin inflamasyonu oluşturulan (7 örnek)

Grup IV: Adrenalektomi uygulanan + Adrenalin zerk edilen + Karragenin inflamasyonu oluşturulan (7 örnek)

Grup V: Karragenin ile inflamasyon oluşturulan intakt grup (5 örnek)

Grup VI: İntakt Grup (Kontrol Grubu) (5 örnek)

Grup I- IV dahilinde bulunan 27 adet sıçanın her birinin intraperitoneal olarak verilen 25 mg/kg dozda Sodyum tiyopental anestezisinden sonra lumbal bölgeleri tıraş edildi. Işıklı ortamda, ısıtıcı varlığında, ameliyathane şartlarında povidon iyot ile temizlenen tıraş edilmiş cilt yaklaşık 3 cm'lik orta hat kesisi ile açıldı. Lumbal vertebraların her iki yanından cilt altı dokusu yaklaşık 2 cm'lik kesi ile açılarak

retroperitoneal yerleşimli böbreklere ulaşıldı ve böbrek üstü bezleri bulundu. Adrenal bezler bilateral olarak makasla kesilerek çıkarıldı. Cilt altı dokusu ve cilt sırayla dikilerek kesi yerleri kapatıldı ve tekrar povidone iode ile silindi. Yapılan operasyon sonrası deney hayvanları kafeslerine konuldu. Bu grup hayvanlar bir hafta süre ile oda ısısı sürekli kontrol edilerek normal laboratuvar diyeti ve % 1'lik NaCl solüsyonu ile beslendi. Grup V ve VI'da bulunan 10 hayvan ise aynı ortamda aynı cins yem ve musluk suyu ile beslendi.

Operasyondan sonraki 8. gün sabah 11.00'de grup III'teki hayvanlara intraperitoneal olarak 5 mg/kg prednisolon enjekte edildi. Benzer işlem grup IV'teki hayvanlara 100 µg/kg dozda adrenalin enjeksiyonu ile gerçekleştirildi. Hemen arkasından grup II-V'de bulunan 26 hayvanın sağ ayak pençelerine 0.1 mL % 1'lik karragenin enjekte edildi, lokal inflamatuvar reaksiyonun oluşması için 4 saat kadar beklendi. Sonrasında tüm grup üyeleri dekapite edilerek sağ ayak pençeleri kesildi ve petri kutuları içerisinde buzlu ortama kondu.

3.3. Numunelerin Hazırlanması

Pençeler kemik dokusundan arındırıldıktan sonra 0.2 gr'lık üç parça doku tartıldı ve sırasıyla MPO tayini için % 0.5'lik HDTMAB içeren pH=6 olan potasyum fosfat tamponu, MDA tayini için % 1.15'lik KCl çözeltisi, diğer ölçümler için pH=7.5 olan fosfat tamponu içinde 2 ml'ye tamamlanarak buzlu ortamda homojenize edildi. Daha sonra +4°C'de 10000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı analiz numunesi olarak analiz edileceği güne kadar -80°C'de 3 ay süre ile saklandı.

3.4. Kullanılan Aletler ve Kimyasal Maddeler

Deneyler esnasında kullanılan tüm aletler Tablo 3.1'de verilmiştir. Kullanılan kimyasal maddelerin tümü analitik saflıkta olup Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan Alet ve Cihaz Bilgileri

Cihazlar	Ait Olduğu Firma
Santrifüj (Soğutmalı)	Heraeus 4600, Germany
Mikro Santrifüj	MSE, Micro Centaur, Sanyo, UK
Homojenizatör	OMNI International
Hassas Terazî	Sartorius AG Gottingen Tip No:BA 3105, Germany
Distile Su Cihazı	Easypure RF Compact Ultrapure Water System, USA
Karıştırıcı	Vortex-Geine, Model K550-EG Massachusetts, USA
Magnetik Karıştırıcı	Labincol 32, Netherlands
Plate Çalkalayıcı	IRMA Shaker, Labsan, USA
Su Banyosu	Nüve BM 101, Nüve Malz.San.Lim ve Tic.AŞ., Ankara
pH Metre	Jenway 3010 pH Meter, UK
Derin Dondurucu	Sanyo Ultra Low, Sanyo Electric Co Ltd., Japan
Otomatik Pipet	Finpipette Lasysystems, Finland
Spektrofotometre	Beckman DU 500, USA

Tablo 3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal Madde	Firması
Sodyum Fosfat Dibazik (NaH_2PO_4)	MERCK
Mixed Alkyl (Hexadecyl) Trimetyl Amonyum Bromid (HDTMAB)	SIGMA
4-Aminoantipyrine	SIGMA
Potasyum Fosfat Monobazik (KH_2PO_4)	FISHER
Potasyum Siyanür (KCN)	FISHER
Potasyum Ferri Siyanid ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)	FISHER
Potasyum Fosfat Dibazik (K_2HPO_4)	FISHER
Potasyum Klorür (KCl)	MERCK
Hidroklorik Asid (HCl)	MERCK
Etilendiamintetraasetikasit, Disodyum Tuzu (Na_2EDTA)	MERCK
Trikloro Asetik Asid (TCA, CCl_3COOH)	MERCK
Sodyum Hidroksit (NaOH)	MERCK
Sodyum Karbonat (Na_2CO_3)	MERCK
Sodyum Bikarbonat (NaHCO_3)	MERCK
Tiyobarbütirik Asid (TBA, $\text{C}_4\text{MH}_4\text{O}_2\text{N}_2\text{S}$)	MERCK
Hidrojen Peroksit (%30, H_2O_2)	MERCK
Trishidroxymethyl-aminomethan ($\text{C}_4\text{M}_{11}\text{NO}_3$)	MERCK
Glutasyon Redüktaz (GR, EC 1,6,4,2)	SIGMA
Glutasyon, Redükte Form (GSH, $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_{13}\text{S}_2$)	SIGMA
Ksantin ($\text{C}_5\text{H}_4\text{NaO}_2$)	SIGMA
Ksantin Oksidaz (XO, EC 1,1,3,22)	SIGMA
Nitroblue Tetrazolium ($\text{C}_{40}\text{H}_{30}\text{C}_{12}\text{N}_{10}\text{O}_6$)	SIGMA
NADPH, Tetrasodyum Salt, Redükte Form ($\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{P}_3\text{Na}_4$)	SIGMA
Bovine Serum Albumin	SIGMA
Amonyum Sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	SIGMA
Karragenin	SIGMA
Sülfanilamid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$)	SIGMA
Fosforik Asit (H_3PO_4)	MERCK
N-1 naftiletilediamin ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2 \cdot 2\text{HCl}$)	SIGMA
Asetik Asit (CH_3COOH)	RIEDEL-DE- HAËN

3.5. Kimyasal Parametrelerin Tayini

3.5.1. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Tayini

Prensip: GPx enzimi, H_2O_2 varlığında H_2O_2 'i suya indirgerken redükte glutasyonun okside glutatyona (GSSG) yükseltgenmesi reaksiyonunu katalizler. Burada oluşan GSSG, NADPH'ın indirgeyici substrat olarak kullanıldığı glutasyon redüktaz reaksiyonuyla tekrar GSH'a indirgenir. Bu sırada NADH'ın NADP'ye yükseltgenmesi ile oluşan absorbans azalışı 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek GPx enzim aktivitesi hesaplanır⁷¹.

Kullanılan Reaktifler:

- Fosfat tamponu: 50 mM, 5mM EDTA'lı, pH 7.5
- Redükte Glutasyon (GsH): 150 mM
- Glutasyon Redüktaz
- NADPH: 8.4 mM
- NaN_3 : 1.125 M
- H_2O_2 : 2 mM

Deneyin Yapılışı:

Deney gününe kadar $-80^\circ C$ 'de saklanan homojenatlar çözündürüldükten sonra bir kez daha $+4^\circ C$ 'de 6000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve berrak süpernatant kısım numune olarak kullanıldı. Paglia ve Valentine'den⁷¹ alınan metoda uygun olarak çalışma prosedürü tablo 3.3'de gösterildiği gibi uygulandı.

Tablo 3.3. GPx Çalışma Prosedürü

<i>Reaktifler</i>	<i>Numune Tüpü</i>	<i>Kör Tüpü</i>
Fosfat tamponu	2.650 mL	2.650 mL
GsH	100 µL	100 µL
NADPH	100 µL	100 µL
NaN ₃	10 µL	10 µL
Glutasyon Redüktaz	10 µL	10 µL
Distile Su	-	20 µL
Numune	20 µL	-
Vortexle karıştırıldıktan sonra 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.		
H ₂ O ₂	100 µL	100 µL

Reaktiflerin tamamının ilavesinden sonra numunelerin 3 dakikalık absorbans değişimleri 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Buna göre de GPx aktivitesi belirlendi.

Hesaplama:

$$\text{EnzimAktivitesi (IU/L)} = \frac{\Delta A/t \times 10^6}{\varepsilon} \times \text{SK}$$

$\Delta A/t$: Dakikadaki absorbans değişimi

ε : NADPH'in 340 nm'deki molar absorbtivite katsayısı (6.22×10^3)

SK: Seyreltme katsayısı

10^6 : Molü, mikromole çevirme katsayısı (aktiviteyi ünite cinsinden ifade edebilmek için)

Spesifik aktivite;

$$\text{GPx (IU/mg protein)} = \frac{\text{GPx (IU/L)}}{\text{Doku Proteini (mg/L)}}$$

3.5.2. Glutatyon S-Transferaz Aktivitesinin Tayini

Prensip: Sitolik ve mikrozomal total GST aktivitesi 1-chloro 2,4 dinitro benzen ile redükte glutatyonun konjugasyonu esasına dayanarak ölçüldü. Bileşiğin 340 nm dalga boyunda verdiği absorbans artışı tespit edildi, bu GST aktivitesi ile doğru orantılıdır⁷⁶.

Kullanılan Reaktifler:

- K-Fosfat Tamponu: 0.1 M, pH 6.5
- Triton-x-100: % 0.66
- 1-Chloro 2-4 dinitrobenzen (CDNB): 5 mg/ml ethanol içinde
- Redükte Glutatyon (GSH): 46 mg/ml

Deneyin Yapılışı:

Tablo 3.4'de belirtildiği üzere hazırlanan ölçüm reaktifleri 37°C'de 3 dakika inkübe edildi. Deney gününe kadar -80°C'de saklanarak, çözündürüldükten sonra bir kez daha +4°C'de 6000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilen ve berrak süpernatant kısmı numune olarak kullanılan homojenatların ilavesiyle 3 dakikalık absorbans değişimleri spektrofotometrik olarak ölçüldü⁷⁶.

Tablo 3.4. GST Çalışma Prosedürü

<i>Reaktifler</i>	<i>Numune Tüpü</i>	<i>Kör Tüpü</i>
K-Fosfat Tamponu	905 µL	905 µL
GSH	25 µL	25 µL
Triton-x-100	25 µL	25 µL
CDNB	20 µL	20 µL
37°C'de 3 dakika inkübe edildi.		
Numune	25 µL	-
K-Fosfat Tamponu	-	25 µL

Hesaplama:

Enzim Aktivitesi:

$$\text{GST (IU/mL)} = \frac{\Delta A/t \times \text{Küvetteki total hacim} \times \text{Homojenizasyon için dilüsyon faktörü}}{9.6 \times \text{Numune hacmi}}$$

 ΔA : Absorbans değişimi

9.6= Molar absorbtivite katsayısı

Spesifik Aktivite:

$$\text{GST(U/mg protein)} = \frac{\text{GST (U/mL)}}{\text{Doku Proteini (mg/mL)}}$$

3.5.3. Miyeloperoksidaz Aktivitesinin Tayini

Prensip: Miyeloperoksidaz enziminin aktivitesinin belirlenmesinde, substrat olarak 4-aminoantipyrine/fenol solüsyonunun yer aldığı MPO aracılı H_2O_2 ile yapılan oksidasyon reaksiyonu kullanılmıştır¹³⁷.

Kullanılan Reaktifler:

- 4-aminoantipyrine (4-AAP): 25 mM, %2'lik fenol içinde çözülmüş
- %0.5 hexadecyltrimethyl ammonium bromid (HDTMAB)
- H_2O_2
- K- Fosfat Tamponu: 50 mM, pH 6

Deneyin Yapılışı:

%0.5'lik HDTMAB içeren potasyum fosfat tamponu ile homojenize edilen dokular $+4^\circ\text{C}$ 'de 3500 rpm'de 60 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı alındı.

Numune olarak kullanılacak bu kısım deney gününe kadar -80°C'de saklandı.

Numuneler çözdürüldükten sonra tablo 3.5'teki çalışma prosedürü uygulandı.

Tablo 3.5. MPO Çalışma Prosedürü

<i>Reaktifler</i>	<i>Numune Tüpü</i>	<i>Kör Tüpü</i>
4-AAP	1.3 mL	1.3 mL
H ₂ O ₂	1.5 mL	1.5 mL
3-4 dakika beklenecek bazal hıza erişim sağlanır.		
Numune	0.2 mL	-
Deiyonize su	-	0.2 mL

Tüpler vortekslendi. 510 nm dalga boyunda köre karşı 5 dakika boyunca absorbans artışı ölçüldü. Lineer aktivite artışının gözlemlendiği absorbans değerleri üzerinden hesaplama yapıldı.

Hesaplama:

$$\Delta \text{Absorbans} \times 3/0.2 \times \text{SK}$$

$$\text{MPO (U/L)} = \frac{\text{MPO (mU/L)}}{\Delta t}$$

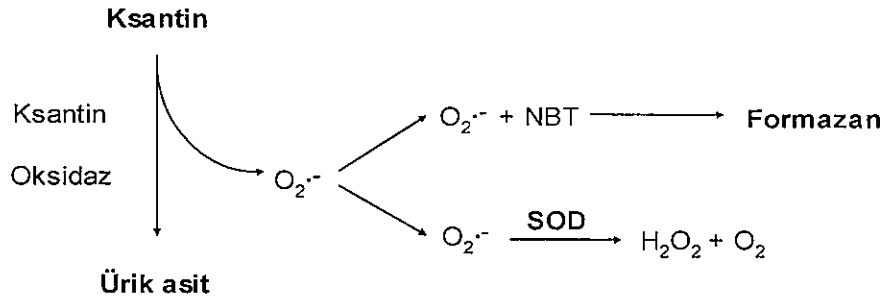
SK: Homojenizasyon için dilüsyon faktörü

$$\text{MPO (mU/mg protein)} = \frac{\text{MPO (mU/L)}}{\text{Doku proteini (mg/L)}}$$

Formülleriyle hesaplama yapılarak 1 Ünite MPO aktivitesi 25°C'de 1 mmol H₂O₂'yi parçalayan enzim olarak belirlendi.

3.5.4. Cu/Zn Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Tayini

Prensip: Reaksiyon ortamına eklenen Ksantin Oksidaz enzimi aracılığıyla üretilen $O_2^{\cdot-}$ radikallerinin reaksiyon ortamında bulunan nitroblue tetrazolium'u (NBT) indirgemesi ile meydana gelen mor renkli bir bileşik olan formazanın absorbandsınının 560 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanır⁷². İndirgenme reaksiyonunun şiddeti numunede bulunan Cu/Zn SOD enziminin aktivitesine bağlıdır. Ortamda ne kadar çok enzim bulunursa, şekil 3.1'de görüleceği gibi, NBT ile reaksiyona girecek $O_2^{\cdot-}$ radikali o kadar az olur. Böylece formazan varlığıyla ortaya çıkan mor rengin şiddeti de o kadar azalır.



Şekil 3.1. Formazan oluşumu ve SOD ile inhibisyon

Kullanılan Reaktifler:

- Ölçüm Reaktifi: * 0.3 mM Ksantin
 - * 0.6 mM EDTA (Disodyum tuzu)
 - * 150 μ M NBT
 - * 0.4 M Na_2CO_3
 - * 1gr/L Bovine serum albümin
- Ksantin oksidaz: 167 U/L
- $(NH_4)_2SO_4$: 2 M

Deneyin Yapılışı:

Deney gününe kadar -80°C 'de saklanan homojenatlar çözündürüldükten sonra bir kez daha $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 6000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve berrak süpernatant kısım numune olarak kullanıldı. Tablo 3.6'da gösterildiği gibi reaktifler aktarıldı.

Tablo 3.6. Cu/Zn SOD Çalışma Prosedürü

<i>Reaktifler</i>	<i>Numune Tüpü</i>	<i>Kör Tüpü</i>
Ölçüm Reaktifi	2.45 mL	2.45 mL
Numune	100 μL	-
Bidistile su	-	100 μL
Ksantin oksidaz	50 μL	50 μL
Tüpler iyice karıştırıldı ve 25°C 'de 20 dakika inkübe edildi		

Deney tüpleri birer dakika aralıklarla inkübasyona bırakılarak inkübasyon süresinin sonunda 560 nm dalga boyunda absorbanları ölçüldü.

Hesaplama:

Yapılan deneyde NBT'nin indirgenme hızındaki %50'lik inhibisyon oranı 1 SOD ünitesi olarak kabul edildi. Buna göre numunede bulunan SOD enziminin meydana getirdiği % inhibisyon ve enzim aktivite değeri aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(\text{Absorbans}_{(\text{Kör})} - \text{Absorbans}_{(\text{Numune})}) \times 100}{\text{Absorbans}_{(\text{Kör})}}$$

% İnhibisyon

$$\text{Enzim Aktivitesi (U/mL)} = \frac{\text{SOD (U/mL)}}{50 \times \text{Numune hacmi (mL)}}$$

$$\text{Spesifik Aktivite (U/mg protein)} = \frac{\text{SOD (U/mL)}}{\text{Doku proteini (mg/mL)}}$$

3.5.5. Nitrik Oksit Tayini

Prensip: NO çok kısa ömürlü bir radikaldir ve hızla NO_2^- ile NO_3^- 'a okside olmaktadır. Bu deneyde, ortamda bulunan NO_3^- 'ın NO_2^- 'e indirgenmesinden sonra NO ölçümü gerçekleştirildi⁷³.

Kullanılan Reaktifler:

- ZnSO_4 : 300 gr/L
- Griess Reaktifi: 500 mL distile su içinde
 - * 0.5 gr Sulfonilamid
 - * 12.5 gr Fosforik Asit
 - * 0.05 gr Naphtylendiamine
- NADPH: 50 μmol
- FAD: 5 μmol
- Nitrat Redüktaz: 200 U/L

Deneyin Yapılışı:

Deney gününe kadar -80°C 'de saklanan süpernatantlar çözdürüldükten sonra Tablo 3.7'de bulunan çalışma prosedürüne tabii tutuldu.

Tablo 3.7. NO Çalışma Prosedürü

<i>Reaktifler</i>	<i>Numune Tüpü</i>	<i>Kör Tüpü</i>
Numune	100 µL	-
Bidistile su	400 µL	500 µL
NADPH	100 µL	100 µL
FAD	100 µL	100 µL
Nitrat redüktaz	20 µL	20µL
37°C'de 20 dakika inkübe edildi		
ZnSO ₄	36 µL	36 µL

Deproteinizasyon işlemi böylece gerçekleştirildi. Bu karışım 1000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Oluşan süpernatant kısım bundan sonrası için numune ve kör tüpleri için ayrı ayrı numune olarak kullanıldı.

Süpernatant	100 µL	100 µL
Griess Reaktifi	100 µL	-
Metafosforik Asit	-	100 µL
10 dakika oda sıcaklığında bekletildi		

Bu işlemler sonucunda oluşan pembe renkli kompleksin absorbansı 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede okutuldu.

Hesaplama:

Elde edilen sonuçlar, süpernatant yerine potasyum nitrat stok çözeltisinin bir seri dilüsyonu ile hazırlanan farklı konsantrasyonlarının kullanıldığı standartların

absorbanslarına göre oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi yardımı ile hesaplandı. NO sonuçları gr yaş doku başına μmol cinsinden ifade edildi.

3.5.6. Malondialdehit Tayini

Prensip: Yüksek sıcaklıkta (95°C 'de) tiyobarbitürik asit (TBA) ile MDA'nın oluşturduğu pembe renkli kompleksin absorbansının 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır⁷⁴.

Kullanılan Reaktifler:

- Sodyum Dodesil Sülfat (SDS): %8.1
- Asetik asit: %20, pH 3.5 (NaOH ile ayarlandı)
- TBA: %8
- N-Bütanol/ Piridin (15/1)

Deneyin Yapılışı:

Deney gününe kadar -80°C 'de saklanarak, çözdürüldükten sonra bir kez daha $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 6000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve berrak süpernatant kısmı numune olarak kullanıldı. Tablo 3.8'de gösterilen, Okhawa ve arkadaşlarının tariflediği metodla MDA tayini yapıldı⁷⁵.

Tablo.3.8. Pençe Dokusunda MDA Çalışma Prosedürü

<i>Reaktifler</i>	<i>Numune Tüpü</i>	<i>Kör Tüpü</i>
Numune	0.2 mL	-
SDS Çözeltisi	0.2 mL	0.2 mL
Asetik Asit Çözeltisi	1.5 mL	1.5 mL
TBA Çözeltisi	1.5 mL	1.5 mL
Saf Su	0.8 mL	0.8 mL
95°C'de bir saat inkübe edilerek musluk suyu ile soğutuldu. Sonrasında,		
Saf Su	1 mL	1 mL
N-Bütanol/ Piridin	5 mL	5 mL
Vortexle karıştırıldı ve 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.		

Santrifüj sonrası oluşan organik fazın absorbanı 532 nm dalga boyunda köre karşı okutuldu. İşlemler sırasında numune ve kör tüpü olarak kapaklı tüp kullanıldı.

Hesaplama:

$$\text{MDA } (\mu\text{mol /L}) = \frac{\text{Absorbans} \times 10^6}{1.52 \times 10^5} \times \text{SK}$$

1.52×10^5 : Molar absorbtivite katsayısı

SK: Seyreltme Katsayısı

10^6 : Molü mikromole çevirme katsayısı

Hesaplanan ölçüm birimi nmol/gr yaş doku olarak ifade edildi.

3.5.7. Dokuda Protein Tayini

Prensip: Bradford Metodu'na¹³⁸ göre tanımlanmıştır. Protein miktarının tespiti, negatif yüklü Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB)'nin protein üzerindeki pozitif yüklere bağlanmasıyla oluşan mavi renkli kompleksin absorbanının 595 nm dalga boyunda okutulması esasına dayanır.

Kullanılan Reaktifler:

- CBB Çözeltisi: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL %95'lik etil alkol içinde çözülür. 100 mL %85'lik fosforik asit eklenerek hacmi litreye tamamlanır.
- Standart: Bovine serum albümininden 100 mg/dL konsantrasyonda stok standart hazırlandı. Daha sonra seyreltme yapılarak değişik konsantrasyonlarda elde edilen BSA çözeltileri standart olarak kullanıldı.

Deneyin Yapılışı:

Deney gününe kadar -80°C 'de saklanan homojenatlar çözdürüldükten sonra bir kez daha $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 6000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve berrak süpernatant kısım numune olarak kullanıldı. Tablo 3.9'da gösterildiği gibi reaktifler aktarılarak protein tayini yapıldı.

Tablo.3.9. Bradford Yöntemiyle Dokuda Protein Tayini

<i>Reaktifler</i>	<i>Numune Tüpü</i>	<i>Kör Tüpü</i>	<i>Standart Tüpü</i>
Numune	0.1 mL	-	-
Standart	-	-	0.1 mL
Distile Su	-	0.1 mL	-
CBB Çözeltisi	5 mL	5 mL	5 mL
Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyon			

595 nm dalga boyunda absorbanlar köre karşı okutuldu. Standart grafik çizilerek hesaplama yapıldı. Sonuç gr/L olarak kaydedildi. Ancak diğer parametre sonuçları hesaplanırken uygun birimlere çevrildi.

4- VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Elde edilen sonuçlar “ortalama değer \pm standart sapma” ($\bar{x} \pm SD$) olarak ifade edildi. Gruplar arası farkın önemlilik derecesi one-way ANOVA testi kullanılarak ifade edildi. Takibinde Fisher’s post-hoc LSD (least significant differences) yapıldı. Korelasyon analizi için Sunderman testi kullanıldı. Tüm istatistiksel işlemler için “SPSS for Windows, 11.5” istatistik paket programı kullanıldı ve $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

5- BULGULAR

Bu çalışmada ağırlıkları ortalama 195 ± 15 gr olan 37 adet Albino Wistar cinsi erkek sıçan kullanıldı. Deney hayvanları 6 farklı gruba ayrıldı. Uygulanan adrenalektomi ve lokal inflamasyonun oksidasyona etkisi, antioksidan cevap oluşturan enzimler üzerine etkisi ve haricen verilen glukokortikoid ile adrenalinin cevap üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı. Buna yönelik olarak oluşturulan gruplar, bu gruplarda yer alan hayvanların pençe dokusu homojenatları hazırlanarak bakılan MDA ve NO düzeyleri, SOD, GPx, GST ve MPO aktivitelerine ait $\text{mean} \pm \text{SD}$, median, min-maks değerleri Tablo 5.1’de verildi. Gruplar arasında bu parametreler açısından fark olup olmadığı Tablo 5.2’de verildi. Grup içi farklı parametre ölçüm değerlerinin birbirleriyle korelasyonları da Tablo 5.3’de sunuldu.

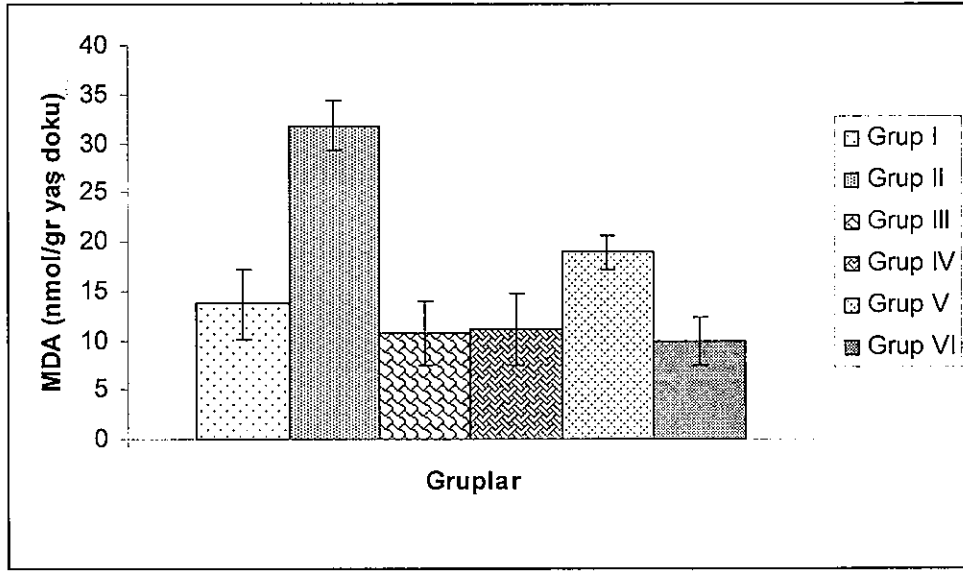
Tablo 5.1’de görüldüğü gibi en yüksek MDA değerleri grup II’de (adrenalektomi + karragenin grubu) ve en düşük değerler kontrol grubu olan grup VI’da (intakt grup) saptandı. Grup III (adrenalektomi + prednisolon + karragenin grubu) ve IV’de (adrenalektomi + adrenalin + karragenin grubu) ise birbirine yakın değerler elde edildi. İstatistiksel olarak MDA değerleri adrenalektomili grup ile intakt grup arasında $p < 0.05$, grup IV ile $p < 0.01$ ve grup II ile $p < 0.001$ düzeyinde farklılık vardı. Adrenalektomi + karragenin grubunda (grup II) en yüksek MDA değerleri (31.8 ± 2.5 nmol/gr yaş doku) elde edilmiş olup diğer gruplarla fark $p < 0.001$ düzeyinde saptandı. Buna karşın grup III ve IV ile intakt grup arasında MDA açısından fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$). İntakt grup ile intakt + karragenin grubu arasındaki fark ise oldukça anlamlıydı ($p < 0.001$). (Tablo 5.2 – Şekil 5.1)

Tablo 5.1. Siçan Pence Dokusuna Ait Ölçüm Değerleri Tablosu

	n		MDA (mmol/gr yaş doku)	NO (μ mol/gr yaş doku)	SOD (U/mg protein)	GPx (IU/mg protein)	GST (U/mg protein)	MPO (mU/mg protein)
I. Adrenalektomi grubu		Mean \pm SD	13.7 \pm 3.5	109.5 \pm 12.4	12.3 \pm 3.6	0.46 \pm 0.13	0.86 \pm 0.25	0.30 \pm 0.091
		Median	13.5	110.6	12.2	0.4	0.8	0.3
		Min - Max	9.85-19.87	89.70-126.80	6.33-17.24	0.35-0.64	0.50-1.23	0.23-0.49
II. Adrenalektomi + Karragenin grubu		Mean \pm SD	31.8 \pm 2.5	294.8 \pm 29.6	8.5 \pm 2.5	0.17 \pm 0.09	0.50 \pm 0.14	0.58 \pm 0.29
		Median	31.6	298.1	9	0.1	0.5	0.5
		Min - Max	29.36-36.52	242.30-335.70	5.64-11.69	0.09-0.37	0.40-0.80	0.35-1.21
III. Adrenalektomi + Prednisolon + Karragenin grubu		Mean \pm SD	10.7 \pm 3.2	97.9 \pm 11.7	23.3 \pm 3.4	0.58 \pm 0.27	1.43 \pm 0.46	0.21 \pm 0.059
		Median	9.4	99.1	24.9	0.5	1.6	0.2
		Min - Max	6.98-16.40	76.90-112.70	18.59-27.31	0.26-1.06	0.76-1.92	0.12-0.30
IV. Adrenalektomi + Adrenalin + Karragenin grubu		Mean \pm SD	11.1 \pm 3.6	100.3 \pm 11.1	23.0 \pm 3.3	0.57 \pm 0.23	1.35 \pm 0.42	0.26 \pm 0.081
		Median	11.4	98.8	24.3	0.6	1.3	0.3
		Min - Max	7.12-16.94	86.90-121.70	18.22-26.83	0.28-0.94	0.78-2.15	0.18-0.39
V. İntakt + Karragenin grubu		Mean \pm SD	18.9 \pm 1.8	184.6 \pm 15.4	18.1 \pm 2.0	0.42 \pm 0.15	0.65 \pm 0.21	0.50 \pm 0.12
		Median	18.7	184	17.3	0.3	0.6	0.5
		Min - Max	16.80-20.80	164.70-204.50	16.62-21.67	0.31-0.66	0.46-0.96	0.32-0.64
VI. İntakt grup		Mean \pm SD	9.9 \pm 2.5	92.2 \pm 17.5	25.0 \pm 4.7	0.50 \pm 0.19	0.59 \pm 0.20	0.16 \pm 0.051
		Median	9.6	90.5	23.7	0.5	0.5	0.1
		Min - Max	7.80-13.80	65.80-112.20	20.46-30.14	0.30-0.73	0.39-0.89	0.12-0.25

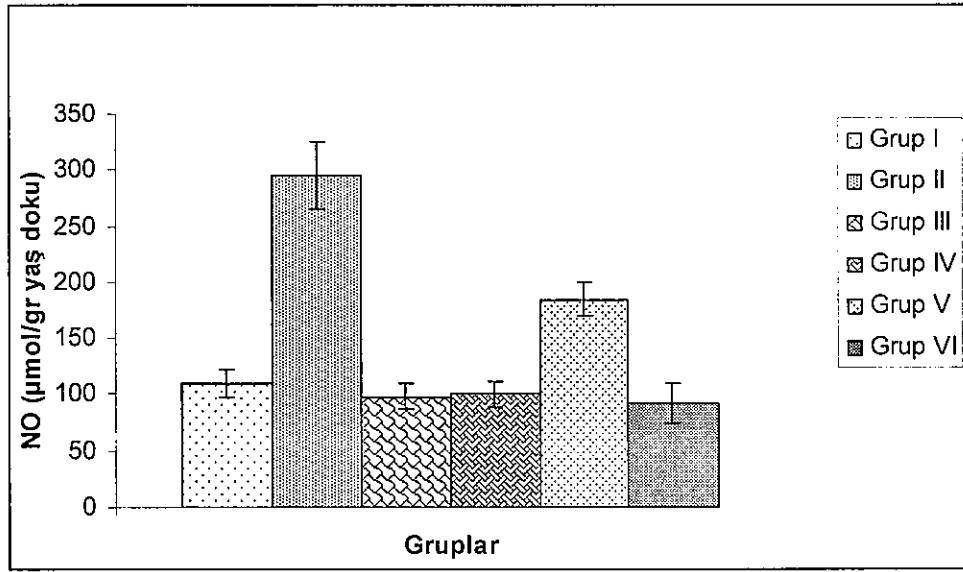
Tablo 5.2. Gruplar Arası Fark / “p” Değerleri Tablosu

GRUPLAR	MDA	NO	SOD	GPx	GST	MPO
I-II	0.0001	0.0001	0.049	0.013	0.051	0.002
I-III	0.074	n.s.	0.0001	n.s.	0.002	n.s.
I-IV	n.s.	n.s.	0.0001	n.s.	0.009	n.s.
I-V	0.008	0.0001	0.007	n.s.	n.s.	0.042
I-VI	0.042	n.s.	0.0001	n.s.	n.s.	n.s.
II-III	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
II-IV	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
II-V	0.0001	0.0001	0.0001	0.037	n.s.	n.s.
II-VI	0.0001	0.0001	0.0001	0.006	n.s.	0.0001
III-IV	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
III-V	0.0001	0.0001	0.013	n.s.	0.0001	0.003
III-VI	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.0001	n.s.
IV-V	0.0001	0.0001	0.018	n.s.	0.001	0.013
IV-VI	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.0001	n.s.
V-VI	0.0001	0.0001	0.003	n.s.	n.s.	0.001



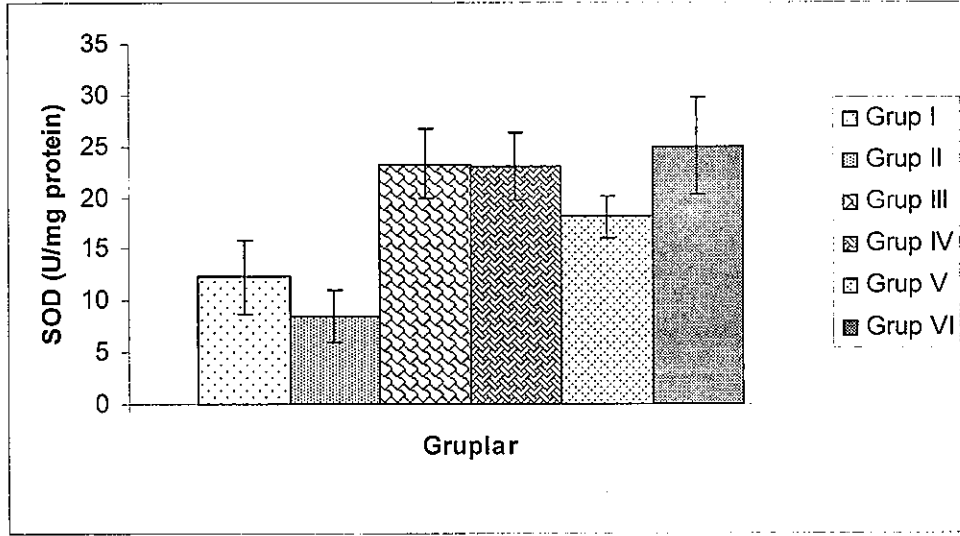
Şekil 5.1. MDA Ölçümlerinin Gruplara Göre Dağılımı

Pençe ödemi oluşturulan deneklerdeki inflamatuvar doku NO düzeyleri irdelendiğinde; MDA'da olduğu gibi en yüksek $\bar{x} \pm SD$ grup II'de (adrenalektomi + karragenin grubu) ve en düşük düzey ise intakt grupta (VI) ölçüldü. Grup I, III ve IV'ün değerleri ise birbirine yakındı (Tablo 5.1). NO açısından gruplar kıyaslandığında; adrenalektomili grup, inflamasyonun da eşlik ettiği grup II ve adrenalektomi olmaksızın inflamasyon oluşturulan grup V'den oldukça düşük NO değerlerine sahipti ($p < 0.001$). Buna ilaveten grup I ile III, IV ve V. gruplar arasındaki fark anlamsızdı. Yine MDA parametresinde olduğu gibi grup II (adrenalektomi + karragenin grubu) bütün gruplar içinde en yüksek doku NO düzeylerine sahipti. Ve diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak önemli bir farklılık gösterdi (hepsi için $p < 0.001$). Grup III ile IV arasındaki fark anlamlı değildi. (Tablo 5.2 – Şekil 5.2)



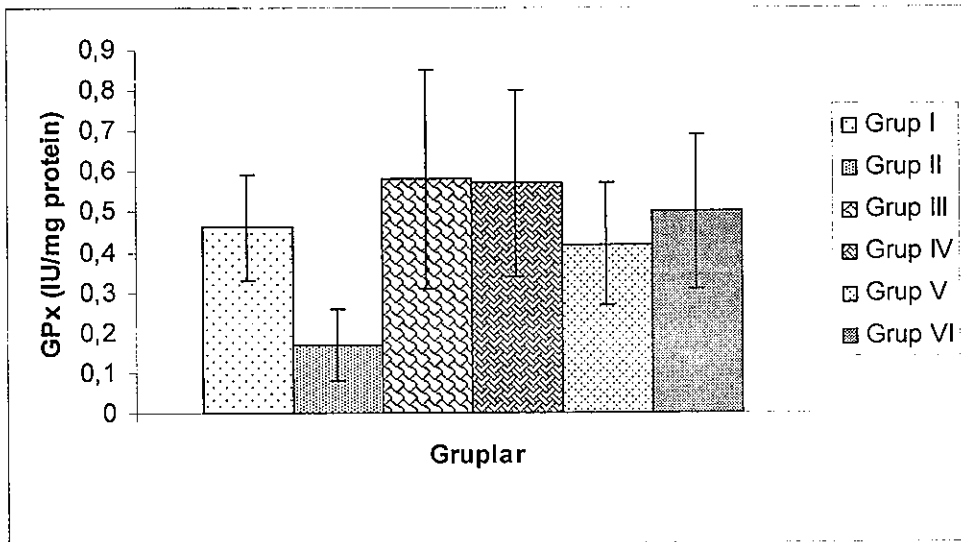
Şekil 5.2. NO Ölçümlerinin Gruplara Göre Dağılımı

Doku SOD aktivite sonuçları karşılaştırıldığında, en yüksek değer (25.0 ± 4.7 U/mg protein) intakt gruba ve en düşük $\bar{x} \pm SD$ ise adrenaletomi + karragenin grubuna (8.5 ± 2.5 U/mg protein) aitti. Grup I ile II arasında sınırda farklılık var iken ($p=0.049$) yine grup I ile III ve IV. gruplar arasında anlamlı farklılıklar vardı ($p<0.001$). En düşük SOD değeri adrenaletomi + karragenin grubuna ait olup diğer gruplarla kıyaslandığında ise fark istatistiksel olarak çok anlamlıydı ($p<0.001$). İntakt grup ile intakt + karragenin grupları arasındaki fark orta derecede idi ($p<0.01$). Yine intakt + karragenin grubu ile hem prednisolon hem de adrenalin alan gruplardaki fark zayıftı ($p<0.05$). (Tablo 5.2 – Şekil 5.3)



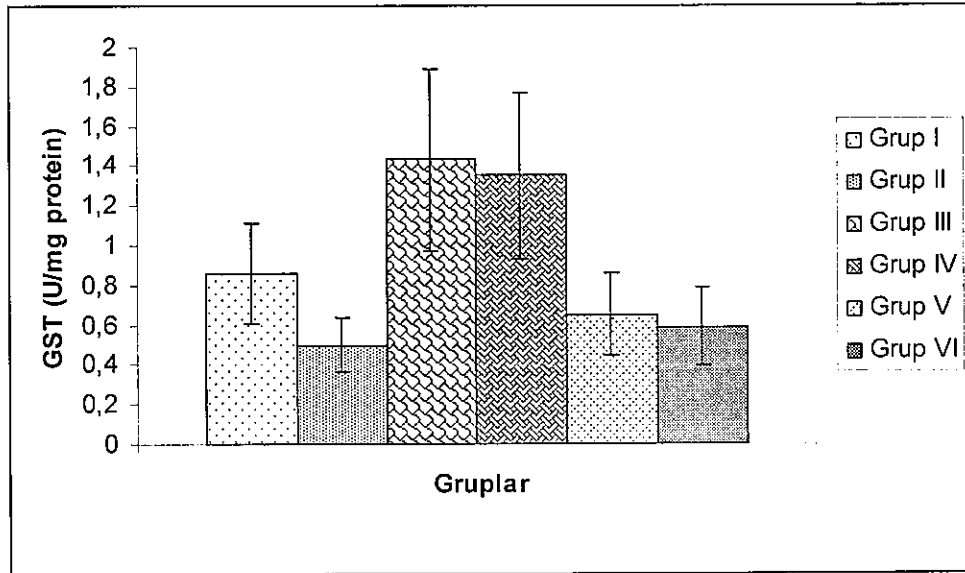
Şekil 5.3. SOD Ölçümlerinin Gruplara Göre Dağılımı

Doku GPx aktivitesi en yüksek III ve IV. gruplarda saptandı. En düşük değer ise (0.17 ± 0.09 IU/mg protein) adrenalectomi + karragenin grubuna (II) aitti. Bu parametre ile ilgili olarak grup karşılaştırmalarında sadece grup II ile diğer gruplar arasında anlamlı farklılıklar bulundu (grup III ile $p < 0.001$, IV ve VI ile $p < 0.01$ ve grup V ile $p < 0.05$ düzeyinde). (Tablo 5.2 – Şekil 5.4)



Şekil 5.4. GPx Ölçümlerinin Gruplara Göre Dağılımı

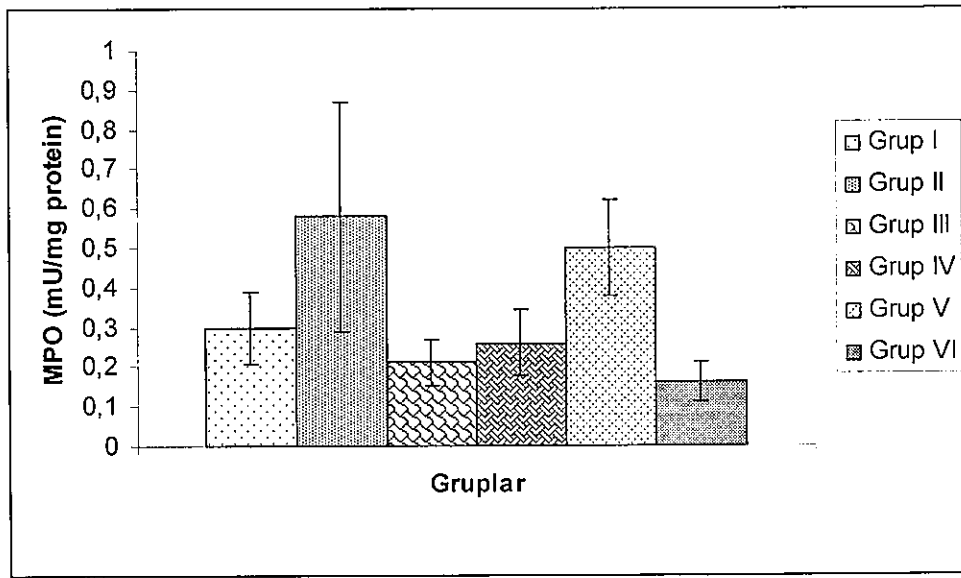
Antioksidan savunma sisteminin önemli parametrelerinden GST açısından en yüksek değer (1.43 ± 0.46 U/mg protein) grup III'de (adrenalektomi + prednisolon + karragenin grubu) ve en düşük değer (0.50 ± 0.14 U/mg protein) grup II'de (adrenalektomi + karragenin grubu) tespit edildi. Grup III ile grup IV'ün değerleri birbirine yakındı. Grupların karşılaştırılmasında ise grup II ile III ve IV arasında önemli farklılıklar varken V ve VI ile herhangi bir fark yoktu. Hem prednisolon hem de adrenalın verilen grupların değerleri intakt ve intakt + karragenin gruplarına göre anlamlı derecede yüksekti (yalnızca IV-V $p < 0.01$ diğerleri $p < 0.001$). (Tablo 5.2 – Şekil 5.5)



Şekil 5.5. GST Ölçümlerinin Gruplara Göre Dağılımı

İnflamasyonun bağımsız bir göstergesi olan MPO düzeyleri incelendiğinde; en yüksek değer (0.58 ± 0.29 mU/mg protein) adrenalektomi + karragenin grubunda ve en düşük değer (0.16 ± 0.051 mU/mg protein) hiçbir işlem yapılmayan intakt grupta ölçüldü. Grup I ile V arasında ve IV ile V arasındaki farklar $p < 0.05$ düzeyinde iken, V-

VI, V-III ve I-II arasındaki farklar $p < 0.01$ düzeyinde idi. Adrenalektomi + karragenin grubu hem adrenalın hem de prednisolon gruplarına göre oldukça yüksek MPO değerlerine sahipti ($p < 0.001$). Diğer yandan hem adrenalın hem de prednisolon gruplarının MPO değerleri intakt gruba göre anlamlı bir fark oluşturmamaktaydı ($p > 0.05$). (Tablo 5.2 – Şekil 5.6)



Şekil 5.6. MPO Ölçümlerinin Gruplara Göre Dağılımı

Yapılan korelasyon analizlerinde, I. grupta (adrenalektomi grubu) NO-MDA ($r = 0.89$) ve NO-MPO ($r = 0.94$) arasında pozitif korelasyon varken NO-SOD ($r = -0.94$), SOD-MDA ($r = -0.67$) ve SOD-MPO ($r = -0.83$) arasında çeşitli düzeylerde negatif korelasyon vardı.

II. grupta NO-SOD, SOD-MDA, SOD-MPO, MDA-GST, GST-MPO ve GPx-MPO arasında negatif korelasyonlar; NO-MDA, NO-MPO, SOD-GST, SOD-GPx, MDA-MPO ve GST-GPx arasında da pozitif korelasyonlar mevcuttu (Tablo 5.3).

III. grupta, sadece MDA-NO ($r = 0.86$), MDA-MPO ($r = 0.78$) arasında zayıf pozitif (her ikisi için $p < 0.05$) ve NO-MPO ($r = 0.93$) arasında ise orta derecede pozitif korelasyonlar vardı ($p < 0.01$).

IV. grupta, MPO-GST arasında zayıf negatif korelasyon varken, NO-MDA, NO-MPO ve MDA-MPO arasında çeşitli derecelerde pozitif ilişki saptandı (Tablo 5.3).

V. grupta, NO-MPO arasında zayıf pozitif, NO-SOD ve SOD-MDA arasında zayıf negatif ilişki tespit edildi (hepsi için $p < 0.05$)

VI. grupta ise sadece MDA ile MPO arasında zayıf ilişki bulundu ($r = 0.9 / p < 0.05$)

Tablo 5.3 Korelasyonlar

I.grup	r=	p=
NO-MDA	0.89	0.042
NO-MPO	0.94	0.005
NO-SOD	-0.94	0.005
SOD-MDA	-0.67	0.023
SOD-MPO	-0.83	0.042
II.grup		
NO-SOD	-0.93	0.003
NO-MDA	0.89	0.007
NO-MPO	0.86	0.014
SOD-MDA	-0.82	0.023
SOD-GST	0.86	0.036
SOD-GPX	0.77	0.036
SOD-MPO	-0.78	0.036
MDA-GST	-0.89	0.007
MDA-MPO	0.96	0.0001
GST-GPX	0.75	0.052
GST-MPO	-0.77	0.036
GPX-MPO	-0.86	0.014
III.grup		
NO-MDA	0.86	0.014
NO-MPO	0.93	0.003
MDA-MPO	0.78	0.036
IV.grup		
NO-MDA	0.86	0.014
NO-MPO	0.89	0.007
MDA-MPO	0.96	0.0001
GST-MPO	-0.78	0.036
V.grup		
NO-SOD	-0.9	0.037
NO-MPO	0.9	0.037
SOD-MDA	-0.9	0.037
VI.grup		
MDA-MPO	0.9	0.037

6- TARTIŞMA

Bilindiği üzere canlı organizmalarda oksidan ve antioksidan olaylar denge halinde bulunurlar. Ancak çeşitli etkilerle oksidan durumlar ve antioksidan savunma sistemi arasında bir dengesizlik ortaya çıkar. Bu da oksidatif strese neden olur. Oksidatif stres kaynakları çoğunlukla serbest radikaller olmaktadır. Serbest radikal, oksidan molekül veya en doğru adlandırma ile reaktif oksijen türleri, atomik veya moleküler yapılarında eşlenmemiş tek elektron içeren ve bu nedenle reaktif özellikler taşıyan moleküllerdir³⁷.

Serbest radikallerin intrasellüler ileti yolları, bazı transkripsiyon faktörlerinin aktivitesi gibi fizyolojik olaylarda görev aldığı ya da mikrobiyal ajanlara karşı savunma sisteminde etkili olduğu bilinmektedir¹⁰⁷. Yapılan bir çalışmada nöronlardaki oksidatif stres ve hasarın membran lipidleri, proteinler ve DNA gibi hücrenel komponentlere karşı serbest radikal ataklarıyla oluştuğu ve bu hasarın çeşitli hücre içi mekanizmalarla reaktif oksijen türleri üretiminin artışıyla korelasyonu olduğu gösterilmiştir¹⁰⁸. Oksidatif strese karşı en erken bulgunun da serbest radikallerin membranlarda yaptığı değişiklikler olduğu düşünülmektedir. Bu etkilerden biri membran lipid peroksidasyonudur^{109,110}.

Hücrelerde oksidatif hasarı önleyen, kısmen azaltan ya da yok eden bazı mekanizmalar vardır. Bunlar enzimler ya da enzimatik olmayan (vitaminler, karotenoidler, fenolik yapılar gibi) doğal antioksidanlar ve ilaç olarak etkili, doğal olmayan antioksidanlardır³⁷.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda adrenal gland yokluğu ve lokal inflamasyonun oksidatif stres ve antioksidan parametreler üzerine etkilerinin gösterilmesi amaçlanarak deneysel bir model oluşturuldu. İntakt ve adrenaletomili sıçanlarda karrageninle oluşturulan inflamasyonlu pençe dokusunda MDA, NO, SOD, GPx, GST ve MPO

düzeyleri ölçüldü. Deney sonuçları intakt ve adrenaletomili sıçanların inflamasyonlu pençe dokusunda oksidan ve antioksidan parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu gösterdi.

Gruplar altı farklı şekilde (*Grup I*: Adrenaletomi uygulanan, *Grup II*: Adrenaletomi uygulanan + Karragenin inflamasyonu oluşturulan, *Grup III*: Adrenaletomi uygulanan + Prednisolon zerk edilen + Karragenin inflamasyonu oluşturulan, *Grup IV*: Adrenaletomi uygulanan + Adrenalin zerk edilen + Karragenin inflamasyonu oluşturulan, *Grup V*: Karragenin ile inflamasyon oluşturulan grup, *Grup VI*: İntakt grup olmak üzere) oluşturuldu ve ölçüm sonrası değerlendirmeler yapıldı.

MDA, serbest oksijen radikallerinin dokularda oluşturduğu lipid peroksidasyonu sırasında bir dizi reaksiyon sonucu meydana gelen oldukça reaktif, metabolik bir üründür. Ve lipid peroksidasyonunun başlıca son ürünlerinden olan bu metabolik ürün, oksidan hasarı değerlendirmede sıklıkla kullanılmaktadır^{111,124}. MDA organizma için oldukça zararlı bir madde olup, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin bozulması ve DNA bazlarıyla reaksiyona girerek mutajenik karakter kazanması gibi pek çok olumsuz etkiye sahiptir¹¹². Oksidan ajanların yeterince detoksifiye edilmemeleri sonucunda lipid peroksidasyonuna bağlı olarak MDA'nın miktarı artar ve artmış MDA düzeyleri doku hasarının şiddetini yansıtır^{91,113}.

Ölçümlerimizde en yüksek MDA değeri adrenaletomi yapılarak karragenin inflamasyonu oluşturulan grup II'de, sırasıyla grup V, I, IV ve III olmak üzere en düşük değer de işlem yapılmamış olan intakt grupta tesbit edildi. Prednisolon ve adrenalin alan adrenaletomi yapılmış lokal inflamasyonlu grup değerleri birbirlerine ve intakt gruba yakın bulundu. İnflamasyon oluşturulan gruplarda, özellikle II ve V'de diğer gruplara

göre oldukça anlamlı yüksek MDA değerleri saptandı. Bu da hasarlı dokuda artış gösteren MDA'nın sadece adrenalektomi yapılmış sıçan pençesi dokusunda da intakt sıçanlardaki düzeye göre anlamlı olarak yükselme gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Bu olay, adrenal gland hormonlarının dokuyu MDA hasarından koruduğunu göstermektedir. Adrenalektomili sıçanlarda karrageninin intaktlara göre daha şiddetli hasar oluşturduğu yapılan deneysel çalışmalarda gösterilmiştir²¹. Bizim çalışmamızda da karragenin verilen adrenalektomili sıçan pençesi dokusunda MDA düzeyi, karragenin alan intakt sıçanlarınkinden çok daha yüksek bulundu. Çalışmamızdan ve literatürlerden edinilen bu bilgi, MDA düzeyinin artışının, inflamasyon şiddetine paralellik gösterdiğini işaret etmektedir.

Ayrıca adrenalektomili sıçanlara karragenin inflamasyonundan önce prednisolon verilmesi inflamasyonlu dokuda MDA düzeyinin yükselmesini anlamlı olarak baskılamıştır. Prednisolonun fosfolipaz A₂'yi inhibe ederek prostanoit ve lökotrien sentezini frenlediği bilinmektedir. Prednisolon alan sıçanlarda MDA düzeyinin düşmesi, bu olayın prednisolonun antiinflamatuvar etkisinden kaynaklanmış olabileceğini göstermektedir. Yine çalışmamızda adrenalektomili sıçanlara karragenin inflamasyonundan önce adrenal verilmesi de MDA düzeyini grup II ve grup V'e göre anlamlı olarak düşürdü. Adrenalin, prednisolon ve intakt sıçan grupları arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamsızdı. Bu deney sonuçlarına dayanarak inflamasyonlu dokuda MDA'nın baskılanmasında hem adrenal korteks hem de adrenal medulla hormonlarının rol aldığını söyleyebiliriz. Süleyman ve ark.¹²⁶ yaptığı bir çalışmada da karrageninle inflamasyon oluşturulan adrenalektomize ratlarda verilen NSAİ ilacın antiinflamatuvar etkisinin adrenal ve prednisolon verilenlere göre anlamlı olarak belirgin olduğu; ancak yalnızca adrenal, yalnızca prednisolon ve ikisi birlikte verilen

gruplar arasında istatistiksel olarak fark olmadığı sonucu elde edilmiştir. Adrenalinin inflamasyon mediyatörlerinin oluşumunu baskıladığı bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada TNF- α 'nın supresyonunda adrenalinin rolü gösterilmiştir¹²⁵.

Glukokortikoid hormonlar, hayati fonksiyonlar, immün cevaplar ve inflamasyon kontrolü için önemlidir¹²². Bazı glukokortikoidler ve katekolaminler proinflamatuvar sitokinleri (IL-12, TNF- α , IF- γ) inhibe etmekte, bazı antiinflamatuvar sitokinleri de (IL-10, IL-4) stimüle etmektedir¹²⁷. Adrenalektomi tek başına oksidatif stresi indükler¹²³. Yapılan bir çalışmada adrenalektomili sıçanlarda oluşturulan gastrik ülserasyon modelinde enteresan bir bulgu olarak verilen prednisolon ve adrenalinin MDA yükselmesini ciddi bir biçimde frenlediği gösterilmiştir. Adrenal glandların alınması gastrik doku ve eritrositte sham grubuna göre MDA düzeylerini önemli derecede düşürmüştür ki bu da adrenal glandda bulunan faktör veya faktörlerce (MDA'nın üretimini kontrol eden) sağlanmaktadır¹¹⁴. Ancak bununla ilgili olarak literatürde çeşitli bulgular vardır. Toleikis ve ark.¹¹⁵, wistar ratların adrenalektomi sonrası karaciğer, akciğer ve böbrek homojenatlarında in vitro lipid peroksidasyonunun azaldığını bulmuşlardır. Bu durum bizim bulgularımızla çelişmektedir. Bir başka benzer modelli çalışmada ise karaciğer dokusunda lipid peroksidasyon ürünleri adrenalektomili grupta sham operasyon grubuna göre daha yüksek bulunmuş ve ilave olarak kortizon verilen adrenalektomili grupta bu değerlerin düşük bulunduğu rapor edilmiştir¹¹⁶. Bu, çalışmamızla uygunluk göstermektedir. Yıldırım ve ark.¹¹⁴ yaptığı çalışmada da gastrik doku MDA düzeyleri adrenalektomi + prednisolon grubunda sadece adrenalektomi grubundan daha yüksekti. Bu sonuçlarla adrenal hormonlarının lipid peroksidasyonu üzerinde organ-spesifik etkisi olduğunu öne sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda farklı bir inflamasyon modeli olan pençe ödemi yukarıdaki sonuçları teyit emektedir.

Bir diğ er parametremiz olan, oksidasyon göstergesi NO düzeyleri ölçümlerimizde, en yüksek değ er adrenalektomi + karragenin grubunda olmak üzere sırasıyla grup V, I, IV, III'de ve en düşük olarak da intakt grupta (VI) bulunmuştur. Bu MDA düzeyleriyle de benzerlik göstermektedir.

NO'in nörotransmitterlik, tümör hücrelerinin yok edilmesi, immünite ve inflamasyon gelişimi gibi biyolojik olaylarda çeşitli görevleri tanımlanmıştır⁶². NO'in inflamasyondaki rolünün yeterince açık olmadığını ifade eden, proinflamatuvar ve antiinflamatuvar etkili olduğunu gösteren çalışmalar da vardır. NO güçlü bir vazodilatatördür ve akut inflamasyonda ödem oluşumuna katkı sağlar. Ödem, NO salınımıyla kontrol edilen "substance P" ile indüklenir. Ayrıca inflamasyonda akut immün kompleks oluşumuyla bağlantılı vasküler permeabilite artışında görev alır. Romatoid sinoviyal sıvıda nitrit seviyelerinin yükselmiş olması gözlemine dayanan, NO'in kronik inflamasyonda proinflamatuvar bir rolünün olduğu anlamı çıkarılmıştır. Yine bir başka makalede NO'in inflamasyondaki etkinliğinin endotelial hücrelerden salındığında platelet inhibisyonu yapması, lökosit adhezyonu sağlaması ve platelet agregasyonuna sebep olması şeklinde gösterildiği ifade edilmiştir¹¹⁷⁻¹²¹.

İnflamasyonlu bölgede NO düzeyinin yükseldiği bilinmektedir. Çalışmamızda da inflamasyonlu dokudaki NO düzeyinin inflamasyon şiddetine paralellik gösterdiği görülmüştür. Karragenin yapılan adrenalektomili sıçan pençesi dokusunda (grup II) NO düzeyi, sadece karragenin yapılan grup dahil olmak üzere diğ er tüm gruplara göre çok daha anlamlı artış göstermiştir. Yine yalnızca karragenin alan grup NO değ erleri yalnızca adrenalektomi yapılan gruba göre oldukça anlamlı yüksek bulunmuştur. Adrenalin ve prednisolon verilen adrenalektomili hayvan pençesi dokusundaki NO düzeyi arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. Ayrıca, adrenalin ve

prednisolon alan adrenalektomili sıçan gruplarındaki NO ile intakt (kontrol) grup arasındaki NO düzeyleri açısından da belirgin bir farklılık saptanmamıştır. Bu da bize NO düzeylerini yükseltmede özellikle inflamasyonun rolünün bulunduğunu ancak adrenal bez yokluğunun fazla etkili olmadığını göstermiştir.

Antioksidan enzim parametrelerimizden olan SOD, hücrede önemli bir antioksidan enzimdir. Cu/Zn- SOD, ROS (Reaktif Oksijen Türleri) metabolizmasında iki yönlü rol oynar. Reaktif oksijen türleri için Cu/Zn-SOD bir hedefdir. ROS, hem in vitro¹²⁸ olarak hem de ROS ile ilişkili nörodejeneratif hastalıklarda bu enzimi inhibe edebilmektedir¹⁰⁸.

SOD aktivitesindeki artış süperoksit radikallerinin konsantrasyonundaki artışı savunmaya yönelik ortaya çıkabilir. SOD süperoksit radikallerini hidrojen peroksite indirger. Hidrojen peroksit GPx tarafından indirgenmezse bakır ve demir gibi metallerle reaksiyona girerek hidroksil radikali oluşturur. SOD aktivitesindeki artışın adaptif olarak GPx aktivitesinde de artışa neden olduğu bilinmektedir. Ancak bir başka çalışmada da GPx aktivitesinde artış olmaksızın SOD aktivitesindeki artışın lipid peroksidasyonuna neden olduğu gösterilmiştir^{101,129-131}.

Bizim çalışmamızda SOD aktivitesi en yüksek intakt grupta olup en düşük de adrenalektomi + karragenin grubunda (grup II) tespit edilmiştir. Ancak yalnızca karragenin inflamasyonu oluşturulan ve yalnızca adrenalektomi yapılan grupta da sırasıyla düşük değerler mevcuttur. Buradan inflamasyonun SOD aktivitesi üzerine azaltıcı etkisinden söz edilebilir. Oksidan stresin yarattığı inflamasyonda reaktif oksijen türlerinin SOD aktivitesini baskılayabileceği söylenebilir.

Adrenalektominin etkisi ise, inflamasyonda daha fazla olmak üzere, SOD aktivitesini azaltmış olmasıdır ki intakt ve yalnızca adrenalektomi yapılmış gruplar arası

fark oldukça anlamlı tespit edilmiştir. Oysa hem adrenalın hem de prednisolon verilen gruplarla adrenaletomili gruplar arasındaki fark da istatistiksel olarak oldukça anlamlıdır. Bu da bize SOD aktivitesinin kontrolünün adrenal gland hormonları ile bağlantılı olabileceğini göstermektedir. Yapılan bir çalışmada adrenaletomi sonrası mide dokusunda SOD aktivitesi sham operasyon grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur¹³². Yıldırım ve ark.¹¹⁴ yaptıkları bir çalışmada özellikle adrenalinin SOD ve GPx aktiviteleri üzerinde rolünün olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Çalışmamızda intakt ve adrenaletomili sıçan pençe dokusunda GPx aktivitesi arasında anlamlı bir fark görülmezken, adrenaletomili sıçanlara karragenin verilmesi ile enzim aktivitesinin bu gruplara göre anlamlı olarak düştüğü görülmüştür. Ancak adrenalın ve prednisolon verilen gruplarda bu aktivite anlamlı olarak yükselmiştir. Buradan adrenalın ve prednisolonun da GSH-px aktivitesinin korunmasında önemli faktör olduğu anlaşılmaktadır.

Erken maternal adrenaletomi uygulanmış gebe ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada termde fetal akciğerde katalaz, GPx, glutasyon redüktaz, sitokrom oksidaz, GSH, askorbat ve ürik asit düzeylerinde bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu göstermiştir ki fetal akciğer antioksidan kapasitesinin gelişiminde maternal bezler elzem değildir. Ve gestasyonun son 1/5'lik kısmı süresince fetal kortikosteron uyarısının normal ve yeterli bir fetal akciğer enzimatik ve non-enzimatik antioksidan sistem gelişimini oluşturduğu görülmüştür¹³³.

Karragenin alan adrenaletomili sıçanların pençe dokusunda GST düzeyi intakt sıçanlarınkine göre daha düşük bulundu. Fakat adrenalın ve prednisolon alan adrenaletomili sıçan pençesi dokusundaki GST düzeyi sağlıklı (intakt) sıçanlarınkine göre sırayla 2.6, 2.1 katı kadar yüksek bulundu. Karragenin alan intakt sıçan grubu ile

sağlıklı (intakt) sıçan grubunda ise istatistiksel olarak fark görülmedi. Bu da endojen adrenalin ve glukokortikoidlerin GST harcanmasının önlenmesinde etkisinin olabileceğine işaret etmektedir.

Dokuda polimorfonükleer lökosit birikiminin hassas bir göstergesi sayılabilecek MPO enzimi aracılığıyla H_2O_2 'ten hipokloröz asit ve daha uzun ömürlü kloraminler oluşturur ki bunlar in vitro sitotoksik aktiviteleri bilinen ancak in vivo mikrobisidal aktiviteleri kesin bilinmeyen bileşiklerdir. Ancak yapılan klinik çalışmalarda MPO defekti olan hastaların, birçok enfeksiyon ajanına dirençli olmakla beraber fungal ve bazı bakteriyel enfeksiyonlara karşı savunma güçlerinin azaldığı gösterilmiştir¹³⁴⁻¹³⁶.

Bizim çalışmamızda da MPO düzeyi karragenin verilen intakt ve karragenin verilen adrenaletomili sıçan pençesi dokusunda sağlıklı intaktlara göre anlamlı yükselme göstermiştir. Prednisolon ve adrenalin verilen adrenaletomili-inflamasyonlu dokularda ise MPO düzeyi sadece karragenin verilen adrenaletomili sıçan grubuna göre anlamlı bir düşme göstermiştir. Buna göre prednisolon ve adrenalinin antiinflamatuvar etkilerini destekleyici bir bulgudan söz edilebilir.

Sonuç olarak adrenal gland hormonları oksidan-antioksidan dengenin korunmasında, organizmanın lokal inflamasyona cevabının belirginleşmesinde önemli yer tutmaktadır. Adrenal gland yokluğu oksidatif stresi başlı başına indüklerken organizmanın lokal inflamasyon esnasında daha fazla hasar almasına da neden olmaktadır. Konuyla ilgili yapılacak başka çalışmalarla da bulguların desteklenmesi faydalı olacaktır.

7- KAYNAKLAR

- 1- Kılınç A, Kılınç K. Nitrik Oksit: Biyolojik fonksiyonları ve toksik etkileri. Ankara. Palme Yayıncılık, 2003.
- 2- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper's Biochemistry (25. Edition) McGraw- Hill Press, 2000.
- 3- In: Smith C, Marks AD, Lieberman M (Editors). Marks' Temel Tıbbi Biyokimyası Çeviri: İnal Erden M, Atik U, Aksoy N, Haşimi A. Ankara. Güneş Tıp Kitapevleri 2007; 2: 439-458.
- 4- Kumar V, Cotran RS, Robbins SL (eds) . Basic Pathology, Çeviri; Çevikbaş U. İstanbul. Nobel Tıp Kitapevleri, 2000: 26-46.
- 5- McCord JM, Roys RS. The pathophysiology of superoxide: Roles in inflammation and ischemia. Can J Physiol Pharmacol 1982; 60: 1346-1352.
- 6- Haas A, Goebel W. Microbial strategies to prevent oxygen-dependent killing by phagocytes. Free Radic Res Commun 1992; 16 (3): 137-157.
- 7- Peralta C, Rull R, Rimola A, Deulofeu R, et al. Endogenous nitric oxide and exogenous nitric oxide supplementation in hepatic ischemic reperfusion injury in the rat. Transplantation 2001; 71: 529-536.
- 8- Folden DV, Gupta A, Sharma AC et al. Malondialdehyde inhibits cardiac contractile function in ventricular myocytes via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. Br J Pharmacol 2003; 139: 1310-1316.
- 9- Kaçmaz A, Olat A, User Y et al. Octreotide improves reperfusion-induced oxidative injury in acute abdominal hypertension in rats. J Gastrointest Surg 2004; 8: 113-119.
- 10- Okutan H, Savaş C, Delibaş N. The antioxidant effect of melatonin in lung injury after aortic occlusion-reperfusion. Interact Cardiovasc Thorac Surg 2004; 3: 519-522.

- 11- Bozkurt AK. Deneysel iskemi-reperfüzyon hasarının önlenmesinde pentoksifillinin rolü. *Damar Cerrahisi Dergisi* 2001; 3: 101-104.
- 12- Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB et al. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stres: reference interval and effects of life-style factors. *Clin Chem* 1997; 43: 1209-1214.
- 13- Burchard K. A review of the adrenal cortex and severe inflammation quest of the "eucorticoid" state. *J Trauma* 2001; 51: 800-814.
- 14- Offner PJ, Moore EE, Ciesla D. The adrenal response after severe trauma. *Am J Surg* 2002; 184 (6): 649-653.
- 15- Nakamura M, Suita S, Yamanouchi T, Masumoto K, Ogita K, Taguchi S et al. Cortisol and cytokine reponses after surgery in different age groups of pediatric patients. *Pediatr Surg Int* 2003; 19 (3): 194-199.
- 16- Slowik A, Turaj W, Pankiewicz J, Dziedzic T, Szermer P, Szczudlik A. Hypercortisolemia in acute stroke is related to the inflammatory response. *J Neurol Sci* 2002; 1996: 27-32.
- 17- Linehan JD, Kolios G, Valatas V, Robertson DA, Westwick J. Effect of corticosteroids on nitric oxide production in inflammatory bowel disease: are leucocytes the site of action? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288 (2): 261-267.
- 18- Yao X, Rarey KE. Detection and regulation of Cu/Zn-SOD and Mn-SOD in rat cochlear tissues. *Hear Res* 1996; 96 (1-2): 199-203.
- 19- Kawamura T, Yoshioka T, Bills T, Fogo A, Ichikawa I. Glucocorticoid activates glomerular antioxidant enzymes and protects glomeruli from oxidant injuries. *Kidney Int* 1991; 40 (2): 291-301.

- 20-** Omote K, Hazama K, Kawamata T et al. Peripheral nitric oxide in carrageenan-induced inflammation. *Brain Reseach* 2001; 912: 171-175.
- 21-** Halıcı Z. Amlodipin, lasidipin ve nikardipinin intakt ve adrenaletomili sıçanlarda karrageninle oluşturulan inflamasyona etkileri. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı, Uzmanlık tezi Erzurum, 2005.
- 22-** Mcintosh LJ and HK, RM. S. Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: baseline studies. *Brain Res* 1998; 79 (1-2): 209-214.
- 23-** Takeuchi K, Nishiwaki H, Okada M, Nida H, Okabe S. Bilateral adrenalectomy worsens gastric mucosal lesions induced by indomethacin in the rat. Role of enhanced gastric motility. *Gastroenterology* 1989; 97 (2): 284-293.
- 24-** Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology* (10. Edition), Çeviri; Çavuşoğlu H, Yeğen Çağlayan B, Aydın Z, Alican İ. Nobel Tıp Kitapevleri, 2001.
- 25-** Ogonowski AA, May SW, Moore AB, Barret LT, O'Bryant CL, Pollock SH. Antiinflammatory and analgesic activity of an inhibitor neuropeptide amidation. *J Pharm Exp Ther* 1997; 280 (2): 846-853.
- 26-** Rao STI, Currie JL, Shaffer AF, Isakson C. In vivo characterization of zymogen – induced mouse peritoneal inflammation, *J Pharm Exp Ther* 1994; 269: 917-925.
- 27-** Dunne MW. Inflammation and Repair In: Ed. Porth CM,(eds). *Pathophysiology: concepts of altered health states with contributors*. Philadelphia: Lippincott, 1990: 165-176.
- 28-** Bullock BL. Inflammation and repair. In: *Pathophysiology*, New York: Lippincott, 1996: 276-311.
- 29-** Calin A. Pain and Inflammation. *Am J Med* 1984; 10: 9-16.

- 30-** Moslinsk D, Gajewski M. Some aspects of inflammatory process, *Folia Neuropathology*, 1998; 36 (4): 199-204.
- 31-** Lee J, Katayama S. Inflammation and non-steroidal antiinflammatory drugs. In Smith CM, Reynaud AM (eds). *Textbook of Pharmacology*. New York : Saunders, 1992: 401-436.
- 32-** Moncada S, Ferreira SH, Vane JR. Prostaglandins, aspirin like drugs and edema of inflammation. *Nature* 1973; 246: 217-219.
- 33-** Di Rosa M, Sorrentino L. The mechanism of the inflammatory effect of carragenin. *Eur J Pharmacol* 1968; 4: 340-342.
- 34-** Meade CJ, Turner GA, Bateman PE. The role of polyphosphoinositides and their breakdown products in A23187-induced release of arachidonic acid from rabbit polymorphonuclear leucocytes. *Biochem J* 1986; 238: 425-436.
- 35-** Dawson J, Sedwick A, Edwards J et al. A comparative study of cellular, exudative and histological responses to carragenin, dextran and zymosan in the mouse. *Int J Tissue React* 1991; 13 (4): 171-185.
- 36-** Cuzzocrea S, Zingarelli B, Gillard E et al. Protective effect of melatonin in carragenin- induced models of local inflammation. *J Pineal Res* 1997; 23 (2): 106-116.
- 37-** Onat T, Emerk K, Sözmen EY (Ed.) *İnsan Biyokimyası*, Palme Yayıncılık, Ankara 2002.
- 38-** Babe KS, Serafin WE,. Histamine, bradykinin and their antagonists. In Goodman Gilman, A. (Ed) . *The Pharmacological basis of therapeutics*. New York, Mc Graw- Hill Pres, 1996: 581-600.
- 39-** Flower RJ, Harvey EA, Kingston WP. Inflammatory effects of prostaglandin D2 in rat and human skin. *Br J Pharmacol* 1976; 56: 229-233.

- 40- Kayaalp SO. Otokoidler içinde: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Ankara, Hacettepe- Taş, 2000.
- 41- Mailing HM, Webster ME, Williams MA, Saul W, Anderson W. Inflammation induced histamine, serotonin, bradykinin and compound 48/80 in the rat: Antagonist and mechanism of action. *J Pharm Exp Ther* 1974; 191 (2): 300-310.
- 42- Kulkarni SK, Mehta AK, Kunchandy J. Antiinflammatory actions of clonidine, guanfacine and B-HT 920 against various inflammagen-induced acute paw edema in rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1986; 279: 324-334.
- 43- Dray A, Perkins M. Bradykinin and inflammatory pain. *TINS* 1993; 16 (3): 99-104.
- 44- Beck PW, Handwerker HO. Bradykinin and serotonin effects on various types of cutaneous nerve fibres. *Pflugers Arch* 1974; 347: 209-222
- 45- Correa CR, Calixto JB. Evidence for participation of B₁ and B₂ kinin receptors in formalin induced nociceptive response in the mouse. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 193-198.
- 46- Hall JM. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol Ther* 1992; 56: 131-190.
- 47- Ferreira SH, Lorenzetti BB, Poole S. Bradykinin initiates cytokine mediated inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 1227-1231.
- 48- Fearon DD, Austen KF. In Mccarty DJ, Hollander JL (eds). *Arthritis and Allied Conditions*(10. edition). Philadelphia, Lea and Febiger, 1985.
- 49- Peakman M, Vegani D. *Basic and Clinical Immunology*. Churchill Livingstone 1997: 1-150.
- 50- Steinmeyer J. Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Arthritis Res* 2000; 2: 279-285.

- 51-** Richardson C, Emery P. The clinical implications of inhibition of the inducible form of cyclo-oxygenase. *Drug Saf* 1996; 15: 249-260.
- 52-** Malmsten CL. Prostaglandins, thromboxanes and leukotriens in inflammation. *Am J Med* 1986; 80: 11-17.
- 53-** Solomon LM, Juhlin L, Kirschenbaum MB. Prostaglandin on cutaneous vasculature. *J Invest Dermatol* 1968; 51 (4) : 280-282.
- 54-** Vane J. Control of the circulation by endothelial mediators. *Int Arch Allergy Immunol* 1993; 101: 333-345.
- 55-** Masferrer JL, Isakson PC, Seibert K. Cyclooxygenase-2 inhibitors. *Gastroenterol Clin North Am* 1996; 25: 15-19
- 56-** Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, TXA₂ and PGI₂. *Pharmacol Rev* 1979; 30 (3): 293-331.
- 57-** Samuelsson B. Leukotriens: Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 1983; 220: 568-575.
- 58-** Floyd RA. DNA damage and repair in "Oxidative damage and repair" (Davies KJA ed.) Pergamon Press 1992: 175-180.
- 59-** Matsukawa A, Yoshinaga M. Sequential generation of cytokines during the initiative phase of inflammation with reference to neutrophils. *Inflamm Res* 1998: 137-144
- 60-** Dökmeci İ. *Farmakoloji Temel Kavramlar*. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 2000: 559-569.
- 61-** Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Ferreira SH. The pivotal role of tumor necrosis factor α in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 1992; 107: 660-664.

- 62- Moshage H, Kok B, Hoizenga JR, Jansen PLM. Nitrite and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation, *Clin Chem* 1995; 41 (6): 892-896.
- 63- Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4651-4655.
- 64- Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987; 2: 1057-1058.
- 65- Öbek A (Editör). İç Hastalıkları, Güneş Kitabevi, 1990 (4. Baskı); 37-41.
- 66- Kyung CW. Anatomy. Çeviri: İkinci N. Anatomi Board Review serisi 3. baskı. İstanbul Nobel Tıp Kitapevleri, 1998; 187.
- 67- Peter HF, Kenneth LM. The Adrenals. In: Robert HW (Editor). *Textbook of Endocrinology*, 4. ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 1968; 287-403.
- 68- Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *The Basic Immunology*. Çeviri: Erbeni T. Temel Histoloji. İstanbul, Barış Kitabevi; 1993: 472-796.
- 69- Farsham PH, Melmon KL. The Adrenals. In: Williams RH (Editor). *Textbook of Endocrinology*. (4. Ed.) Philadelphia, Wb Saunders Co; 1968: 287-403.
- 70- Heikkila P, Kahri AL, Ehnholm C, Kovanen PT. The effect of low and high density lipoprotein cholesterol on steroid hormone production and ACTH induced differentiation of rat adrenocortical cells in primary culture. *Cell Tissue Res* 1989; 256 (3): 487-494.
- 71- Paglia DE and Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathion peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
- 72- Sun Y, Oberley L, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.

- 73- Moshage H, Kok B, Hulzenga JR, Jansen PLM. Nitrite and nitrate determination in plasma: A critical evaluation. *Clin Chem* 1995; 41: 892-896.
- 74- Jain SK, McVie R, Duett J, Herbst J. Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes* 1989; 38: 1539-1543.
- 75- Okhawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxidase in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytic Biochem* 1979; 95: 351.
- 76- Habig WH, Pabst MJ, Jakobs WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chemistry* 1974; 249: 7130-7139.
- 77- Mooradian AD. Antioxidant properties of steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993; 45 (6): 509-511.
- 78- Boccuzzi G, Aragno M, Secia M, Brignardello E, Tamagno E, Albano E et al. Protective of dehydroepiandrosterone against copper-induced lipid peroxidation in the rat. *Free Radic Biol Med* 1997; 22 (7): 1289-1294.
- 79- Aragno M, Tamagno E, Gatto V, Brignardello E, Parola S, Danni O et al. Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozocin-treated rats against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1999; 26 (11-12): 1467-1474.
- 80- Di Mascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidant Defence Systems: the role of carotenoids, tocopherols and thiols. *Am J Clin Nutr* 1991; 53 (1 Suppl): 194-200.
- 81- Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222 (1): 1-15
- 82- Toleikis PM, Godin DV. Alteration of antioxidant status following sympathectomy: differential effects of modified plasma levels of adrenaline and noradrenaline. *Mol Cell Biochem* 1995 Nov 8; 152 (1): 39-49.
- 83- Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998; 78: 547-581.

- 84- Stadtman ER, Oliver CN. Metal-catalysed oxidation of proteins, physiological consequences. *J Biol Chem* 1996; 266: 2005-2008.
- 85- Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. I. Baskı, Konya; Mimoza Yayınları 1995.
- 86- McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 2000; 108: 652-659.
- 87- Bhagavan NV. *Medical Biochemistry (Fourth Edition)*. Canada. Harcourt/Academic Press, 2002.
- 88- Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994; 344 (8924): 721-724.
- 89- Erel Ö. A novel automated method to measure total antioxidant response against free radical reactions. *Clin Biochem* 2004; 37: 112-119.
- 90- Gaté L, Paul J, Ba GN, Tew KD, Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother* 1999; 53: 169-180.
- 91- Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-1828.
- 92- Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet* 1984; 1: 1396-1397.
- 93- Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001; 54 (3): 176-186.
- 94- Brigelius - Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 1999; 27 (9-10): 951-965.
- 95- Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47 (5): 412-426.

- 96- Fridovich I. Superoxide Dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem* 1998; 263: 17025-17028.
- 97- Steinman HM. Superoxide Dismutase. CRC Press, Boca Raton 1982; 1: 12-68.
- 98- Lopaczynski W, Zeisel SH. Antioxidants, programmed cell death and cancer. *Nutr Res* 2001; 21: 295-307.
- 99- Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver. *J Biol Chem* 2001; 276: 38388-38393.
- 100- Forman H, Fridovich I. On the stability of bovine superoxide dismutase, the effects of metals. *J Biol Chem* 1973; 248: 2645.
- 101- Uysal N, Gönenç S, Sönmez A, Aksu İ, Topçu A, Kayatekin BM, Açıköz O. Adölesan sıçan beyninde antioksidan enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyon düzeyleri. *Ege Tıp Dergisi* 2005; 44 (2): 75-79.
- 102- Warner DS, Huaxin Sheng H, Haberle LB. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol* 2004; 207: 3221-3231.
- 103- Songur A, Kuş İ, Şahin Ş, Söğüt S, Özen OA, Yaman M, Sarsılmaz M. The changes of zinc, copper and iron levels in lung tissue after formaldehyde inhalation during the early postnatal period of rats. *Eur J Gen Med* 2004.
- 104- Songur A, Söğüt S, Özen OA, Yılmaz HR, Özyurt H. Subakut ve subkronik formaldehite maruz bırakılmış sıçanların akciğer dokusunda CAT, SOD, ADA, XO aktiviteleri ile MDA ve NO düzeyleri. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2004; 2 (3): 31-36.
- 105- Tibell L, Hjalmarsson K, Edlund T, Skogman G, Engstom A, Marklund SL. Expression of human extracellular superoxide dismutase in Chinese hamster ovary cells and characterization of the product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 6634-6638.

- 106-** Brannan TS, Maker HS, Weiss C, Cohen G. Regional distribution of glutathion peroxidase in the adult rat brain . Brain Res 1980; 200: 474-477.
- 107-** Hitchon CA, El-Gabalawy HS. Oxidation in rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther 2004; 6: 265-278.
- 108-** Olanow CV. A radical hypothesis for neurodegeneration. Trends Neurosci 1993; 16: 439-444.
- 109-** Kourie JJ. Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. Am J Physiol 1998; 275: 1-24.
- 110-** Jamme I, Petit e, Divux D et al. Modulation of Mouse cerebral Na⁺- K⁺ ATPase activity by oxygen free radicals. Neuroreport 1995; 7: 333-337.
- 111-** Sheu J, Ku H, Tseng W, Chen M, Tsal L, Huang Y. Determination of thiobarbituric acid adduct of malondialdehyde using on-line microdialysis coupled with high-performance liquid chromatography 2003. Anal Sci; 19: 621-624.
- 112-** Moslen MT, Armstrong D (Ed). Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis, free radicals in "diagnostic medicine". New York. Plenum Pres 1994: 1-15.
- 113-** Biemond P, Swaak AJ, Koster JF. Protective factors against oxygen free radicals and hydrogen peroxide in rhomatoid arthritis synovial fluid. Arthritis Rheum 1984; 27: 760-765.
- 114-** Yıldırım A, Şahin YN, Süleyman H, Yılmaz A, Yıldırım S. The role of predisolon and epinephrine on gastric tissue and erythrocyte antioxidant status in adrenalectomized rats. J Physiol Pharmacol 2007; 58: 105-116.

- 115-** Toleikis PM, Godin DV. Alteration of antioxidant status following sympathectomy: differential effects of modified plasma levels of adrenaline and noradrenaline. *Mol Cell Biochem* 1995; 152: 39-49.
- 116-** Hidalgo J, Gasull T, Garcia A, et al. Role of glucocorticoids and catecholamines on hepatic thiobarbituric acid reactans in basal and stres conditions in the rat. *Horm Metab Res* 1991; 23: 104-109.
- 117-** Chander CL, Moore AR, Desa FM, Howat DW, Willoughby DA. Anti-inflammatory effects of endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13: 218-219.
- 118-** Hughes SR, Williams TJ, Brain SD. Evidence that endogenous NO modulates oedema formation induced by substance P. *Eur J Pharmacol* 1990; 191: 481-484.
- 119-** Mulligan MS, Hevel JM, Marletta MA, Ward PA. Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6338-6342.
- 120-** Farrell AJ, Blake DR, Palmer RMJ, Moncada S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Br J Rheumatol* 1992; 31 (Suppl 2): 31 (abstr.).
- 121-** Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bailey DB, Croxtall J, et al. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2046-2050.
- 122-** Bishayi B, Ghosh S, Bhanja P. Effect of adrenalectomy on rat peritoneal macrophage response. *Acta Biol Hung* 2003; 54 (3-4): 335-346.
- 123-** Montilla P, Túnez I, Muñoz MC, Salcedo M, Feijóo M, Muñoz-Castañeda JR et al. Effect of glucocorticoids on 3-nitropropionic acid-induced oxidative stres in synaptosomes. *Eur J Pharmacol* 2004; 488 (1-3): 19-25.

- 124- Knight JA, Pieper RK, McClellan L. Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. *Clin Chem* 1988; 34: 2433-2438.
- 125- Pettipher ER, Labasi JM, Salter ED, Stam EJ, Cheng JB, Griffiths RJ. Regulation of tumour necrosis factor production by adrenal hormones in vivo: insights into the antiinflammatory activity of rolipram. *Br J Pharmacol* 1996; 117 (7): 1530-1534.
- 126- Süleyman H, Halıcı Z, Çadırcı E, Hacımüftüoğlu A, Bilen H. Indirect role of β_2 adrenergic receptors in the mechanism of anti-inflammatory action non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Physiol Pharmacol* (Baskıda)
- 127- Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966: 290-303.
- 128- Choi SY, Kwon HY, Kwon OB, Kang JH. Hydrogen peroxide-mediated Cu,Zn superoxide dismutase fragmentation. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1472: 651-657.
- 129- Ceballos I, Delabar JB, Nicole A, et al. Expression of transfected human Cu/Zn superoxide dismutase gene in mouse L cells and NS20Y neuroblastoma cells induces enhancement of glutathione peroxidase activity. *Biochim Biophys Acta* 1988; 949: 58-64.
- 130- Kelner MJ, Bagnell R. Alteration of endogenous glutathione peroxidase, manganese superoxide dismutase and glutathione transferase activity in cells transfected with a copper-zinc superoxide dismutase expression vector. Explanation for variations in paraquat resistance. *J Biol Chem*, 1990; 265: 10872-10875.
- 131- Brooksbank BW, Balazs R. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and lipoperoxidation in Down's syndrome fetal brain. *Brain Res*, 1984; 318: 37-44.
- 132- Yıldırım A. İntakt ve adrenaletomili sıçanların eritrosit ve mide dokularında oksidan ve antioksidan parametrelerin araştırılması. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi Erzurum, 2003.

- 133- Arahuetes RM, Madrid R, Cadenas S, Rojas C, Pérez-Campo R, López-Torres M, et al. Effect of maternal adrenalectomy on antioxidant enzymes, GSH, ascorbate and uric acid in the rat fetal lung at term. *Exp Lung Res* 1993; 19 (5): 533-543.
- 134- Miller RA. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10 (1): 1-18.
- 135- Weiss SJ. Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986; 548: 9-37.
- 136- Parry MF, Root RK, Metcalf JA, Delaney KK, Kaplow LS, Richar WJ. Myeloperoxidase deficiency: prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med* 1981; 95: 293-301.
- 137- Wei H, Frenkel K. In vivo formation of oxidized DNA bases in tumor promoter-treated mouse skin. *Can Res* 1991; 11: 4443-4449.
- 138- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.