

157001

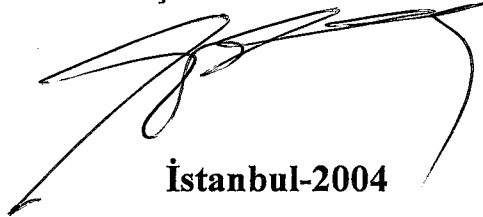
T.C.

İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi
Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp
Anabilim Dalı

**FARKLI BASINÇ DEĞERLERİNDE UYGULANAN
HİPERBARİK OKSİJEN TEDAVİSİNİN PLAZMA VE
ERİTROSİT DÜZEYİNDE OKSİDATİF STRES VE
ANTİOKSİDAN STATUS ÜZERİNE ETKİLERİ**

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Şefika KÖRPİNAR



İstanbul-2004

ÖNSÖZ

Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı' nın kurulması ve ülkemizde Hiperbarik Oksijen Tedavisi' nin gelişmesinde verdiği yoğun uğraşları yanında uzmanlık eğitimim sürecinde ve bu tezin hazırlanması aşamasında her türlü katkıda bulunan, çalışmalarına yön verip, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Maide Çimşit' e teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca ilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Şamil Aktaş' a teşekkür ederim.

Bu tezin hazırlanması aşamasında her türlü katkısını, sıcak ilgi ve desteğini esirgemeyen, değerli hocam Doç. Dr. Akın Savaş Toklu' ya teşekkür ederim.

Çalışmama değerli katkılarından dolayı Prof. Dr. Tuncay Altuğ'a, Doç. Dr. Hafize Uzun' a, Tıb. Biyo. Çetin Karaca ve M.Sc. Sevim Özdem Purisa'ya teşekkür ederim.

Asistanlığım sırasında beraber çalıştığım hekim arkadaşlarım Dr. Füsün Kocaman, Dr. Savaş İlgezdi, Dr. Evin Koç, Dr. Özgür Mutlu, Dr. Ayça Erdön, Dr. Özlem Çağlar Kapluhan, Dr. Banu Okuturlar, Dr. Nilay Yoğun, Dr. Şermin Şengün, Dr. S. Kaan Emek' e ve çalışmamda yardımlarını esirgemeyen Cengiz Şimşek, Orhan Tütüneker ve tüm Anabilim Dalı çalışanlarına gösterdikleri özveri ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Yaşamımın her anında olduğu gibi, bu dönemde de her türlü desteğiyle yanımda olan, aileme ve tüm dostlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	4
I- HİPERBARİK OKSİJEN TEDAVİSİ.....	4
II- SERBEST RADİKAL KAVRAMI.....	18
III- ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ.....	45
IV- OKSİDATİF STRES VE ANTİOKSİDAN STATUSUN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	55
GEREÇ-YÖNTEM.....	58
BULGULAR.....	66
TARTIŞMA.....	80
ÖZET.....	93
KAYNAKLAR.....	95

GİRİŞ ve AMAC

Aerobik canlıların yaşamlarını sürdürmeleri için, mutlak gerekli bir element olan oksijenin metabolik faaliyetler sırasında ortaya çıkan ve serbest radikaller genel adı ile anılan toksik ürünlerinin de olması çelişkisi, organizmanın, serbest radikalleri zararlı etkilerini ortaya koyamadan etkisizleştiren güçlü savunma sistemleriyle karşılaşır.

Serbest radikaller; organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında olduğu gibi, çeşitli dış etkenlerin neden olduğu reaksiyonlar zincirinin seyrinde de ortaya çıkabilmektedir. Çok kısa yaşam süreli, ancak yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok aktif yapılı olan serbest radikaller, tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliği göstermektedir (1, 2).

Serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin neler olduğu, hangi hastalıkların gelişiminde rol oynadıkları ve yarattıkları oksidatif strese bağlı olarak gelişen patofizyolojik değişiklikler üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır. Benzer şekilde, hiperoksik koşulların hücre ve dokulardaki toksik etkilerinin nedenleri de yıllardan beri araştırma ve tartışma konusu olmuştur.

Serbest radikallerin oluşum hızı ile etkisizleştirilme hızı dengede olduğu sürece organizma bu bileşiklerden etkilenmemektedir. Buna karşılık, savunma azalır veya bu zararlı bileşiklerin oluşum hızı sistemin savunma gücünü aşarsa, bu denge bozulmakta ve serbest radikallere bağlı zararlı etkiler ortaya çıkmaktadır (3).

Dekompresyon hastalığı, hava ve gaz embolisi, karbonmonoksit intoksikasyonu, klostridyal miyonekroz (gazlı gangren), yumuşak dokunun diğer anaerobik ve kimi karma enfeksiyonları, kronik refrakter osteomyelit, crush injury, kompartman sendromu ve öteki akut travmatik iskemiler, problem yaraların tedavisi, radyasyon doku hasarı (osteoradyonekroz, hemorajik sistit, proktit vb.) gibi olguların tedavisinde başarı ile uygulanan hiperbarik oksijen tedavisi sırasında radikal oluşumunun artışı, buna bağlı ikincil olayları ve antioksidanların olumlu etkilerini gösteren birçok çalışma vardır. Yine

hiperbarik oksijenasyonun antioksidan savunma sistemindeki mekanizmaları uyardığı ya da antioksidan enzim sistemindeki azalmayı önlediği yolunda bilgiler bulunmaktadır.

Bu çalışma, farklı basınç değerlerinde uygulanan hiperbarik oksijen tedavisinin eritrosit ve plazma düzeyinde, oksidatif stres ve antioksidan status üzerine olan etkilerinin, serbest radikal üretiminin indirekt göstergesi olan Malondialdehit (MDA) düzeyleri ve antioksidan savunma sisteminin iki önemli üyesi olan Glutasyon ve Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerinden araştırılması amacıyla planlanmıştır.



GENEL BİLGİLER

I- HİPERBARİK OKSİJEN TEDAVİSİ

Hiperbarik oksijen tedavisi; tamamen kapalı bir basınç odasına alınmış hastanın, 1 atmosferden (1 ATA = 1 Bar = 760 mmHg) daha yüksek basınçta, aralıklı olarak % 100 oksijen soluması şeklinde uygulanan, invaziv olmayan, medikal bir tedavi yöntemidir (4, 5, 6).

Tedavi tek ya da çok bölmeli basınç odalarında yapılabilir. Oksijen ile basınç altına alınan monoplace (tek kişilik) modellerde hasta oksijeni direkt olarak ortamdan solur. Multiplace (çok kişilik) modellerde ise oda olduğu gibi hava ile basınç altına alınır, hasta oksijeni maskeden, başlıktan ya da endotrakeal tüpten solur (4, 7, 8).

Tedavi sırasında basınç, çevre basıncının iki-üç katına çıkarılır. 1 atmosfer basınçta % 100 oksijen solunumu ya da topikal oksijen kullanımı, hiperbarik oksijenasyon olarak kabul edilmez (5, 7, 19).

Hiperbarik oksijen tedavisinde dalış fazı (kompresyon), genellikle 5-10 dakika sürer. Tedavinin uzunluğu, sıklığı ve uygulanacak basınç, hastaya ve hastalığa bağlı olarak belirlenir. Ancak % 100 oksijenin solunabileceği maksimum basınç 3 ATA' dır (7, 8).

Hiperbarik oksijenin terapötik etkisi iki temel yolla oluşur:

- a- Artmış basıncın mekanik (direkt) etkisi
- b- Artmış oksijen parsiyel basıncının etkisi

A- Artmış basıncın mekanik (direkt) etkisi

Temel gaz yasalarından olan Boyle Yasası' na göre, sabit sıcaklık altında, gazların basınçları ve hacimleri arasında ters bir orantı vardır. Basıncın artışıyla, dolaşımdaki ve dokulardaki gazların hacimleri ve gaz kabarcıklarının çapları küçülür. Ayrıca kabarcıkların yüzey gerilimleri de büyüklükleri ile ters orantılıdır. Büyük kabarcıklar, küçüklerden daha stabildir. Kabarcık küçüldükçe yüzey gerilimi artacağından, çap belli bir değerin altına düştüğü anda kollabe olup absorbe edilir. Basıncın mekanik etkisi en iyi dekompresyon hastalığı ve hava embolisi olgularının tedavisinde gözlenir. Bu hastalıklarda kabarcıkların HBO etkisiyle küçülüp kollabe olması sonucu, doku perfüzyonu yeniden sağlanabilmektedir (10).

B- Artmış oksijen parsiyel basıncının etkisi

B-I: Plazmada çözünmüş oksijen miktarının artması:

Solunum sürecinde, alveol havasının atmosfer havasıyla değişimini (pulmoner ventilasyon) takip eden süreç, oksijenin alveollerden kana; karbondioksitin de zıt yönde pulmoner kandan alveole difüzyonudur. Difüzyon, moleküllerin rastlantısal molekül hareketleriyle solunum membranlarından her iki yönde geçişinden ibaret, basit bir olaydır. Gazların difüzyonu vücut sıvı ve dokularında erimiş olan gazlar için de geçerlidir. Bu hareketin enerji kaynağı ise moleküllerin kinetik enerjisidir.

Bir gazın bir yüzeye yaptığı basıncın nedeni; kinetik olarak hareket eden moleküllerin sürekli bir şekilde yüzeye çarpmalarıdır. Bu nedenle solunum yolları ve alveollerin yüzeyindeki gazların basıncı; herhangi bir anda yüzeye çarpan tüm moleküllerin toplam gücüyle orantılıdır. Bu, total basıncın gaz moleküllerinin konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğu anlamına gelir.

Gaz karışımının hava olduğu bir alveolde, 1 ATA' da %79 nitrojen ve %21 oksijenden oluşan bu karışımın total basıncı 760 mmHg' dir. Karışımı oluşturan her bir gazın rölatif konsantrasyonu ile orantılı olarak total basınca katkıda bulunması nedeniyle 760 mmHg basıncın %21' i ise oksijene aittir.

Su ya da vücut dokularında çözünen gazlar da basınç uygularlar; tıpkı gaz fazındaki moleküller gibi rastlantısal hareket yaparlar ve kinetik enerjiye sahiptirler. Solüsyon halindeki gaz molekülleri, hücre membranı gibi bir yüzeye karşılaştıklarında gazın yüzeye yaptığı basınç; aynen gaz fazındaki gazın kendi öz parsiyel basıncı gibi, konsantrasyonu ile

doğru orantılıdır. Ancak bir gazın eriyikteki konsantrasyonunu belirleyen sadece basıncı değil, aynı zamanda gazın erime katsayısıdır.

Özetle belirli bir sıvı hacminde erimiş olan gazın hacmi, erimiş olan gazın konsantrasyonu demektir. Bu, Henry Yasası olarak bilinen aşağıdaki formülle ifade edilebilir:

$$\text{Erimiş olan gaz konsantrasyonu} = \text{Basıncı} \times \text{Gazın erime katsayısı}$$

Her solukta alveol havasının kısmen atmosfer havasıyla değişimi, oksijenin sürekli olarak alveol havasından absorbe edilmesi, karbon dioksitin sürekli olarak pulmoner kandan alveollere difüzyonu ve kuru atmosfer havasının solunum yollarına girer girmez, daha alveollere ulaşmadan nemlendirilmesi nedeniyle alveol havasının bileşimi ile atmosfer havasının bileşimi karşılaştırıldığında gaz konsantrasyonlarının hiç de eşit olmadığı görülür. (Tablo 1) (11):

Tablo 1: Deniz yüzeyinde alveollere giren ve çıkan solunum gazlarının parsiyel basınçları-yüzde konsantrasyonları (11)

	<i>Atmosfer havası</i> (mmHg)	<i>Nemlenmiş hava</i> (mmHg)	<i>Alveol havası</i> (mmHg)	<i>Ekspirasyon havası</i> (mmHg)
N₂	597.0 (%78.62)	563.4 (%78.62)	569.0 (%74.9)	566.0 (%74.5)
O₂	159.0 (%20.84)	149.3 (%19.67)	104.0 (%13.6)	120.0 (%15.7)
CO₂	0.3 (%0.04)	0.3 (%0.04)	40.0 (%5.3)	27.0 (%3.6)
H₂O	3.7 (%0.50)	47.0 (%6.20)	47.0 (%6.2)	47.0 (%6.2)
	760.0 (%100.0)	760.0 (%100.0)	760.0 (%100.0)	760.0 (%100.0)

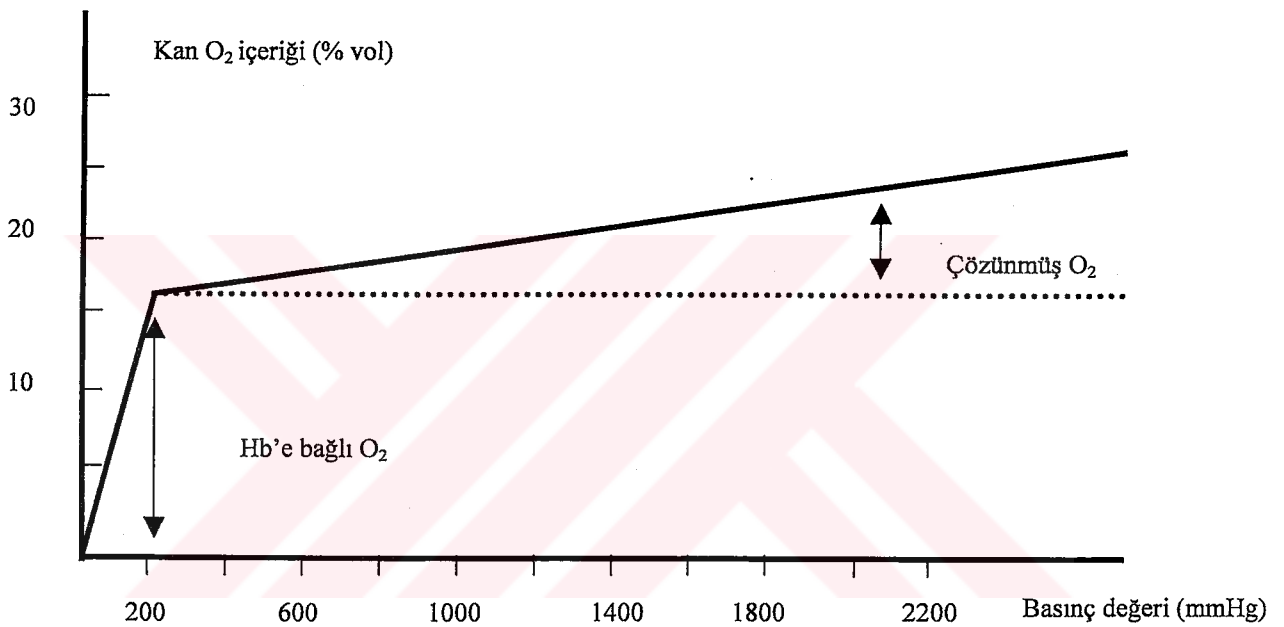
37 °C' lik normal vücut temperaturünde su buharı parsiyel basıncı 47 mmHg' dır. Bu aynı zamanda alveol havasındaki suyun parsiyel basıncıdır ve alveol total basıncı atmosfer basıncından yüksek olamayacağına göre, bu su buharı inspirasyon havasındaki tüm gazları seyreltir ve tablo 2' nin üçüncü sütunundaki değerler ortaya çıkar (11).

Oksijen alveollerden pulmoner kana difüzyona uğradıktan sonra, hemoglobinle birleşerek doku kapillerlerine taşınır, orada da hücrelerin kullanımı için serbestleşir (12).

Normalde 1 gram hemoglobin, 1.34 ml oksijen bağlayabilir. 100 ml kanda hemoglobin konsantrasyonu, 15 gr' dır. Hemoglobin %100 satüre edildiğinde 100 ml kan,

20.1 ml hemoglobine bağılı oksijen barındırır. 1 ATA'lık atmosfer basıncında hava solunduğunda hemoglobinin satürasyonu, %97' dir. Kanda hemoglobinle taşınan oksijen miktarını %100' den daha fazla arttırmak olası değildir.

Hiperbarik koşullarda, solunan oksijenin parsiyel basıncındaki artış nedeniyle, plazmada çözünen miktar da artar (13). Değişik hiperbarik şartlarda solüsyon halinde taşınan ideal O_2 miktarları Tablo 2'de ; O_2 miktarı ile PO_2 arasındaki ilişki Şekil 1' de verilmiştir.



Şekil 1. PO_2 ile kanın O_2 'i arasındaki ilişki. HBO uygulaması sırasında plazmada çözünen oksijen, dokuların metabolik gereksinimini karşılayabilecek düzeye kadar çıkarak doku hipoksisi nedeniyle bozulan fonksiyonların iyileşmesine yardımcı olur.

1 ATA' da hava solunduğunda kanın 100 ml' sinde 0.3 ml olan çözülmüş oksijen miktarı, 3 ATA' da hava solunduğunda, 6.8 ml' ye kadar yükselir (13, 14). (Tablo 2)

1 ATA' da hava solunduğunda 100 ml arteriyel kanda 20 ml oksijen bulunurken, bu miktar venöz kanda 14 ml' ye düşmektedir. Yani 100 ml kandan dokulara sağlanan oksijen miktarı, 6 ml' dir. Bu değer, 3 ATA' da 100 ml oksijen solunduğunda sadece plazmada çözünen oksijen miktarına eşittir. Bu durumda oksi-hemoglobine gerek kalmaksızın,

dokulara gereksinimlerini karşılayacak yeterli oksijen sağlanmış olur. Plazmada çözülmüş olan oksijen, direkt olarak ütilize olabilmektedir.

Tablo 2: Değişik Hiperbarik Şartlarda Dissolve Olan Oksijene (PO₂) Ait İdeal Değerler (13, 14)			
Total Basınç		Hava Solunumu	%100 O₂ Solunumu
ATA	mmHg	% vol	% vol
1	760	0.32	2.09
1.91	1452	0.77	4.23
2	1520	0.81	4.44
2.36	1794	0.99	5.29
2.82	2143	1.17	6.37
3	2281	1.31	6.80
4	3040	1.80	3 ATA'nın üzerindeki değerlerde O₂ uygulanmaz
5	3800	2.30	
6	4560	2.80	

B-II: Vazokonstriksiyon ve antiödem etki:

Hiperbarik ortam, miyokard hücreleri üzerine doğrudan etki ederek, uyarılabilirlik ve iletiyi azaltır. Böylelikle bradikardiye neden olur. HBO, kalp atım hacminde azalmadan çok, bradikardiye bağlı olarak, kardiyak outputta %10-20 arası düşmeye neden olur. Kan basıncında ise herhangi bir değişiklik olmaz. Hiperoksinin vazokonstriktif etkisinden dolayı, dokulara giden kan miktarı azalır, ancak plazmada artmış olan çözülmüş oksijenin parsiyel basıncı nedeniyle perfüzyon azaldığı halde dokulara yüksek düzeyde oksijen sağlanmış olur. Bu arada vazokonstriksiyon ve kan akımının azalması sonucunda ödem yaklaşık olarak %20 oranında azalır (4, 15). Ayrıca, hipoksiye bağlı doku ödeminde, hipoksi kaynaklı kapiler permeabilite artışının HBO ile giderilmesi de ödemin gerilemesine katkıda bulunur.

Dekompresyon hastalığı ve gaz embolilerinde, yanıklarda, travmalarda, kompartman ve crush sendromunda, purpura fulminans olgularında, serebral ve retinal ödemde HBO'nun bu etkilerinden yararlanılır (4, 5, 6, 19, 16, 17-20).

B-III: Yara iyileşmesi üzerine etkileri:

Yaralanmış dokular hipoksiktir ve doku parsiyel oksijen basıncı genellikle 20 mmHg' nın altındadır (21). Hipoksi, kapiller angiogenezin uyarıcı olmasına karşın, böyle bir ortamda fibroblastik proliferasyon ve kollagen sentezi çok yavaşlar. Oysa, kollagen matriks gelişimi için 30-40 mmHg' lık doku PO₂ düzeyi gerekmektedir ve yeni kapillerler ancak bu kollagen matriks üzerinde gelişebilir (13, 22). HBO ile doku hidroksiprolin, ATP ve fosfokreatinin düzeylerinde sağlanan ve on kata varan artış sayesinde, bir yandan neovaskülarizasyon için gerekli fibroblast-kollagen matriks desteği sağlanmış olurken, öte yandan lökositlerin bakterisidal aktiviteleri artırılarak yara iyileşmesi için optimum koşullar sağlanmaktadır.

Osteogenetik aktivite de oksijene bağımlı bir süreç olduğundan, HBO ile enfekte kemik dokusunda hipoksi ortadan kaldırılarak vasküler proliferasyon ve osteogenez uyarılır (15, 16, 22).

HBO' nun bu özelliklerinden diyabetik anjiyopati ve periferik damar hastalıklarına bağlı ülserlerde, termal yanıklarda, deri greft ve fleplerinde, osteomyelit ve osteoradyonekroz gibi patolojilerin tedavisinde yararlanılmaktadır (6, 16, 17).

B-IV: Antitoksik etkiler:

Hiperbarik oksijenasyon, toksinlerin direkt üretimini inhibe ederek ya da etki metabolizmasını engelleyerek antitoksik özellik gösterir. Gazlı gangrenin en sık rastlanan etkeni olan clostridium perfringensin toksin üretiminin HBO tedavisi sırasında durdurulması, bu etkilerden ilkinde en güzel örnektir. Karbon monoksit zehirlenmelerinde de hiperbarik oksijenasyon, karbon monoksit metabolizması üzerinden etkisini gösterir. HBO ile elde edilen yüksek PO₂ sayesinde, hem karbon monoksit eliminasyonu hızlandırılırken, hem de doku hipoksisinin önlenmesi ile dokuların yaşamı korunarak mitokondriyal solunum zincirinin yeniden fonksiyonu sağlanmaktadır (15, 16, 23).

B-V: Antibakteriyel etkiler:

Tek hücreli mikroorganizmalar, özellikle bakteriler, hiperoksiye bifazik yanıt verirler. 1 ATA' da, % 100 oksijenli ortamda E.coli ve pseudomonas aeruginosa, staf. Aureus gibi aerob bakterilerin gelişmesi hızlıdır. Ancak 1.3 ATA üzerinde oksijen bu bakterilerin gelişimini inhibe eder.

PO₂ 'nin 30 mmHg altına düşmesi, lökositlerin antibakteriyel aktivitelerini ve fagositoz mekanizmasını bozmaktadır (16, 22, 24, 25). Gerçekten de fagositoz sonrası, fagositlerin yüzeyindeki NADPH-oksidazın katalize ettiği süperoksit, hidrojen peroksit ve hipokloröz asit gibi reaktif oksijen türevlerinin oluştuğu "oksidatif burst" sırasında oksijen tüketimi 10-15 kat artmaktadır (26, 27).

Oksijen- NADPH-oksidaz sistemi, temel mikrobisidal sistem olsa da, lökositlerin bakterisidik etkilerinin tek mekanizması değildir. Temelde ikiye ayrılan bu mekanizmaların ilki, oksijenden bağımsız, ikincisi ise oksijen bağımlı antimikrobiyal sistemdir.

Hipoksik koşullarda, bakteriyel fagositoz gerçekleşir, ancak bakteriyel öldürme bozulabilir. Fagositoz anında vakuol içi pH düşer ve asit vakuol pnömokoklar gibi bazı mikroorganizmalara karşı öldürücü olabilir. Düşük moleküler ağırlıklı olan lizozom, hücre duvarını hidrolize ederek bakteriyi lizise uğratar.

Laktoferrin, bakteri gelişimi için gerekli olan demir ile şelasyon oluşturarak mikrobisidal etki gösteren bir proteindir. Ayrıca vakuol içine salınan hidrolitik enzimler, katyonik proteinler, mikroorganizmanın lipid, karbonhidrat ve proteinlerini bozarak etkili olurlar. Bu aktivitelerin oksijene bağımlı sistemlerden daha az ve yavaş etkili oldukları saptanmıştır.

Fagositoz, düşük oksijen parsiyel basıncından etkilenmese de oksidatif patlama ile bakterilerin öldürülmesi dokudaki oksijen basıncına bağlıdır. HBO, hipoksik ve enfekte dokulardaki oksijen basıncını nötrofillerin bakterileri öldürebileceği düzeye kadar yükseltir (28).

HBO, bakteriyostatik bakterisitik etkinliğini, serbest oksijen radikalleri aracılığıyla gösterir.

HBO, ayrıca, enfekte ve nekrotik dokulardaki doku onarımı ve rejenerasyonu düzenleyerek, enfeksiyonun ilerlemesini indirekt olarak önleyebilir (29).

B-V: Antibiyotik ve antifungal ajanların etkilerinin arttırılması:

Hiperbarik oksijenin aminoglizidler gibi bakteri hücre duvarını geçişleri oksijene bağlı aktif transport ile olan bazı antibiyotiklerin dışında, klindamisin, vankomisin, sefalosporinler ile de additif ve/veya sinerjistik etkisi olduğu, trimetoprim ve sisoxazol' ün bakteriyostatik ve amphoteresinin bakterisidal etkisini arttırdığı gösterilmiştir (30, 31).

HİPERBARİK OKSİJEN TEDAVİSİNİN ENDİKASYONLARI:

HBO' nun klinikte uygulama alanları giderek artmaktadır. "Undersea and Hyperbaric Medical Society" (UHMS) tarafından oluşturulan Hiperbarik Oksijen Tedavi Komitesi' nin 1999 yılında yayınladığı endikasyon listesi aşağıda verilmiştir (32). (Tablo 3) Bu liste tüm ülkelerde kabul görmüş endikasyon listesidir.

Avrupa ülkelerinde UHMS listeleri kabul görmekle birlikte, Eylül 1994' te Fransa' da ve Eylül 1996' da İtalya' da biraraya gelen Avrupa Hiperbarik Tedavi Komitesi (ECHM), HBO endikasyonlarını, akut ve kronik endikasyonlar olarak sınıflandırmıştır (33, 34). (Tablo 4)

Tablo 3: Hiperbarik oksijen tedavisinin kesinleşmiş endikasyonları (UHMS) (32)

- 1- Akut hava ya da gaz embolizmi
- 2- Karbon monoksit zehirlenmesi, akut duman inhalasyonu ve siyanid zehirlenmesi
- 3- Klostridyal miyonekroz (gazlı gangren)
- 4- Crush injury, kompartman sendromu ve öteki akut travmatik iskemiler
- 5- Dekompresyon hastalığı
- 6- Yara iyileşmesinin geciktiği durumlar: Diyabetik yara, venöz staz ülseri, dekübitis ülserleri ve arteriyel dolaşım yetmezliğine bağlı ülserler
- 7- Aşırı kan kayıpları
- 8- Yumuşak dokunun nekrotizan enfeksiyonları (deri altı, fasya ve kas)
- 9- Refrakter osteomiyelit
- 10- Radyasyon doku hasarı (osteoradyonekroz, hemorajik sistit)
- 11- Tutması kuşkulu deri greft ve flepleri
- 12- Termal yanıklar
- 13- Anaerobik ve mikst beyin abseleri

Tablo 4: ECHM endikasyon listesi (33, 34)

A- Akut endikasyonlar:

- 1- Gaz embolisi
- 2- Dekompresyon hastalığı
- 3- Karbon monoksit intoksikasyonu
- 4- Duman inhalasyonu
- 5- Gazlı gangren
- 6- Diyabetik gangren ve yumuşak dokunun karma enfeksiyonları
- 7- Crush ve kompartman sendromları
- 8- Yanıklar
- 9- Anoksik ensefalopati
- 10- Ani işitme kaybı
- 11- Oftalmolojik sorunlar (Santral retinal arter oklüzyonu, Diyabetik retinopati)

B- Kronik endikasyonlar:

- 1- Problem yaralar
 - a. Diyabetik
 - b. Non-diyabetik
- 2- Radyonekroz
 - a. Enterit
 - b. Miyelit
 - c. Osteoradyonekroz
 - d. Yumuşak doku nekrozu
- 3- Kronik refrakter osteomiyelit
- 4- Deri greft ve flepleri
- 5- Kemik iyileşmesi

HİPERBARİK OKSİJEN TEDAVİSİNİN YAN ETKİLERİ

Non invaziv ve ağrısız bir tedavi yöntemi olan HBO tedavisi sırasında bir takım yan etkiler görülebilir. Ancak hastanın ilk değerlendirilmesi sırasında ayrıntılı bir öykünün alınması ve dikkatli bir fiziksel inceleme ile bu yan etkilerden korunulabilir.

HBO tedavisi sırasında ortaya çıkan yan etkiler iki ayrı kategoride incelenir:

- a- Hiperbarik ortama bağlı yan etkiler
- b- Oksijenin toksik etkileri

A- HİPERBARİK ORTAMA BAĞLI YAN ETKİLER

1- Orta kulak barotravması: HBO tedavileri sırasında en sık rastlanan yan etkidir. Tedavinin kompresyon (dalış) fazında orta kulak basıncı ile basınç odası içindeki basıncın eşitlenememesi sonucu gelişir. Bu eşitlemeyi sağlayacak manevraların hastaya iyi öğretilmesi ve solunum yollarında konjesyonun olmaması gerekmektedir. Eğer gerekiyorsa myringotomiye başvurulabilir.

2- Sinus barotravması: Orta kulak barotravmasında geçerli olan nedenlerle, ancak daha ender olarak oluşur. Kompresyon öncesinde dekonjestanların kullanılması ile bu sorun giderilebilir.

3- Klostrorobi: Multiplace basınç odalarında bile %2 sıklıkta anksiyete görülmekle birlikte ender olarak sedasyon gerekir. Basınç odasında yardımcı personelin bulunuşu önleyici bir faktördür.

B- OKSİJENİN TOKSİK ETKİLERİ

Sembolü O, atom numarası 8, atom ağırlığı 16.000, molekül ağırlığı 31.9998 olan oksijen, kokusuz, tatsız ve renksiz bir gazdır. İsmi yunanca “asit oluşturan” anlamına gelir. Yeryüzünde en fazla bulunan elementtir. Havanın hacim olarak %20.98’ i ve ağırlık olarak %23.15’ i oksijenden oluşur. Denizlerde %85.8 ve karalarda da %46.7 oranında bulunur.

Son derece aktif bir element olması nedeniyle oksijen, aslında toksik bir özelliğe sahiptir. Aerob hücreler tarafından geliştirilmiş savunma sistemleri, içinde yaşadıkları atmosferik şartlar için geçerlidir. Bulundukları ortam basıncındaki değişiklikler veya oksijen parsiyel basıncının artışı, ya da her ikisinin birden artması gelişmiş savunma sistemlerinde yetersizliğe yol açacaktır. Aynı durum, mevcut savunma sistemlerindeki bir

yetersizlik halinde bu parametrelerde artış olmadan da gerçekleşebilir. Böylece yaşamın olmazsa olmaz elementi, toksik hale dönüşür.

İnsan organizmasında oksijenin toksik etkileri bu gazın solunum gaz karışımındaki yüzdesine, ama daha da büyük ölçüde, parsiyel basıncına ve maruz kalınma sürecine bağlıdır. Farklı dokuların ve bir bütün olarak bireylerin etkilenme düzeylerindeki farklılıklar, oksijen toksisitesi manifestasyonlarını etkileyen diğer faktördür.

Bugünkü bilgilerimiz, oksijen toksisitesinin oksijenin serbest radikalleri ile sellüler komponentler arasındaki reaksiyonlara bağlı olduğunu göstermektedir (35, 36).

Hücrelerin normal oksiredüktif faaliyeti sırasında oluşan radikallerin üretimi, hiperoksi şartlarında belirgin şekilde artar. Bunun sebebi, radikal oluşumundaki oksijene elektron transferi olayının hiperokside artması, dolayısıyla radikal oluşumunun hızlanmasıdır (35). Ancak hemen hatırlamak gerekir ki hipoksi şartında da oksidatif dengenin bozulmasına bağlı olarak doku hasarı süreci hızlanır.

Hiperoksinin, şiddet ve süre ile bağımlı olarak, insan organizmasının tüm organ ve sistemlerinde oksijen toksisitesi meydana getirebileceği de bilinmektedir.

Bireysel farklılıklar da oksijen toksisitesinde önemlidir (37). Özellikle santral sinir sistemi toksisitesinde bireysel oksijen toleransı çok belirleyici olabilmektedir.

Aslında oksijen toksisitesi hem normobarik hem de hiperbarik ortamlarda iyi tanınmaktadır. Klinik uygulamalar açısından hiperbarik oksijenasyonun üç sistem üzerindeki toksisitesi önemlidir. Bunlar; santral sinir sistemi, solunum sistemi ve vizüel değişikliklerdir.

MERKEZİ SİNİR SİSTEMİ OKSİJEN ZEHİRLENMESİ

(PAUL BERT ETKİSİ)

Oluşum mekanizması tam olarak bilinmeyen MSS toksisitesi, kural olarak 2 ATA'nın üzerindeki parsiyel oksijen basınçlarında görülür. Hiperbarik oksijenasyon sırasında artan reaktif oksijen türevlerinin membranlarda lipid peroksidasyonu, enzim inhibisyonu veya modülasyonlarına neden olarak serebral enerji metabolizması ve elektrik aktivitesinde değişikliklere yol açmasına bağlı olduğu ileri sürülür (38). Son zamanlarda, HBOT sırasında beyinde artan nitrik oksidin (NO) sorumlu olduğu da ileri sürülmektedir (39). 3 ATA'dan düşük değerlerde çok enderdir. Latent periyod, parsiyel oksijen basıncı ile ters ters orantılıdır. Hiperventilasyon ve aralıklı maruziyet latent periyodu uzatır. Clark ve Lambertsen'in 1971'de yaptıkları çalışmalarda parsiyel oksijen basıncı 1.7 ATA ise 7

saat, 1.8 ATA ise 3 saat, 2 ATA ise 50 dakika, 3 ATA ise 30 dakikada merkezi sinir sistemi oksijen toksisitesinin başlayabileceği belirlenmiştir (40).

Nadiren konvülsiyon şeklinde ve birdenbire başlar. Genelde fasiyal pallor, terleme, bradikardi, ekstrasistoller, bulantı, kusma, mimik kaslarında, özellikle perioral kaslarda seğirmeler, hıçkırık, öfori, anksiyete, davranış değişiklikleri, vizüel (görme alanında daralma) ve akustik (tinnitus) değişiklikler, vertigo, pareteziler, midriyazis, illüzyon ve halüsinasyonlar, konfüzyon ve hatta senkop gibi ön belirtilerle başlar. Bu belirtiler tek başına veya birlikte olabilir (41).

MSS oksijen toksisitesinin oluşumunu önlemek üzere, HBO tedavi protokollerinde 20-30 dakikada bir 5-10 dakikalık hava molaları verilir. Tedavi sırasında toksisite belirtilerinin farkedilmesi halinde yapılması gereken; hastayı oksijenden ayırarak hava solunumuna geçirmektir. Antikonvülzan veya anestetikler konvülsiyonları önlemekle birlikte alttaki doku hasarını önleyemezler (42).

HBO tedavileri sırasında konvülsiyon görülme oranının 1,3/10.000 olduğu bildirilmektedir (7). İstanbul Tıp Fakültesi ile GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı' nın 80679 hasta tedavisinde yaptıkları retrospektif araştırmaya göre konvülsiyon oranı 1/40339' dur (43).

PULMONER OKSİJEN ZEHİRLENMESİ (LORRAIN SMITH ETKİSİ)

Pulmoner oksijen toksisitesi, parsiyel basıncı 0.5 ATA dan daha yüksek olan oksijene uzun süre maruz kalınması sonucunda gelişir. Normalde 1 atmosferde oksijen inhalasyonu yaklaşık 10 saatlik bir süre sonunda ilk trakeobronşiyal irritasyon belirtilerine sebep olur. Tıpkı MSS toksisitesinde olduğu gibi pulmoner hasarın oluşmasında da şiddet ve süre belirleyicidir. Semptomlar asemptomatik bir latent periyodun ardından başlar, bu dönem oksijen parsiyel basıncı arttıkça kısalır (41). İlk belirtiler trakeal irritasyon hissi şeklindedir. Olayın ilerleyişi ile birlikte, retrosternal ağrı, kontrol edilemeyen öksürük, dispne ortaya çıkar.

2 ATA' da 3-6 saat %100 oksijen solunması, pulmoner toksisite için yeterli olabilir ancak, bu şekilde uzun tedaviler ciddi dekompresyon hastalığı ya da arteriyel gaz embolilerinde uygulanmaktadır. Bunun dışındaki rutin HBO tedavilerinde hava molaları koruyucu bir rol aldığı gibi, solunum fonksiyon testleriyle de izlem olasıdır (7). Vital kapasite (VK)' de HBOT öncesine kıyasla %10' luk bir azalma pulmoner oksijen

toksisitesinin başladığına işaret eder. %10-20 arasındaki VK azalmaları reversibl, %20 üzerindeki irreversible değişiklik olarak kabul edilir.

OKSİJEN TOKSİTESİNİN VİZÜEL ETKİLERİ

Miyopi, HBO tedavisinin en sık görülen yan etkilerinden biridir (44, 45, 46).

Oksijen toksisitesinin vizüel manifestasyonları, oksijenin dozu ve uygulama süresinin yanı sıra, tedaviye alınan bireyin yaşına ve bireyde duyarlılığı etkileyen faktörlerin önceden varolup olmadığına bağlı olarak değişir (41).

Diyabetik ayak ülseri, kronik osteomyelit gibi hastalıkları nedeniyle uzun süre, her gün HBO tedavisine alınan hastaların %20-40' ında, özellikle 50 yaş üzerindeki hastalarda 2-4 hafta sonra başlayan progressif miyopi geliştiği, hipermetrop olanlarda ise kırma kusurunun hafiflediği bilinmektedir. Tedavinin bitiminden itibaren genellikle 6 haftada, nadiren 6-12 ayda geri dönen bu değişikliklerin nedeni bilinmemekle birlikte, lensin içinde veya metabolizmasında reversibl değişikliklere bağlı olduğu düşünülmektedir. Miyopi çok ender olarak kalıcı olabilmektedir (47, 48).

HBO tedavisi ile lens metabolizmasında değişiklik olabileceği ihtimali, özellikle 50 yaş üzerindeki ve erken evre kataraktı bulunan hastalarda katarakt gelişimine karşı dikkatli olmayı gerektirir.

Vizüel fonksiyonlar açısından önemli olan, oksijenin retina üzerindeki vazokonstriktif etkisidir. Deneysel olarak sıçanlarda oluşturulabilen bu etki, literatürde, myastenia gravisli olan ve tedavi amacıyla 5 ay boyunca 1 ATA' da %80 oksijen uygulanan bir hasta için de kayıtlıdır (49, 50, 51).

Normobarik hiperoksinin bu olumsuz etkisine karşın, hiperbarik oksijenin retinada hipoksi yarattığına dair bilgi yoktur.

Oksijenin gözdeki toksik etkisi bakımından esas önemli olan retrolental fibroplazi ise, prematüre yenidoğanlarda arteriyel oksijen basıncını normalin üzerine çıkaran uygulamalar sonucunda gelişen özel bir patolojidir. Gestasyonel yaşın 30 haftadan küçük olması, doğum ağırlığının 1500 gr' dan az olması, sepsis, intraventriküler hemoraji gibi problemlerin varlığı retrolental fibroplazi riskini artırır. Burada, henüz gelişimini tamamlamamış olan retina sirkülasyonunun önce vazokonstriksiyon ve bunu takiben retinal arter endotel hücrelerinin destrüksiyonu nedeniyle durması sözkonusudur. Bunun ardından sağlam kalan endotel hücrelerinin disorganize ve yaygın proliferasyonu ile vasküler bir fibröz doku kitlesi oluşur ve retinayı irreversible şekilde hasarlayarak kalıcı

körlüğe neden olur. E vitamininin retrolental fibroplaziden korunmada ve tedavisinde yararlı olduğu bildirilmiştir (48).

HİPERBARİK OKSİJEN TEDAVİSİNİN KONTRENDİKASYONLARI

HBO için kesin kontrendikasyonlar, tedavi edilmemiş pnömotoraks olguları iken, göreceli kontrendikasyonlar; sınırda kalp yetmezliği, gebelik, tedavi edilmemiş malignite, pacemaker, implantlar, üst solunum yolu enfeksiyonları, kronik sinüzit, epilepsi, yüksek ateş, spontan pnömotoraks, torasik cerrahi, otoskleroz cerrahisi, optik nörit öyküsü, viral enfeksiyonlar, konjenital sferositoz gibi durumlardır (52).



II- SERBEST RADİKAL KAVRAMI

Atomlar, proton ve nötronlardan oluşan pozitif yüklü bir çekirdek ve bu çekirdeğin etrafında bulunan negatif yüklü elektronlardan oluşurlar. Elektronlar hem partikül, hem de dalga özelliğine sahip olup çekirdek etrafında ışık hızı ile hareket ederler. Bu nedenle de lokalizasyonları tam olarak tarif edilemeyip, yalnızca bulunma olasılığının en fazla olduğu yerden bahsedilebilir. Bu yerler de “orbital” olarak adlandırılır. Her orbital zıt spinli olmak üzere iki elektron içerebilir ve sayılarına göre, farklı enerji seviyesindeki elektronlar, farklı orbitalleri doldururlar. Çekirdekten uzaklaştıkça elektronların enerji seviyeleri artar. s orbitalleri çekirdek etrafında küresel, p orbitalleri elipsoid, d ve f orbitalleri ise karmaşık geometrik şekillerdedir. Elektronların bulunduğu birinci yörünge bir tane s orbitali (1s), ikinci yörünge s ve p (2s, 2p), üçüncü yörünge s, p, d (3s, 3p, 3d) ve dördüncü yörünge s, p, d, f (4s, 4p, 4d, 4f) orbitallerini içerir. Bir atomda hangi yörüngelerin bulunduğu, orbitallerin ne kadar elektron içerdiği ve orbitallere elektronların nasıl dağıldıkları atom türüne bağlı olarak değişir (53).

Her türden kimyasal ve biyokimyasal tepkime daima atomların dış orbitallerindeki elektronlar seviyesinde gerçekleşir.

Serbest radikaller, dış orbitalinde tek sayıda ortaklanmamış elektron taşıyan, elektririk yüklü veya yüksüz olabilen, atom ya da moleküllerdir. Elektronlar, belirli enerji düzeylerinde birbirlerine zıt momentli çiftler halinde bulunmaya eğilimlidirler. En dış yörüngede bulunan elektron çiftinin dengesi yörüngeye bir elektron girmesi ya da çıkmasıyla bozulursa, momentli dengelenmemiş bu tek elektron atoma ya da moleküle büyük bir aktiflik kazandırır.

En dış yörüngede eşlenmemiş bir elektronu bulunan molekül ya da molekül gruplarına “radikal” adı verilmektedir ve molekülün kimyasal simgesinin sağ üst köşesine konan nokta veya çizgiyle gösterilir ($R\cdot$, $R^\cdot$) (54-59).

Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması söz konusu kimyasal türün reaktivitesini olağanüstü arttırdığı için, radikaller reaktivitesi çok yüksek olan kimyasal türlerdir.

Oksijen 8 atom numaralı, periyodik tablonun VIa grubunda yer alan, doğada dioksijen (O_2), olarak bulunan, kararsız bir elementtir. Bu kararsız konumu, enerji düzeylerinde bulunan elektronlarının yapısıyla (2-6 ya da $1s^2, 2s^2, 2p^4$) ilişkilidir.

Moleküler (atmosferik) oksijen, dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron içerir. Bu elektronlar, spinleri aynı yönde ve farklı orbitallerde iken minimum enerji seviyesindedirler (54, 55).

Radikal tanımına göre, oksijen “diradikal” yapıya sahip bir moleküldür. Oysa oksijenin reaktivitesi beklenenin aksine çok düşüktür. Diradikal yapıya sahip oksijenin herhangi bir molekülle tepkimeye girebilmesi için, tepkimeye gireceği molekülün de benzer yapıya (farklı orbitallerde spinleri aynı yönde elektron içermesi) sahip olması gerekir. Bununla birlikte, başta organik moleküller olmak üzere, atom ve moleküller orbitallerinde elektronları antiparalel ve eşleşmiş olarak içerirler veya paylaşılmamış elektronlar kovalent bağlara katılmışlardır. Bu nedenle oksijenin diğer moleküllere olan reaktivitesi son derece kısıtlanmıştır. Bu kısıtlama “spin kısıtlaması” (spin restriction) olarak adlandırılır.

Canlıların oksijeni kullanabilmesi için, oksijene elektron transferi yaparak spin kısıtlamasını aşmaları gerekir. Bu işlem için canlılar geçiş elementleri sınıfından bazı metal iyonlarından yararlanırlar. Bunlar içerisinde Fe, Cu, Zn, Co ve Mo vücudun gereksinim duyduğu başlıca eser elementler olup, bu elementler dış orbitallerinde bir veya daha fazla sayıda paylaşılmamış elektron içerirler. Canlılarda oksijeni kullanan enzimler ya da oksijenle etkileşime giren proteinler, bu elementlerden en az bir tanesini içermek zorundadır.

Vücudumuzda ve çevremizde sadece oksijen değil, diğer atom merkezli radikaller de oluşabilirler. Oysa, özellikle biyolojik sistemlerde “radikaller” kavramından söz edildiğinde daima oksijen merkezli radikaller akla gelir. Bu anlayışın başlıca haklı gerekçeleri de şöyle sıralanır:

1. Diğer atom merkezli radikaller, difüzyon limitine yakın olan büyük bir hızla oksijenle tepkimeye girerler ve tepkimede paylaşılmamış elektron oksijen atomu üzerine kayar; radikal özelliği, oksijen atomu üzerinde devam eder.
2. Moleküler oksijen hücrelerde devamlı olarak kullanılan bir moleküldür. Oksijeni kullanabilmek için elektron transferi ile spin kısıtlamasının aşılması gerekir. Bu nedenle de oksijen metabolizması sırasında reaktif radikal türlerinin oluşması kaçınılmazdır.

3. Elektrofilik bir atom olan oksijen, dış orbitaline elektron alarak biyomolekülleri oksitler, bu sırada kendisinin radikal türleri oluşur. Metal iyonları oksijenin bu tür oksitleyici etkilerini hızlandırırlar.

Oksijenin dış orbital elektronlarının mevcut durumunun değiştirilmesi onu reaktif hale getirir ve kullanımına olanak sağlar. Bu amaçla spin kısıtlaması iki yolla aşılabılır:

- a) Oksijene elektron transferi ile: Serbest metal iyonları, özellikle proteinlere bağlı metal iyonları aracılığı ile oksijene bir veya iki elektron aktarımı katalizlenebilir. Tek elektron transferi ile süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$ süperoksit anyonu) oluşur. Spin kısıtlaması kalktığı için süperoksit, oksijene göre çok daha reaktiftir. İki elektron transferi ile de peroksi anyonu (O_2^{2-}) oluşur. Bu tür, ortamdan aldığı iki proton ile hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturur.
- b) Enerji absorpsiyonu ile: Bu mekanizma ile de oksijenin spin kısıtlaması ortadan kaldırılabilir ve iki uyarılmış formu oluşur. Singlet oksijen ($^1O_2$) olarak adlandırılan oksijenin bu formlarında dış orbital paylaşılmamış elektronlarından birinin spini değişmiştir. Zıt spinli elektronlar aynı orbitalde (delta formu) veya ayrı ayrı orbitallerde (sigma formu) bulunabilirler. Her iki formun da reaktivitesi çok yüksektir (53)

Oksijenin spin kısıtlaması aşılmış formları Şekil 2’de verilmiştir (53). Şekilde yalnızca farklılıkların gerçekleştiği 2p orbitallerinin elektron konfigürasyonları görülmektedir. Oksijenin enzimatik olarak vücutta kullanımı sırasında, metal iyonlarının yardımı ile, spin kısıtlaması bu mekanizmalarla aşılr. Ancak, enzimler tarafından üretilen reaktif türler normal koşullarda genellikle düşük derişimdedir. Oksijenin toksik etkileri esas olarak, ortama verilen ve nonenzimatik tepkimelerle oluşan radikal miktarındaki artış nedeniyle görülmeye başlanır.

Şekil 2: Moleküler oksijenin farklı formlarının 2p orbital elektronlarının konfigürasyonu
(53)

$\sigma^* 2p$	—	—	—	—	—
$\pi^* 2p$	$\uparrow \uparrow$	$\uparrow\downarrow \uparrow$	$\uparrow\downarrow \uparrow\downarrow$	$\uparrow \downarrow$	$\uparrow\downarrow$ —
$\pi 2p$	$\uparrow\downarrow \uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow \uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow \uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow \uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow \uparrow\downarrow$
$\sigma 2p$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$
	O₂	O₂⁻	O₂⁼	¹g⁺O₂	¹gO₂
	Moleküler oksijen	Süperoksit anyonu	Peroksi anyonu	Singlet oksijen	Singlet oksijen

SERBEST RADİKALLERİN OLUŞUM SÜRECİ

İçinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle devamlı bir radikal yapımı vardır. Hücre mikroortamında da önemli miktar ve çeşitlilikte radikaller üretilir. Nerede ve nasıl üretildiklerine bakılmaksızın, radikaller başlıca üç mekanizma ile oluşurlar:

1. Kovalent bağların homolitik kırılması ile: Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık (500-600 °C) kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma denir ve her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalır. Organik moleküllerdeki bağların heterolitik kırılması durumunda ise zıt yüklü iyon çiftleri oluşur ve bu türler de reaktiftir.

2. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi ile: Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa, radikal formu oluşur. Örneğin askorbik asit, glutatyon ve tokoferoller (E vitamini) gibi hücrel antioksidanlar, radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formları oluşur. Glutatyon (GSH) radikalleri indirgerken, kendisinin tiyil radikali (GS[•]) oluşur. İki tiyil radikalinin birbiriyle tepkimesi sonucu oluşan tür ise glutatyonun oksitlenmiş (GSSG) formudur.

3. Normal bir moleküle elektron transferi ile: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşturuluyorsa, bu tür indirgenme aynı zamanda da radikal oluşumuna neden olabilir. Örneğin moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksitin ($O_2^{\cdot -}$) oluşumuna neden olur. Bu mekanizma ile radikal yapımı, biyolojik sistemlerde yaygın olarak gerçekleştiğinden canlılar için önemlidir. Canlılarda çok sayıda enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle süperoksit üretilir. Süperoksit radikalinin yapımındaki artış, oksijenin diğer radikal türlerinin ve diğer atom merkezli radikallerin oluşumu için tetik fonksiyonu görür (53).

CANLILARDA OKSİJEN RADİKALLERİNİN YAPIMI

Oksijen bulunan bir ortamda çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenlerle oksijen radikalleri yapılabilir. Özellikle, oksijenin metabolize edildiği canlılarda önemli derişim ve çeşitlilikte radikal üretimi gerçekleşir. Hücrel koşullarda oluşabilen oksijen radikalleri ile oksijen içeren reaktif türlerin önemli olanları Tablo 5’ de görölmektedir (53).

Vücudumuzda oluşabilen radikallerin sayısı, “yüzlerce farklı tür” şeklinde ifade edilebilirse de, bu radikaller arasında süperoksit, hidrojen peroksit, nitrik oksit ve hidroksil radikalının özel yerleri vardır. Hatta bu radikaller içinde süperoksit ve nitrik oksit temel radikaller sayılabilir. Çünkü, süperoksit ve nitrik oksit enzimatik mekanizmalarla, devamlı olarak ve yoğun olarak üretilen radikallerdir. Ayrıca bu iki radikal, biyolojik sistemlerde tanıdığımız diğer bütün önemli radikaller ile radikal yapıda olmayan reaktif türlerin oluşumunu başlatabilecek özelliktedirler.

Tablo 5: Oksijenden ve nitrik oksitten oluşan başlıca reaktif türler. Kimyasal olarak radikal yapısına sahip olan türler paylaşılmamış elektron içeren atom üzerine konulan nokta ile belirtilmiştir. Tablonun sağında verilen nitrik oksit türlerinin çoğu radikal yapısına sahip değildir. Nitrik oksitin oksijenli ortamda kendiliğinden oksidasyonu sonucu bu türleri, paylaşılmamış elektron içermeseler bile çok reaktiftir (53).

<i>TÜR</i>	<i>ADI</i>	<i>TÜR</i>	<i>ADI</i>
$^1\text{O}_2$	Singlet Oksijen	$\text{NO}^\bullet$	Nitrik oksit
$\text{O}_2^\bullet$	Süperoksit radikal	$\text{NO}_2^\bullet$	Nitrojen dioksit
H_2O_2	Hidrojen peroksit	NO_2^+	Nitril katyonu
$\text{OH}^\bullet$	Hidroksil radikali	NO^-	Nitroksil
$\text{ROO}^\bullet$	Peroksi radikali	NO^+	Nitrozil (nitrozonyum iyonu)
ROOOH	Hidroksiperoksit	ONOO^-	Peroksinitrit
$\text{RO}^\bullet$	Alkoksi radikali	$\text{ONOO}^\bullet$	Peroksinitrit radikali
$\text{ROOR}^\bullet$	Endoperoksit	N_2O_3	Dinitrojen trioksit
$\text{HO}_2^\bullet$	Hidroperoksit radikali	N_2O_4	Dinitrojen tetroksit

Serbest radikaller hücre içerisinde şu mekanizmalarla oluşur:

1. Normal fizyolojik olaylar sırasında oluşan redüksiyon-oksidasyon (redoks) reaksiyonlarında (solunum sürecinde moleküler oksijenden su oluşumu, oksidaz grubu enzim aktiviteleri, demir, bakır gibi iyonların hücre içi reaksiyonları, mikrobiyolojik savunma)
2. Ekzojen kimyasal maddelerin enzimatik metabolizmaları ve radyant enerjinin absorpsiyonu ile (UV ışığı, x-ışınları)

Normal fizyolojik olaylar dışında organizmanın prooksidan-antioksidan dengesini etkileyen diğer faktörler oldukça geniş bir liste oluşturur. Bunlar ekzojen ve endojen olarak iki ana bölümde incelenebilir (Tablo 6) (60, 61). Ancak bu faktörler genellikle birlikte etkilidirler.

Tablo 6: Organizmada serbest radikal reaksiyonlarını arttıran faktörler (60, 61)

EKSOJEN FAKTÖRLER

1- Diyetsetel

- . Çoklu doymamış yağ asitlerince zengin beslenme
- . Alkol
- . Fazla kalorili beslenme (obesite)
- . Hayvansal proteinlerce zengin beslenme
- . Aşırı demir ve bakır alınması
- . Az sebze ve meyva yenmesi
- . Yiyeceklerin uygun olmayan koşullarda hazırlanması ve saklanması

2- Çevresel

- . Sigara dumanı
- . Hava kirliliği (O₃, NO₂, SO₂, hidrokarbonlar)
- . Diğer kirleticiler (Asbest, pestisitler, vs.)
- . Radyasyon (iyonize, ultraviyole)

3- İlaçlar

- . Antineoplastik ilaçlar (Adriamisin, vs)
- . Glutasyon tüketen ilaçlar (Asetaminofen, kokain gibi)

ENDOJEN FAKTÖRLER

- 1- Fiziksel egzersiz/sedanter yaşam
- 2- Stres
- 3- Yaşlılık
- 4- Doku hasarı ve kronik hastalıklar (Ateroskleroz, kanser, kronik inflamasyon, iskemi-reperfüzyon hasarı gibi)
- 5- Diyetsetel antioksidanların sağlanması etkileyen koşullar (iştahsızlık, kolestat, malabsorbsiyon gibi)

Diyet: Yiyecek içeriği ve miktarı organizmanın prooksidan-antioksidan dengesini değiştirmektedir. Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA), omega 6 (n-6) ve omega 3 (n-3) olmak üzere iki grupta toplanır. Omega 6 serisinde temel yağ asidi linoneik asit, diğerinde ise linoneik asittir. Bu yağ asitlerinin bulunma yerleri ve biyolojik fonksiyonları arasında önemli farklılıklar bulunmaktadır. Omega 6 serisi yağ asitleri ayçiçek yağı, mısır yağı, pamuk yağı gibi bitkisel yağlarla sağlanırken, omega 3 serisinin en önemli yağ asitleri olan eikosapentaenoik asit ve dokosaheksanoik asit ise balıklarla alınmaktadır (62).

Gerek omega 6 ve gerekse omega 3 yağ asitleri, antiaterojen yağ asitleri olarak benimsenmektedir. Gerçekten de balık yağları ılımlı dozlarda serum trigliserit düzeylerini düşürmekte, LDL ve HDL kolesterol düzeylerini etkilememektedir. Öte yandan, omega 3 ve 6 yağ asitlerinin dayanıklı olmayıp, kolayca otooksidasyona uğradığı, bu nedenle de PUFA ile zengin beslenmenin organizmada lipid peroksidasyonuna duyarlılığı arttırdığı, antioksidan rezervi bozduğu ileri sürülmektedir (62, 63). Buna karşılık, tekli doymamış yağ asitleri (MUFA) otooksidasyona dirençlidir ve LDL' nin oksidasyona duyarlılığını azaltmaktadır. Bir MUFA olan oleik asitçe zengin zeytinyağının bol tüketildiği ülkelerde kalp hastalıklarının insidansı daha düşüktür (62).

Alkolün hepatotoksik etkisi de büyük oranda karaciğerde serbest radikal oluşumundaki artışa bağlanmaktadır (64, 65). Alkol, karaciğerde lipid peroksidasyonunu arttırmakta ve antioksidan sistemi etkilemektedir. Kırmızı şarabın LDL' nin otooksidasyona duyarlılığını azalttığı bildirilmiştir. Ancak bu etkinin alkolün kendisinden çok, şaraptaki antioksidan etkili flavanoidden kaynaklandığı bildirilmektedir (62).

Yüksek kalorili beslenme ile radikal oluşumu arasında da doğrudan bir ilişki bulunmaktadır (66). Bu etki, özellikle mitokondri kaynaklı serbest radikal artışı ile ilgilidir. Düşük kalorili diyetle beslenen ratlarda yaşam süresinin uzadığı, DNA, protein ve lipidlerde daha az oksidatif hasar görüldüğü, DNA onarım kapasitesinin yükseldiği bulunmuştur (66, 67).

Bitkisel proteinlerin de hayvansal proteinlere oranla otooksidasyona daha dirençli olduğu saptanmıştır (66). Bu durum, proteinlerdeki histidin, lizin gibi otooksidasyona açık aminoasit içeriğindeki farklılıktan ileri gelmektedir.

Diyetsel demir ve bakır içeriğindeki artış da gerek kanser, gerekse kalp-damar hastalıkları açısından önemli bir risk faktörüdür (62).

Sebze ve meyvalar önemli oranda antioksidanlar ve çeşitli kofaktörler içerdiğinden oksidatif strese karşı savunma sisteminin oluşturulmasında çok önemli kaynaklardır (62).

Tüm bunların yanında alınan yiyeceklerin içeriği, hazırlanma ve saklanma koşulları da önemlidir. Çoklu doymamış yağ asitlerinin içeriği, oksidasyonu kolaylaştırıcı metallerin düzeyi, ısı, ışık gibi birçok faktör serbest radikal reaksiyonlarını etkilemektedir (61, 62).

Sigara: Sigaranın gerek duman, gerekse katran fazında çeşitli radikaller oluşmaktadır (62). Bir pufflık sigara dumanı, ortalama 10^{14-16} serbest radikal içermektedir (68). Sigara kullanımı, DNA hasarına yol açmaktadır ve bu olay yalnız aktif içicileri değil, pasif içicileri de kapsamaktadır (61, 62).

Hava kirliliği doğuran faktörler (çevresel inhalatif oksidanlar): Bu başlık altına ozon (O_3), azot dioksit (NO_2), kükürt dioksit (SO_2) ve hidrokarbonlar alınabilir (60,62).

Radyasyon: Radyant enerjinin absorpsiyonu ile su moleküllerinden radikaller açığa çıkar. Güneş ışığının önemli bir bileşeni olan ultraviyole de radikal kaynağıdır (62).

Egzersiz: Özellikle yoğun egzersizde organizmada oksijen türevi radikallerin oluşumu artmaktadır. Bu artışta, mitokondriyal elektron transport zincirindeki elektron akışının hızlanması, ksantin oksidaz aktivitesindeki artış, transferrinden demirin serbestleşmesi, lokal inflamasyon, antioksidan tüketimindeki artış gibi faktörler rol oynamaktadır (61, 62).

Ancak düzenli yapılan egzersizde adaptasyon mekanizmalarının devreye girmesiyle antioksidan enzim aktivitelerinin arttığı, inflamasyon eğiliminin veserbet demir düzeylerinin azaldığı, DNA onarım mekanizmalarının indüklendiği ve LDL oksidasyon suyarlılığının azaldığı ortaya konmuştur (62).

Stres: İmmobilizasyon stresi ve soğukta bırakma gibi stres modellerinde çeşitli dokularda lipid, protein ve DNA düzeyinde oksidatif hasar oluşumu görülmüştür (62). Stres sırasında ortaya çıkan serbest radikal artışının aşırı miktarlarda salgılanan katekolaminlerin oksidasyonundan ileri geldiği öne sürülmektedir.

Yaşlanma: Denham Harman' ın 1956' da yaşlanmayla serbest radikaller arasındaki ilişkiyi ortaya atan teorisi (69), hücrelerde radikal birikiminin organizmada yol açtığı hasarlar üzerine ilgiyi çekmiş ve ardından gelen çok sayıdaki araştırma, rapor, yayın da bu teoriyi destekler nitelikte olmuştur (70-74).

Hem nükleer hem de sitoplazmik komponentlerde progressif bir bozulmaya sebep olan serbest radikal hasarı, yaşlanmaya neden olur. DNA' da oksidatif hasarın bir göstergesi olan 8-deoksiguanozin düzeylerinin yaşla birlikte artışı, deney hayvanlarında

gösterilmiştir. Bununla birlikte, dokularda protein karbonil gruplarında ve lipid peroksit düzeylerinde artış ve antioksidan sistemde ortaya çıkan bazı değişiklikler de serbest radikal-yaşlanma ilişkisini desteklemektedir (62).

Doku hasarı ve kronik hastalıklar: Ateroskleroz, kanser (62, 75, 76), kronik inflamasyon (60, 104), iskemi-reperfüzyon hasarı (2, 77) gibi durumlarda organizmada prooksidan-antioksidan dengesi, prooksidanlar lehine bozulmaktadır (62).

Diyetsel antioksidanların sağlanmasını etkileyen koşullar: İştahsızlık, kolestaz, malabsorbsiyon gibi koşullarda antioksidan alımı olumsuz yönde etkilenmektedir (62).

BIYOLOJİK OKSİDASYON

Oksidasyon, kimyasal olarak elektronların çıkarılması ve elektron kazanımı ile indirgenme olarak tanımlanmaktadır ve iki değerli demirin (ferro) üç değerli demire (ferri) oksidasyonu ile örneklenir. Yani, oksidasyon olaylarında daima bir elektron alıcısının indirgenmesi söz konusudur. Bu oksidasyon-redüksiyon ilkesi, biyokimyasal sistemlere de aynen uygulanır ve biyolojik oksidasyonların temelinde yatar. Biyolojik oksidasyonların birçoğu, moleküler oksijenin katılımı olmaksızın da (dehidrojenasyon gibi) gerçekleşebilmektedir.

Oksidasyon ve redüksiyona katılan enzimler oksidoredüktazlar diye adlandırılır. Oksidoredüktazlar oksidazlar, dehidrojenazlar, hidroperoksidazlar ve oksijenazlar olarak dört gruba ayrılmıştır.

Oksidazlar: Oksidazlar, hidrojen alıcısı olarak oksijeni kullanan bir substrattan hidrojenin uzaklaştırılmasını katalize ederler. Moleküler oksijenin katıldığı tepkimeleri katalizleyen enzimleri belirtmek için bazen topluca “oksidaz” deyimini kullanılır. Bunlar tepkime ürünü olarak su veya hidrojen peroksit oluşturur.

Bazı oksidazlar bakır içerir. Sitokrom oksidaz, birçok dokuda yaygın olarak bulunan bir hemoprotein olup, tipik olarak miyoglobin, hemoglobin ve diğer sitokromlarda bulunan hem prostetik grubunu içerir. Bu enzim, mitokondrilerde bulunan solunum taşıyıcı zincirinin son elemanıdır ve dolayısıyla, substrat moleküllerinin dehidrojenazlarla oksidasyonu sonucunda ortaya çıkan elektronların nihai alıcıları olan oksijene aktarılmasından sorumludur. Enzim, karbon monoksit, siyanür ve hidrojen sülfür ile bloke edilir.

Diğer oksidazlar flavoproteinlerdir. Flavoprotein enzimler, prostetik grup olarak flavin mononükleotid (FMN) veya flavin adenin dinükleotid (FAD) içerir. FMN ve FAD, vücutta riboflavin vitamininden üretilir. FMN ve FAD, genellikle kendilerine karşılık gelen apoenzim proteinine sıkıca (kovalan değil) bağlıdır. Birçok flavoprotein enzim, vazgeçilemez kofaktör olarak bir ya da daha çok sayıda metal içerir ve bunlara metalloflavoproteinler adı verilir.

Doğal olarak bulunan L-amino asitlerin oksidatif deaminasyonu için genel özgüllük gösteren ve böbrekte bulunan, FMN' ye bağlı bir enzim, L-amino asit oksidaz oksidazların bu grubu içinde yer alır.

Ksantin oksidaz çok daha geniş bir dağılım göstermekte olup, anne sütü, ince barsak, böbrek ve karaciğerde bulunur. Molibden içerir ve pürin bazlarının ürik asite çevriminde önemli rol oynar.

Aldehit dehidrojenaz, memeli karaciğerinde bulunan FAD' a bağımlı bir enzimdir. Molibden ve hem dışı demir içeren bir metalloflavoprotein olup, aldehitler ve N-heterosiklik substratlar üzerine etki yapar.

Glukoz tayininde kullanılması nedeniyle ilgi duyulan glukoz oksidaz ise, mantarlardan hazırlanan bir FAD-özgül enzimdir.

Tüm bu enzimlerin oksidasyon ve redüksiyon mekanizmaları karmaşıktır. Ancak, ortak özellik olarak, hepsinin girdiği tepkimelerde izoalloksazin halkasının indirgenmesinin bir semikinon; yani serbest radikal ara ürünü üzerinden giden iki basamaklı bir olay olduğu bilinmektedir.

Dehidrojenazlar: Dehidrojenazlar hidrojen alıcı olarak oksijeni kullanamazlar. Bu sınıfta oldukça geniş sayıda enzim yer alır. Bunlar iki ana işlev görürler:

1. Hidrojenin, kenetlenmiş bir oksidasyon-redüksiyon tepkimesinde bir substrattan diğerine aktarılması
2. Substrattan oksijene giden elektron taşıyıcı solunum zincirinin bir yapıtaşı olarak

Dehidrojenazların çoğu nikotinamid koenzimlerine bağımlıdır. Bunların bazıları nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+) veya nikotinamid adenin dinükleotid fosfat ($NADP^+$) için özgüldür. Bazı dehidrojenazlar ise NAD^+ veya $NADP^+$ yi kullanabilir.

Genel olarak NAD^+ a bağımlı dehidrojenazlar, metabolizmanın oksidatif yolları, özellikle glikoliz, sitrik asit siklusu ve mitokondrilerdeki solunum zincirinde yer alan oksidoredüksiyon tepkimelerini katalizler. $NADP^+$ ye bağımlı dehidrojenazlar ise,

karakteristik olarak yağ asidi ve steroid sentezinin mitokondri dışı yolları gibi, indirgeyici sentezlerde yer alır.

Diğer bazı dehidrojenazlar riboflavine bağımlıdır. Riboflavine bağlı dehidrojenazların çoğu solunum zincirinde yer alır veya bu zincire elektron taşınması ile ilişkilidir.

Sitokrom oksidaz hariç, sitokromlar da dehidrojenazlar olarak sınıflandırılabilir. Sitokromlar demir içeren hemoproteinler olup demir atomu oksidasyon ve redüksiyon sırasında Fe^{3+} ile Fe^{2+} arasında salınır.

Hidroperoksidazlar: Hidroperoksidazlar hidrojen peroksit veya başka bir organik peroksiti substrat olarak kullanırlar. Yani aslında organizmanın antioksidan savunma sistemi içinde yer alırlar.

Hidroperoksidazlar grubunda peroksidazlar ve katalaz bulunur.

Peroksidazlar, başlangıçta bitki enzimleri olarak kabul edilmelerine karşın, anne sütü, lökosit, trombosit ve eikozanoid metabolizmasına karışan diğer dokularda da bulunmuştur. Peroksidazlar tarafından katalizlenen bir tepkimede hidrojen peroksit, askorbat, kinonlar ve sitokrom c türü bir elektron alıcı gibi davranan çeşitli maddelerin aleyhine, indirgenmeye uğrar. Peroksidazlar tarafından katalizlenen tepkimeler karışık ise de genel olarak şu şekilde ifade edilebilir:



Eritrositler ve diğer dokularda prostetik grup olarak selenyum içeren bir enzim olan glutatyon peroksidaz, indirgenmiş glutatyon aracılığıyla hidrojen peroksit ve lipid hidroperoksitlerin yıkılmasını kataliz eder ve membran lipidleri ile hemoglobini peroksitlerle okside olmaktan korur.

Katalaz ise elektron verici ve alıcı olarak hidrojen peroksiti kullanır.

Oksijenazlar: Biyolojik oksidasyonlarda görev alan bir diğer enzim grubu olan oksijenazlar ise, amacı hücreye enerji sağlamak olan tepkimelerde yer almak yerine birçok farklı metabolit tipinin yapım veya yıkımı ile ilgili reaksiyonlarda görev alır.

Oksijenazlar grubundaki enzimler oksijenin bir substrat molekülüne katılımın kataliz eder. Bu olay iki basamakta gerçekleşir: (1) Oksijenin enzime etkin noktada bağlanması ve (2) bağlı oksijenin indirgendiği veya substrata aktarıldığı tepkime.

Oksijenazlar iki alt gruba ayrılabilir:

Dioksijenazlar, moleküler oksijenin her iki atomunu substrata yerleştirir. Bu tipe ait örnekler arasında karaciğerin süpernatan payında bulunan 3-hidroksiantranilat dioksijenaz ve homogentisat dioksijenaz gibi demir içeren enzimler ve karaciğerde bulunan L-triptofan dioksijenaz(triptofan pirrolaz) gibi hem kullanan enzimler yer alır.

Monooksijenazlar (karma işlevli oksidazlar hidroksilazlar) substrata moleküler oksijenin sadece bir atomunu yerleştirir. Özellikle ksenobiyotiklerin hidroksilasyonunda mikrozomal sitokrom p450 sistemleri önem taşır. Bu monooksijenazlar, karaciğer mikrozomlarında sitokrom p450 ve sitokrom b₅ ile birlikte bulunur. Bu sistemle metabolize edilen ilaçlar arasında benzpiren, aminopirin, anilin, morfin ve benzfetamin yer alır. Mitokondriyal sitokrom p450 monooksijenaz sistemleri steroidal hidroksilasyonları katalizler. Bu sistemler sürrenaller, testis, ovaryum ve plasenta gibi steroid üreten dokularda bulunur ve kolesterolden steroid hormonlarının sentez edilmesiyle ilgilidir (78).

RADİKAL YAPISINA SAHİP OLAN BAŞLICA TÜRLER

Singlet oksijen (¹O₂)

Oksijenin enerjetik olarak uyarılan bu formunda spin kısıtlamasının kaldırılmış olması nedeniyle reaktivite çok yüksektir. Aldığı enerjiyi çevreye dalga enerjisi şeklinde verip oksijene geri dönebildiğinden, oluşumu kemilüminesans ölçümü ile izlenebilir (53).

Singlet oksijen, tüm canlılar ve mikroorganizmalar için öldürücü, çok güçlü bir silahtır. Etki şeklinin, rastladığı tüm kimyasal maddelere çift bağlarla bağlanması sonucu olduğu kabul edilir.

Tek çizgili denilen bu oksijenin ömrü uzun değildir; ışıık, ısı ve kimyasal enerji vererek yıkılır. Kolayca anlaşılacağı üzere, bu oksijen türünün havanın oksijeni ile direkt ilgisi yoktur: Isıtılmış hava oksijeni, manyetik alandaki emisyon spektrumunda üç ayrı çizgi verir (Triplet oksijen). Halbuki singlet oksijen tek bir çizgi verir; adı da buradan gelmektedir. Bu iki tip oksijenin elektronca da farkları vardır: Hava oksijeninin elektron çiftlerinin manyetik alanları aynı yönde yani, paramanyetik iken, singlet oksijenin elektron çiftlerinin manyetik alanları karşıt yönde yani, diamanyetikler (79).

Singlet oksijen, vücutta başlıca şu mekanizmalarla oluşabilir:

- a) Pigmentlerin (örneğin flavin içeren nükleotidler, bilirubin ve retinal pigmentler) oksijenli ortamda ışığı absorblamasıyla

- b) Hidroperoksitlerin metaller varlığındaki yıkım tepkimelerinde
- c) Kendiliğinden dismutasyon tepkimeleri sırasında (örneğin fagozom içinde)
- d) Prostaglandin endoperoksit sentaz, bazı sitokrom p450 tepkimelerinde, miyelo/kloro/laktoperoksidaz enzimlerinin etkileri sırasında (prostaglandin sentez yolunda, adrenal korteks, testis, ovaryum, ve plasentada sitokrom p450 sistemlerinin rol aldığı kolesterolden steroid sentezinde, karaciğer mikrozomal sitokrom p450 reaksiyonlarında).

Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enerjiyi transfer eder, ya da kovalent tepkimelere girer. Özellikle karbon-karbon çift bağları, singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. Bu moleküllerin başında tokoferoller, fenoller, bilirubin, DNA, karotenler, kolesterol, NADPH, triptofan, methionin, sistein ve histidin gibi bileşikler gelir. Doymamış yağ asitleri ile doğrudan tepkimeye girerek peroksi radikalini ($ROO\cdot$) oluşturur ve $OH\cdot$ kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir (53).

Süperoksit radikali ($O_2\cdot^-$)

Canlılarda olduğu gösterilmiş ilk radikal olan süperoksit, elektrokimyasal, fotokimyasal, fizyolojik bir takım reaksiyonlar sonrasında ve yüksek enerjili iyonize radyasyon etkisiyle oluşabilir (80, 81, 82).

Vücuttaki üretim mekanizmaları şu şekilde sıralanabilir:

- 1- İndirgeyici özellikteki biyomoleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksit radikali oluşur. Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler, indirgenmiş nükleotidler gibi yüzlerce biyolojik molekül aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit yapımına neden olurlar.
- 2- Başta, çeşitli dehidrojenazlar ve oksidazlar olmak üzere, yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında süperoksit radikali bir ürün olarak oluşabilir.
- 3- Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin %1-5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni NADH dehidrojenaz ve Koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olmasıdır. Beklenilenin aksine, oksijenin mitokondri solunumu sırasında bağlandığı ve suya indirgendiği sitokrom oksidaz basamağında radikal yapımı gösterilememiştir. Sitokrom oksidaz, Fe, Cu, Zn, Mg atomlarını 2:2:1:1 oranında içeren bir protein olup, süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz aktivitelerine sahiptir. Bu sayede sitokrom

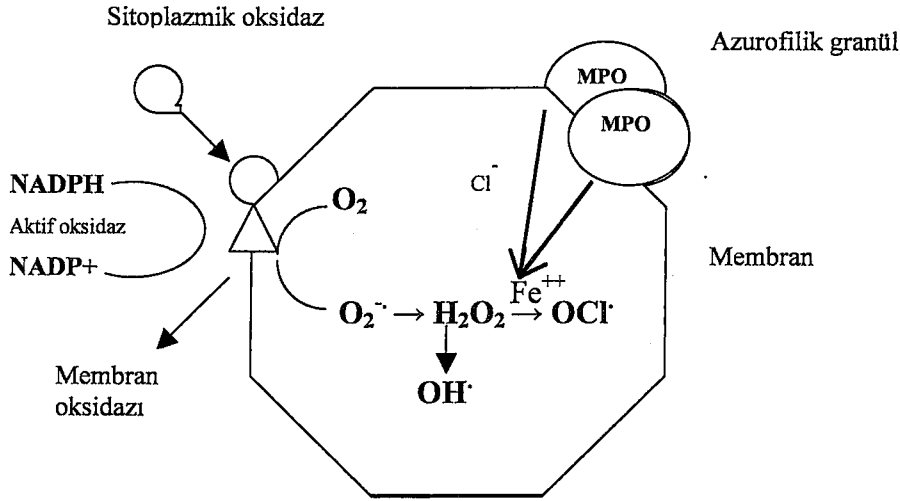
oksidaz üzerinden süperoksit ve hidrojen peroksit oluşsa bile, içerdiği enzimatik aktivite sayesinde hızla ortamdan temizlenir (53).

- 4- Fagositozda, aktive edilen fagositik hücreler bol miktarda süperoksit üreterek fagozom içine ve bulundukları ortama verirler. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal yapımı, daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatır. Fagositoz olayı, oksijen tüketiminde ani artış, glikojen katabolizması (glikojenoliz), glikoz oksidasyonunda artış ve reaktif oksijen metabolitlerinin üretimi ile karakterize oksidatif bir patlamayı uyarır. Oksijen metabolitlerinin oluşumu, lökosit NADPH oksidazın hızlı aktivasyonuna bağlıdır. Bu, NADPH' ı oksidasyona uğratar ve proste oksijen, süperoksit iyonuna indirgenir. Süperoksit, çoğu kez spontan dismutasyonla hidrojen peroksit'e dönüşür. Üretilen hidrojen peroksit miktarı genellikle, birçok bakterinin öldürülmesinde yetersiz kalır. Ancak, nötrofillerin lizozomları (azurofilik granüller), miyeloperoksidaz (MPO) enzimi içerirler ve Cl^- gibi bir halid varlığında MPO, hidrojen peroksiti hipoklöröz radikale ($HOCl$) dönüştürür. $HOCl$, kuvvetli bir oksidan ve antimikrobiyal ajandır ve bakteriyi halojenasyonla veya protein ve lipid peroksidasyonu ile öldürür (83). (Şekil 3)

NADPH-oksidaz sisteminin önemi, yineleyen enfeksiyonlar ve deri, akciğer ve lenf düğümlerine geniş çapta dağılmış granülomlarla karakterize, ender görülen bir hastalık olan Kronik Granülomatöz Hastalık' ta oksidatif patlamanın kusurlu olduğunun gözlenmesiyle açık bir şekilde ortaya konmuştur (84).

SİTOPLAZMA

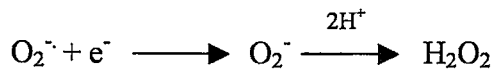
FAGOSİTİK VAKUOL



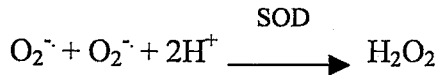
Şekil 3: Fagolizozom içinde oksijen bağımlı bakterisidal mekanizmaların özeti. MPO (mieloperoksidaz), NADP⁺ ve NADPH, sırasıyla nikotin adenin dinükleotid fosfatın okside ve redükte formları (83).

Süperoksitlerin organizmadaki akıbeti:

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



Yukarıdaki tepkime, biyolojik moleküllerin oksidasyonuna neden olduğundan tercih edilmez. Aerobik canlılarda süperoksitlerin H₂O₂' e çevrilmesi, katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenir.



SOD tarafından katalizlenen bu tepkime “dismutasyon tepkimesi” olarak adlandırılır. Dismutasyon hızı, asidik pH değerlerinde hızlanır (85, 86). Süperoksit, özellikle hafif asidik koşullarda SOD olmadan, kendiliğinden dismutasyonla da hidrojen peroksit'e çevrilebilir. Süperoksit, pK' sı 4.8 olan zayıf bir baz olduğundan, pH' nın daha düşük olduğu fagozom içinde kolaylıkla kendiliğinden mutasyonla hidrojen peroksit

oluşturabilir. Nötral pH' da enzimatik dismutasyon 10^9 kez daha hızlı olduğundan, SOD enzimi savunma için mutlaka gereklidir.

SOD enziminin yüksek katalitik aktivitesi nedeniyle hücrelerde süperoksit birikimine izin verilmez. Ancak çeşitli patolojik durumlarda süperoksit yapımının artması durumunda, süperoksit özgül tepkimeler görülmeye başlar. Süperoksit metal iyonlarını indirgeyerek bağlı bulundukları proteinlerden salınımına neden olur, kofaktörlerin oksidasyon düzeylerini bozar, metal iyonlarının katıldığı hidroksil radikali yapım tepkimelerini hızlandırır. Diğer radikallere göre daha az reaktif olsa da, süperoksit indirgenmiş nükleotidleri, bazı aminoasitleri ve antioksidan bileşikleri (glutasyon, askorbik asit, tokoferol) oksitler. Süperoksit, hücre zarlarının hidrofobik ortamlarında daha uzun ömürlü ve çözünürlüğü daha fazladır. Zar fosfolipidleri nedeniyle hücre zarı yüzeyleri daha asidiktir ve süperoksit burada daha kolayca bir proton alarak hidroperoksit radikalini ($HO_2\cdot$) oluşturur. Bu radikal de çok reaktif olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonunu başlatabilir ve zarsal antioksidanları (tokoferol) oksitleyebilir (53).

Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit, eşleşmiş elektrona sahip olmadığından, aslında bir radikal değildir (85, 86). Oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitlerin enzimatik/nonenzimatik dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşur.

Oksidazlar, ya tekli (NADPH Oksidaz) ya da çiftli (Glukoz Oksidaz) elektron eklenmesini katalize ederek Süperoksit anyonu veya Hidrojen peroksit oluşmasını sağlarlar.



Yani, Hidrojen peroksitin oluşumunda rol alan tek enzim SOD değildir. Ek olarak L-Aminoasit oksidaz, Glikolat oksidaz, Monoamin oksidaz da dokularda hidrojen peroksit oluşumunu katalizler (87).

Hidrojen peroksitin, pK' sı 10.6 olduğundan, nötral ve asidik koşullarda net yük taşımaz, biyolojik zarları kolayca geçebilir. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz, reaktif bir tür değildir.

Hidrojen peroksitin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni, Cu ve Fe gibi metal iyonları varlığında hidroksil radikalinin öncülü olarak davranmasıdır (53).

H₂O₂, hücre içinde çok yüksek konsantrasyonlarda olmadığı sürece yüksek düzeyde toksik bir ajan değildir. Ancak sıklıkla demir (Fe(II)) ve daha nadiren bakır (Cu(I)) gibi indirgen iyonların varlığında hidrojen peroksitten Hidroksil radikalleri (OH[•]) ve Hidroksit iyonu (OH⁻) meydana gelir. Oluşan reaksiyon zinciri de FENTON ya da HABER-WEISS tipi oksidasyonlardır (88, 89,90).

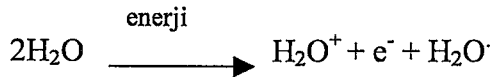
Özellikle, proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki ferril demir (Fe^{IV}) ve perferril demir (Fe^V) oluşumuna neden olur. Bu formdaki reaktif demir, çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarındaki lipid peroksidasyonunu başlatabilir. Belirtilen potansiyel oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H₂O₂ ' in derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi, hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri yerine getirirler (53).

Hidroksil radikali (OH[•])

Hidroksil radikali, Fenton reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan tek destrüktif türev olmamakla birlikte (91), oksidize edici etkisi ve yapısı en iyi dökümanite edilmiş moleküldür (92).

Biyolojik ve kimyasal sistemlerde üretilebilen hidroksil radikali (OH[•]), canlılarda iki mekanizma ile oluşabilir:

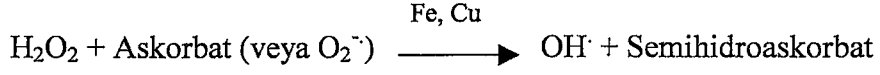
- A. İyonlaştırıcı radyasyonun etkisiyle sulu ortamda, su molaküllerinin iyonlaşması gerçekleşir:



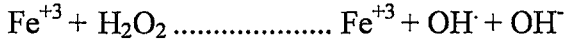
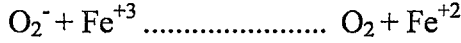
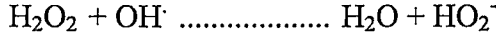
Uyarılmış su molekülü (H₂O⁺), homolitik yıkım ile; H₂O⁺ ise bir su molekülü ile tepkimeye girerek, başlıca reaktif radikal olan hidroksil radikallerini oluştururlar. Bu tepkimeler femtosaniyeler içinde gerçekleşir ve üretilen OH[•], radyasyonun canlılardaki toksik etkisinden sorumlu başlıca kimyasal türdür.

- B. Hidrojen peroksitin eksik indirgenmesi ile OH[•] yapımı, vücutta bu radikalın en önemli kaynağıdır. H₂O₂ ' in iki elektron ile indirgenmesi ile su oluşurken, tek elektronla indirgenmesi OH[•] yapımına neden olur. Bu tür indirgenme, Fe, Cu gibi metal iyonları tarafından katalizlenir. Bu dönüşümler Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları olarak bilinir. Askorbik asit, süperoksit gibi indirgeyici

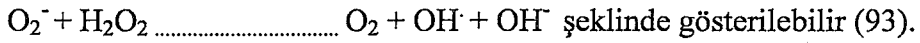
bileşiklerin de bulunduğu ortamda, oksitlenen metal iyonu tekrar indirgendikten, H_2O_2 'ten $OH^\cdot$ yapımı, sürekli bir duruma gelir.



Haber-Weiss reaksiyonu, indirgen olarak süperoksit anyonunun rol aldığı Fenton reaksiyonu olarak ele alınabilir:



Toplu reaksiyon,



Fenton ya da Haber-Weiss tepkimesi olarak adlandırılan bu tepkime ile ne kadar $OH^\cdot$ oluşacağı, vücutta üretilen H_2O_2 derişimi ve serbest metal iyonunun varlığına bağlıdır. Süperoksit hem H_2O_2 ' in öncülü hem de metalleri indirgeyici bir tür olduğundan; biyolojik koşullarda süperoksit yapımının arttığı ortamda $OH^\cdot$ üretimi kaçınılmazdır. Fenton tepkimesini katalizleyen en aktif metal iyonları demir ve bakırdır. Mangan ve kobalt da bu bakımdan aktif olsalar da, vücuttaki derişimlerinin düşüklüğü nedeniyle demir ile kıyaslandıklarında çok daha az etkindirler. Serbest metal iyonlarının vücut sıvılarındaki derişimi ölçülemeyecek kadar azdır. Demir, metabolizmasının her aşamasında mutlaka bir proteine (ferritin, transferrin, laktoferrin gibi) bağlı durumda ya da küçük organik moleküllerle (sitrat, ADP, ATP gibi) kompleks oluşturmuş formda bulunur. Bakır, seruloplazmine sıkı bağlıdır; diğer metal iyonları ise metalotiyoneinlerle birlikte bulunur. Metal iyonlarının proteinlere bağlı formda tutulmaları, $OH^\cdot$ yapımını önlemenin en güvenli yoludur (53).

Hidroksil radikalinin tepkimeleri:

Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan $OH^\cdot$, su dahil, ortamda rastladığı her biyomolekülle difüzyon limiti hızı ile tepkimeye girer. Bu nedenle 10^{-9} saniyeden daha kısa bir ömre sahiptir (94). Hidroksil radikalinin tepkimeleri başlıca:

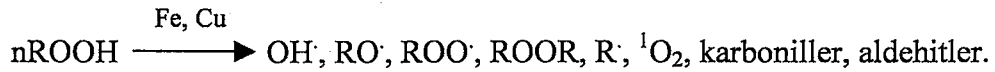
- a) Elektron transfer tepkimeleri
- b) Hidrojen çıkarma tepkimeleri
- c) Katılma tepkimeleri

şeklinde gerçekleşir. Bütün bu tepkimeler, OH' in paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır. Katılma tepkimeleri özellikle elektronca zengin moleküllerle (pürin ve pirimidin bazıları, aromatik amino asitler gibi) gerçekleşir.

Hidroksillenmiş bileşiklerin, örneğin 8-oksoguanin ve hidroksillenmiş aromatik amino asitlerin biyolojik örneklerde tayini, in vivo koşullarda OH' in ne kadar üretildiği veya radyasyona ne kadar maruz kalındığı hakkında bilgi verir.

Hidroksil radikalının organik moleküllerden hidrojen (bir proton ve bir elektron) atomu alarak suya indirgendiği tepkime “hidrojen çıkarma tepkimesi” olarak bilinir. Bu radikalın katılma tepkimesi ile biyomoleküller oksitlenir ve tepkime de sonlanır. Oysa hidrojen çıkarma tepkimesi ile başlayan OH' in etkisi, zincirleme tepkimeler şeklinde devam eder. Şöyle ki: Organik bir molekülden (R) hidrojen çıkarılması ile karbon merkezli radikaller derhal ortamdaki bir oksijen molekülü ile tepkimeye girerek peroksi radikalini (ROO·); peroksi radikali ise, OH' gibi davranarak bir diğer organik molekülden (R') hidrojen çıkararak yeni bir karbon merkezli radikal (R'') oluşumuna neden olurken, kendisi hidroperoksit (ROOH) formuna indirgenir. Organik hidroperoksit, radikal özelliği taşımadığından oldukça stabildir. Oluşan yeni karbon merkezli radikal (R'') ise aynı şekilde yeni bir tepkime dizisini başlatır.

Organik hidroperoksitler her ne kadar stabil bileşikler ise de; Fe ve Cu gibi metal iyonları varlığında radikalik tepkimelerle parçalanırlar ve bu tepkimeler sırasında yeni karbon merkezli radikaller, oksijen radikalleri, karboniller ile sitotoksik aldehytler oluşur:



Görüldüğü gibi, radikalik tepkimeler zincirleme tepkimelerdir. Bir tek OH' ile başlatılan tepkime, her seferinde katlanarak yayılma yeteneğine sahiptir. Hücre zarında gerçekleşebilen bu tür tepkimelere “lipid peroksidasyonu” denir. Bir noktada başlatılan tepkime, ortamda uygun bileşikler varsa yayılmaya devam eder. Radikalik tepkimeler ancak;

1. Oluşan radikallerin antioksidanlar ile indirgenmesi
2. Radikallerin birbirleri ile tepkimeleri
3. Ortamda tepkimeye girecek bileşik kalmaması

durumunda sona erer.

Buna göre hücresel koşullarda, oluşan radikalın çok erken safhada indirgenmesi, biyomoleküllerin korunması bakımından hayati öneme sahiptir (53).

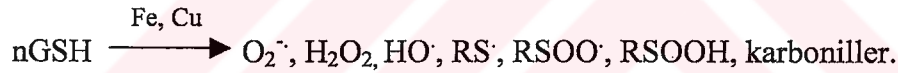
Her tür biyolojik molekül OH[•] için bir hedefi ise de, özellikle elektronca zengin bileşikler seçilen tercihli hedeflerdir. Nükleik asitler, proteinler ve lipidlerde başlatılan radikalik tepkimelerde binlerce farklı ara ürünler oluşabilir. DNA ile tepkimesi sonucu baz modifikasyonları, baz delesyonları, zincir kırılmaları gerçekleşebilir; ileri derecedeki DNA hasarları tamir edilemediğinden hücre ölümüne neden olur.

Proteinler üzerinde oluşan oksidasyonlar, yapı değişimine neden olacağından, proteolitik yıkıma gider.

Hücre zarı, su içermediğinden OH[•] in başlıca hedefi yağ asitleridir. Hidroksil radikallerinin rol oynadığı biyolojik hasarlar içerisinde en iyi tanımlanmış olanı lipid peroksidasyonudur. Hidroksil radikalleri, membran fosfolipidlerinin doymamış yağ asit yan zincirlerine hücum eder. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp yine hücre ölümüne neden olabilir.

Bütün bu etkiler ne kadar OH[•] üretildiğine bağlıdır. Gerek H₂O₂ ten gerekse organik peroksitlerden (ROOH) OH[•] yapımı ortamdaki serbest metal iyonları tarafından katalizlenir.

Metal iyonları varlığında GSH ve askorbik asit gibi önemli antioksidanlar da prooksidan gibi davranmaya başlarlar:



Özellikle, OH[•] yapımını katalizlemelerindeki etkileri nedeniyle canlılarda metal iyonları radikal hasarlarından birinci derecede sorumludurlar ve bu etkiye sahip olamadıkları formda (esas olarak proteine bağlı) tutulmalıdırlar (53).

Nitrik oksit (NO)

Nitrik oksit, yüksek yapılı canlılarda, amaçlı olarak ve çok önemli biyolojik fonksiyonları yerine getirmek üzere üretilen nitrojen merkezli bir radikaldir.

Paylaşılmamış elektron aslında nitrojen atomuna ait ise de, bu elektronun hem nitrojen hem de oksijen atomu üzerinde lokalize olması nedeniyle tam radikal özelliği taşımaz. Bunun sonucu olarak da bilinen diğer radikallere göre reaktivitesi baskılandığından oldukça uzun ömürlüdür.

Oksijen radikallerinin aksine, vücudumuzda NO sentezini sağlayan mekanizmalar oldukça kısıtlıdır. Vücuda giren nitro bileşiklerinin metabolize edilmesi bir tarafa bırakılırsa, endojen NO oluşturan tek kaynak nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleridir. Bu enzimin nöronal (nNOS), endotelial (eNOS) ve indüklenabilir (iNOS) olmak üzere üç formu vardır; nNOS ve eNOS izoformları konstitütif enzimlerdir. nNOS ve eNOS enzimleri tarafından üretilen çok düşük derişimdeki NO, sinir sistemi ve düz kaslarda hücre içi ve hücreler arası haberci molekül olarak kullanılır. iNOS formu ise, başta fagositik lökositler olmak üzere çeşitli hücrelerde bulunur ve sentezi sitokinler ile bakteriyel toksinler tarafından indüklenir.

Radikal olarak reaktivitesi düşük olan NO, metal içeren yapılar ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girer. Özellikle lipid radikallerle (hücre zarı) tepkimeye girmesi NO' e antioksidan bir etki kazandırır.

Süperoksit ile NO arasındaki tepkime ile oluşan peroksinitrit (ONOO⁻), hidroksil radikali benzeri aktiviteye sahip olup, radikalik tepkimeleri başlatmaya ilave olarak biyomoleküllerin nitrasyonuna neden olur.

Fizyolojik (düşük) derişimde üretilen NO, esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata (NO₃⁻) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır.

Oksijen radikallerindeki durumun aksine, nitrik oksiti ortamdaki temizleyen bir özel enzim yoktur. Aerobik ortamda NO stabil değildir; derişiminin artması ile oksidasyonu da hızlanır, ortamdaki derişimi ile kendi ömrü arasında ters bir orantı vardır. Özellikle iNOS enziminin indüksiyonu sırasında NO derişiminin artması ile oksidasyonu da hızlanır ve çeşitli reaktif nitrojen oksit türleri oluşur. Bu reaktif türler NO' in dolaylı etkilerinden sorumlu olup; hücrel moleküllerin nitrozilasyonuna, nitrasyonuna, nitrozasyonuna neden olarak proteinlerin/enzimlerin inaktivasyonuna neden olabilirler (53).

OKSİDATİF STRES KAVRAMI

Oksijen radikallerinin fazla yapımının neden olduğu etkilerin toplamı “oksidatif stres” (ya da sinonimi olarak oksidan stres) olarak adlandırılır. Oksidatif stres terimi 1950' lerden beri kullanılmaktadır. Bu terim, (1) oksijenin metabolize edildiği canlılarda üretilen serbest radikaller ile antioksidan defans mekanizmaları arasındaki doğal dengeyi; (2) bu dengenin serbest radikaller yönünde bozulması halinde hasar ya da ölümle sonuçlanan olaylar dizisini ve (3) bu sonuçların hücrel düzeyde nonspesifik ya da

rastgele gerçekleştiğini ifade eder (95). Başka bir deyişle, oksidanların yapım ve değredasyonu arasındaki dengesizlik şeklinde de ifade edilebilir (96).

Serbest radikallerin oluşum hızı ile etkisizleştirilme hızı dengede olduğu sũrece, organizma bu bileşiklerden etkilenmez. Buna karşılık, savunma azalır veya bu zararlı bileşiklerin oluşum hızı sistemin savunma gũcũnũ aşarsa, denge bozulur ve serbest radikallere bağlı zararlı etkiler ortaya çıkar (3). Oksidan etki sonucu oluşan hasarın bũyũklũđũ, hasar oluşma hızı ile oksidatif harabiyeti engelleyen, sınırlayan ya da kısmen tamir eden koruyucu mekanizmalar arasındaki dengeye bağlıdır.

Serbest radikaller hũcre ve dokularda birçok zarara yol açmaktadır. Bu zararlar řũyle sıralanabilir: (Tablo 10)

Tablo 7: Serbest radikallerin hũcresel hedefleri	
HEDEF	SONUÇ
Aminoasitler	Protein denatũrasyonu ve çapraz bağların oluşumu, enzim inhibisyonu ve hũcre membran geçirgenliğinde değişiklik
Nũkleik asid bazları	Hũcre dũngũsũnde mutasyon
Karbonhidratlar	Hũcre membran reseptũr duyarlılığında değişiklik
Kofaktũrler	Nikotinamid ve flavin içeren kofaktũrlerin miktarında ve aktivitesinde azalma
Nũrotransmitterler	Seratonin ve epinefrin gibi nũrotransmitterlerin miktarında ve aktivitesinde azalma
Antioksidanlar	E vitamini ve ̢ karoten ile katalaz ve SOD enzimlerinin inhibisyonu, glutatyon peroksidaz aktivitesinde değişiklik
Proteinler	Peptid zincirinde kopma, denatũrasyon
DNA	Zincir kopması, baz değişiklikleri
Hyaluronik asit	Sinovyal sıvı viskozitesinde değişiklik

REAKTİF OKSİJEN TÜREVLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ ve HASAR MEKANİZMALARI

Ekstrasellüler boşluk: Çok hücreli organizmalarda serbest oksijen radikallerinin neden olduğu etkiler yalnızca hücre içi organellerde değil, ekstrasellüler makromoleküller üzerinde de gözlenir. Oksijen radikallerinin bu etkisi, esas olarak sinovyal sıvı ve kartilaj dokusunda önem taşır.

Bu etki, kartilaj dokusundaki proteoglikanların yıkımı, kollojenin destrüksiyonu ve kondritin sülfat gibi glikozaminoglikanların yapısında bozulma şeklinde ortaya çıkabilir (97).

Sinovyal sıvıdaki etkiler de benzer karakterde oluşur.

Osteoartritte, kondrositlerdeki ozmolarite değişiklikleri, hücre membranına bağlı matriksteki zorlanma veya elektrik yükünün değişmesi sonucu doku cevabını uyaran mediatörler salınır ve reaktif oksijen türevlerinin üretimi artarak kıkırdak matriksine zarar vermeye başlar. Oksidatif stres sonucu kondrositlerce üretilen türevler, hücre zarındaki lipidleri peroksidederek membran hasarına ve bu hasarın göstergesi olan malondialdehit düzeylerinde artışa neden olur (98-107).

Proteinlerin Oksidasyonu: Proteinler hidroksil radikallerine ve hidroksil -süperoksit radikali kombinasyonuna maruz bırakıldığında yapısal değişikliklere uğrar. Sonuç olarak spontan fragmentasyonlar ve proteolitik artış ortaya çıkmaktadır (108).

Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme dereceleri, içerdikleri amino asit çeşidine bağlıdır.

Hidroksil radikalleri, aminoasit modifikasyonunun başlıca sorumlularıdır (109, 110). Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest oksijen ile reaksiyona girme eğilimi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, methionin ve sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana gelir. Proteinlerin üç boyutlu yapısı bozulur (111).

Sitoplazmada bulunan proteinlerin çoğu ve oksihemoglobin, katalaz gibi hemoproteinler serbest radikallere karşı özellikle duyarlıdır.

Radikaller membran glikoproteinlerinde çapraz bağ oluşumu ve kopmalara neden olmaktadır. Bu etkileri, tıpkı lipid peroksidasyonunda olduğu gibi, permeabilitenin bozulmasıyla sonuçlanmaktadır.

Karbonhidratlar üzerine etkileri: Monosakkaritlerin oksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelir (112). Gözün vitreus humour' unda bulunan hiyalüronik asidin oksidatif hasarı sonucu katarakt oluşumu da radikallerin karbonhidratlar üzerindeki etkisine bir örnektir (113).

Mitokondri: Mitokondri ve mikrozomların lipid peroksidasyonuna karşı duyarlı olmalarının nedeni fosfolipidlerinde yüksek oranda doymamış yağ asitleri bulunmasıdır (114).

Aslında mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi oksijeni suya indirgeyerek detoksifiye etmektedir. Elektron transport zincirinde yer alan NAD, FAD, Koenzim Q gibi bileşiklerin oksijenle olan tepkimeleri sonrasında açığa çıkan süperoksit radikalleri antioksidan savunma sistemlerince yok edilebilmekle birlikte, savunma sistemlerinin yetersiz kalması ya da oksidatif stresin artışı halinde mitokondriyal hasar kaçınılmaz olmaktadır. Mitokondriyal hasarın bilinen sonucu hücresel ATP sentezinin blokajıdır.

Nukleus ve DNA yapısındaki değişiklikler: Serbest radikaller, hücre çekirdeğinde başlıca DNA ile tepkimeye girerek yapısal hasarlara ve mutajenik etkiye neden olurlar (115, 116, 117).

Oksijen radikallerinin DNA baz dizilerinde değişmelere, kopmalara (118) ve sister kromatid değişmelerinde artışa (119) neden oldukları gösterilmiştir. Oksidatif DNA hasarı, zincir kırıkları, abazik DNA alanları, alkali-labil bölgeler ve oksidize bazları içerebilir. (120, 121) DNA üzerindeki bu etkilerin en önemli sorumlusu hidroksil radikalleridir. Hidroksil radikalleri, hem baz dizilerinde hem de riboz-fosfat bağlarında kopmalara neden olarak DNA hasarına yol açarlar (116).

DNA hasarı bakterilerde deneysel olarak gösterilmiştir. Aslında hiperbarik oksijen tedavisinin antibakteriyel etkisinin mekanizmalarından biri de artmış serbest oksijen radikal düzeyinin neden olduğu bakteriyel DNA hasarıdır. İn vitro ve in vivo ortamda üretilen süperoksit anyonunun bakteriyel mutasyonla ilişkili olduğu saptanmıştır (122, 123, 124, 125).

Hücre zarına etkileri: Hücre zarı, ekstrasellüler ortamda bulunan oksijen radikallerinin temel hedefi olduğu için büyük önem taşır. Biyolojik membranlar oksidanlara karşı reaksiyon gösterirler; çünkü fosfolipidler oksidatif reaksiyonlara karşı hassas olan esterleşmiş doymamış yağ asitlerini büyük oranda içerirler (97, 126).

Zarda bulunan fosfolipidlerin serbest yağ asit bölümlerinin radikal etkisiyle peroksitlenmesi sonucu zarın bütünlüğü bozulur ve geçirgenliği artar (97, 126).

Lipid peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan ve zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olay olarak tanımlanmaktadır (3, 62, 127).

Bu kimyasal olay, organizmada oluşan, süperoksit anyonu ve hidroksil radikali olduğu kabul edilen kuvvetli oksitleyici bir radikalın zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asidi zincirindeki alfa-metilen gruplarından hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Bununla birlikte, lipid peroksidasyonunun uyarılmasında asıl etkili radikalın hidroksil radikali olduğu benimsenmektedir.

Serbest radikal etkisi ile yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun uzaklaştırılması, bu yağ asidi zincirinin radikal niteliği kazanmasına neden olmaktadır. Böylece oluşan lipid radikali (L) dayanıksız bir bileşik olup, bir dizi değişikliğe uğramaktadır.

Öncelikle molekül içi çift bağ aktarılması (rezonans) ile dien konjugatları oluşmaktadır. Daha sonra, lipid radikalın moleküler oksijen ile reaksiyonlaşması ile lipid peroksit radikali (LOO[•]) meydana gelmektedir. Bu lipid peroksit radikalleri de zar yapısındaki çok doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumunu sağlamakta, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak, lipid hidroperoksitlerine (LOOH) dönüşmektedir. Böylece reaksiyonun oto-katalitik bir biçimde yürümesi sağlanmaktadır.

Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesi ile sona ermektedir. Bu bileşiklerden biri olan malondialdehit (MDA) miktarı, tiyobarbitürik asit testi ile ölçülmekte ve bu yöntem lipid peroksit düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra, peroksidasyon sırasında oluşan dien konjugatlarının ölçümü de, in vivo lipid peroksitlerinin düzeyini yansıtmaları açısından giderek önem kazanmaktadır. Lipid hidroperoksitlerinin parçalanması ile oluşan etan, bütan ve pentan gibi gazların tayini de, son yıllarda lipid peroksidasyon göstergesi olarak değerlendirilmektedir (3, 62, 127).

Lipid peroksidasyonunun; zar lipid yapısındaki değişiklikler nedeni ile zar işlevinin bozulması, oluşan serbest radikallerin enzimler ve diğer hücre bileşenleri üzerine etkisi, son ürünler olan aldehitlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden olduğu düşünülmektedir. Her üç olayın da eşit derecede etkili olduğu veya birlikte ya da birbirlerinin ardınca etkili oldukları ileri sürülmektedir. Bununla birlikte, aldehit yapılı bileşiklerin uzun yaşam süreli ve zarları geçebilme özelliğinde olması, lipid

peroksidasyonunun hedef organlardaki etkilerinden bu bileşiklerin sorumlu olduğunu düşündürmektedir (62).

Serbest radikallerin ve lipid peroksitlerinin çeşitli hastalıkların oluşumunda rol oynadığı kabul edilmektedir. Bu hastalıklar aşağıda, Tablo 8’ de özetlenmiştir (2, 59, 62).

Tablo 8: Patogenezinde lipid peroksidasyonunun etkili olduğu durumlar (2, 59, 62)

1. Yaşlanma
2. Ateroskleroz
3. Kanser
4. Radyasyon hasarı
5. İskemi- reperfüzyon hasarı
6. İnflamasyon
7. Romatoid artrit ve diğer otoimmün hastalıklar
8. Diabetes mellitus
9. Akciğer hastalıkları (Sigara, amfizem, oksijen toksisitesi, asbestoz, bronkopulmoner displazi)
10. Beyin hastalıkları (Hiperbarik oksijen tedavisi seyrinde gelişen MSS toksisitesi, alüminyum toksisitesi, nörotoksinler, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı)
11. Böbrek bozuklukları (Otoimmün nefroz, aminoglikozid nefrotoksisitesi, ağır metal nefrotoksisitesi)
12. Kardiyak miyopati (Keshan hastalığı)
13. Kas hastalıkları (Kas distrofisi, multipl skleroz, egzersiz)
14. Göz bozuklukları (Maküler dejenerasyon, katarakt)
15. Dermatolojik bozukluklar (Solar radyasyon, yanıklar, kontakt dermatit)
16. Karaciğer bozuklukları (Endotoksin, alkol, halojenli hidrokarbonlar asetaminofen, demir)
17. Hematolojik hastalıklar (Fenilhidrazin, primaquin, sülfonamid gibi kimyasal bileşikler, protoporfirin fotooksidasyonu, malarya, orak hücre anemisi, favizm)
18. Gastrointestinal bozukluklar (Ülseratif kolit, steroid olmayan anti-inflamatuar droglara bağlı hasar)
19. Beslenme yetersizlikleri (Kwashior, vitamin E eksikliği)

Görüldüğü gibi patogenezinde oksidatif stresin sorumlu tutulduğu hastalıklar geniş bir listeyi oluşturmaktadır; ancak bunların oksidatif stres nedeniyle mi ortaya çıktığı yoksa oksidatif stresin bu hastalıklarda mı oluştuğu konusu, yanıtı hiç de kolay verilemeyecek bir sorudur (128).

III- ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Antioksidan kavramı, çeşitli şekillerde tanımlanabilir. Kısaca, reaktif oksijen türevlerinin inhibitörleri denilebileceği gibi, okside edilebilir substratlarla kıyaslandığında çok düşük konsantrasyonlarda olduklarında bile substratın oksidasyonunu önleyen ya da geciktirebilen maddeler olarak da tanımlanabilirler.

Hücrede okside edilebilir substratlar proteinler, lipidler ve DNA'dır. Antioksidanlar oluşan O_2^- , H_2O_2 , $HOCl$, $OH^\cdot$ gibi radikalleri biyolojik temizleyici olarak işlev görürler veya oluşan doku hasarını onarmaya çalışırlar.

Organizmada antioksidan etki gösteren sistemleri yapılarına göre enzimatik ve nonenzimatik olarak sınıflamak mümkündür. İşlevlerine göre ise, oluşum yolunu inhibe edenler ve oluşan radikalleri temizleyen elektron tutucular ya da proton verici olarak sınıflamak olasıdır. (Tablo 9)

Tablo 9 : Antioksidanların sınıflaması

<i>ENZİMATİK</i>	<i>ANTİOKSİDANLAR</i>		
<i>Adı</i>	<i>Yapısı</i>	<i>Yeri</i>	<i>İşlevi</i>
Süperoksit dismutaz	CuZn-SOD	Sitozolda ve nukleusta	O_2^- in H_2O_2 e dönüşümü
	Mn-SOD	Mitokondride	
	Cu-SOD	Plazmada	
Katalaz	Tetramerik hemoprotein	Peroksizomlarda	H_2O_2 in dönüşümü
Glutasyon peroksidaz	Selenoprotein	Sitozol ve mitokondri	H_2O_2 in dönüşümü
Glutasyon redüktaz	Dimerik protein	Sitozol ve mitokondri	H_2O_2 in dönüşümü

NON-ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR

Anti-inflamatuarlar

Siklooksijenaz ve lipooksijenaz yolunu baskılar, Lökosit kaynaklı radikal oluşumunu engeller

Metal bağlayıcılar

Seruloplazmin

Demir ve bakır iyonlarını bağlayarak hidroksil radikali oluşumunu engeller

Transferrin

Ferritin

Deferoksamin

Ksantin oksidaz inhibitörleri

Allopurinol

Ksantin oksidazı baskılar

Oksipurinol

Tungsten

Hücre içi kalsiyum artışını önleyen ajanlar

Kalsiyum kanal blokerleri

Kalsiyumla aktive olan oksidazları baskılar

Hücre içine Na girişini baskılayan ajanlar

MİKROMOLEKÜLLER

E vitamini

Yağda eriyen vitamin

Lipid membranlar ve ekstrasellüler sıvıda lipid peroksillerini inaktive eder

β - Karoten

A vitamini öncülü

Membranlarda lipid peroksidasyonunu engeller

C vitamini

Suda eriyen vitamin

O_2^- ve H_2O_2 temizleyicisi, E vitamini yenileyicisi

Ürik asit

XO ürünü

O_2^- ve $\cdot OH$ temizleyicisi, C vitamini inoksidasyonunu engeller

GSH

Tripeptid

Hücre içi ve alveollerde bulunur, O_2^- ve $\cdot OH$ temizleyicisi

Ubikinon

Polifenol

Mitokondri iç membranı, LDL, plazma membranı, bütün hücre içi membranlarda E vitamininin rejenerasyonu

N-asetil sistein

Aminoasit

Organizmada sisteine deasetilize olup GSH yapımında kullanılır

Flavonoidler

Bitki kökenli polifenoller

Bakır bağlayarak, H^+ donörü olarak ve E vitamininin rejenerasyonunda

Metabolizmayı yavaşlatan

ajanlar (Melatonin)

Polipeptid hormon

Metal iyonlarla katalizlenen oksidasyon reaksiyonlarında etkili, terapötik dozda etkinliği tartışmalı

Antioksidanlar etkilerini başlıca iki şekilde gösterirler:

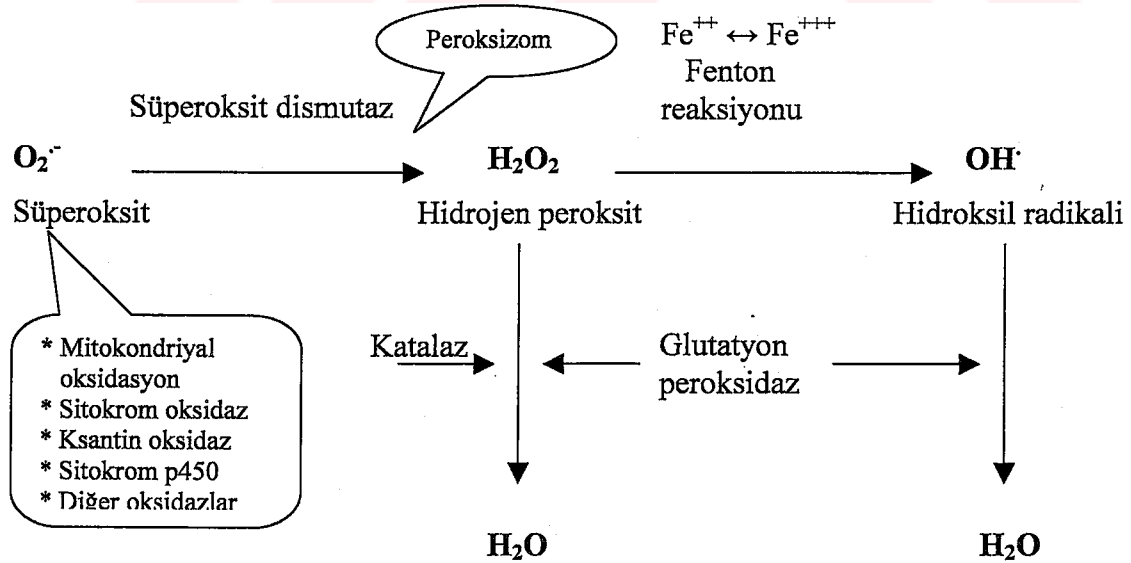
1. Serbest radikal oluşumunun engellenmesi

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

2. Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi

- Toplayıcı (scavenging) etki: Reaktif oksijen türevlerini etkileyerek onların tutulması veya daha az reaktif başka bir moleküle çevrilmesi (enzimler)
- Bastırıcı etki: Reaktif oksijen türevleri ile etkileşip proton eklenmesi yoluyla aktivite kaybının sağlanması (flavonoidler, vitaminler)
- Onarıcı etki
- Zincir kırıcı etki: Reaktif oksijen türevlerini ve zincirleme reaksiyonları başlatan diğer maddeleri kendine bağlayıp zincirlerini kırarak fonksiyonlarının engellenmesi (haptoglobin, seruloplazmin, mineraller)

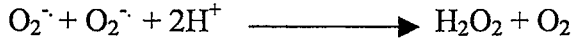
Temel antioksidan savunma enzimleri süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz'dır (129). Enzimatik savunma sistemi ilk basamağında süperoksit dismutazın yer aldığı bir dizi reaksiyonla hücreleri oksidatif strese karşı korur. Şekil 4' te bu reaksiyonlar özetlenmeye çalışılmıştır.



Şekil 4: Oksidatif strese karşı enzimatik savunma mekanizmaları

SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD)

1968'de Fridovich tarafından keşfedilen bu metalloenzim, oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunur ve süperoksitin hidrojen peroksite dismutasyonunu katalizler:



SOD' un organizmada üç izoenzimi vardır:

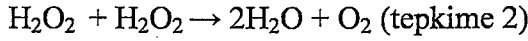
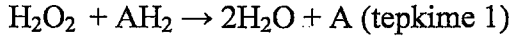
1. CuZn-SOD (Sitozolik enzim): Molekül ağırlığı 32 kDa olup, dimerik yapıdadır. Birbirine benzer iki alt birimden kurulmuştur. Bunların herbiri bir ekivalan Cu^{2+} ve Zn^{2+} içerir. Sitozolik SOD, siyanürle inhibe olur (78). İnsan CuZn-SOD lokusu kromozom 21q22'de gösterilmiştir (130, 131). Memelilerde, CuZn-SOD'un en yüksek konsantrasyonlarda karaciğer, böbrek, eritrositler ve santral sinir sisteminde bulunduğu tespit edilmiştir.
2. Mn-SOD (Mitokondriyal enzim): Tetramerik yapıdadır. Mitokondriyal SOD, bakterilerde bulunan enzime benzer şekilde Mn^{2+} içerir. Mitokondriyal SOD, siyanürle inhibe olmaz (78). MnSOD geni kromozom 6q25' te gösterilmiştir (132, 133).
3. ECSOD (Ekstrasellüler SOD): Sitozolda sentezlenen ve ardından ekstrasellüler alana taşınan enzimdir. Ekstrasellüler SOD' la ilgili çalışmalar esas olarak ateroskleroz ve akciğer hasarlanması modellerinde gerçekleştirilmiştir. Enzimin genetik lokalizasyonu kromozom 4q21' de belirlenmiştir (134, 135, 136).

SOD' un fizyolojik görevi, hücreleri süperoksit radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. SOD, glutatyon peroksidaz ve katalaz aktivitesindeki azalmanın diyabet gibi bazı hastalıkların patogeneğinde rol aldığı düşünülmektedir.

KATALAZ

Katalaz, 4 hem (protoporfirin IX-Fe) grubu içeren bir hemoproteindir. Peroksidaz etkinliğine sahip olmasına ek olarak bir molekül hidrojen peroksiti substrat elektron verici ve bir diğer hidrojen peroksit molekülünü oksidan veya elektron alıcı olarak kullanabilir (78).

H_2O_2 oluşum hızının düşük olduğu durumlarda peroksidatif tepkimeyle (tepkime 1), H_2O_2 oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkime (tepkime 2) yaparak hidrojen peroksiti suya dönüştürüp ortamdan uzaklaştırır.



Katalaz, kan, kemik iliği, müköz membranlar, böbrek ve karaciğerde bulunur. İn vivo koşulların çoğunda katalazın peroksidaz etkinliği ön plandadır.

Mikrozomlar ve peroksizomlar karaciğer dahil birçok dokuda bulunur. Bunlar, oksidazlar ve katalazdan yana zengindir. Bu durum hidrojen peroksit üreten enzimlerin onu yıkan enzimle bir grup oluşturmasının biyolojik bir yarar sağlayacağını düşündürür (78).

GLUTATYON PEROKSİDAZ (GSH Px)

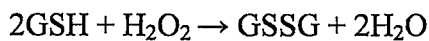
Başlangıçta bitki enzimleri olarak kabul edilmelerine karşın peroksidazlar süt, lökosit, trombosit ve eikozanoid metabolizmasına karışan diğer dokularda bulunmuştur (106).

Memeli eritrositlerinde glutatyon peroksidaz varlığı ilk kez 1957’ de Mills tarafından gösterilmiştir. Bu enzimin redükte glutatyonun oksidasyonu ile hidrojen peroksitin in vitro detoksifikasyonuna yüksek özgülük gösterdiği izlenmiştir (137). Enzim, 3q11.13.1 kromozomal lokusunda haritalanmıştır (138). Glutatyon peroksidaz, organik hidroperoksitlerin ve H_2O_2 in redüksiyonunu sağlayarak membran lipidleri ve hemoglobini oksidatif hasara karşı korur.

Glutatyon peroksidazın insanda dört tipi izole edilmiştir (138):

1. Klasik glutatyon peroksidaz (GPx-1)
2. Plazma glutatyon peroksidazı (PGPx)
3. Fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz
4. Gastrointestinal glutatyon peroksidaz

Bu enzimlerin tümü, aktif bölgelerinde selenosistein şeklinde (SeCys) selenyum atomu içerir. Glutatyon peroksidaz, SOD gibi hem sitozol hem de mitokondride bulunduğu için H_2O_2 çıkarılmasında önem taşır. Enzim, hidrojen peroksiti glutatyonu GSSG’ ye (okside glutatyon) çevirerek yok eder. GSH Px’ in iki substratı vardır. Substratlardan biri olan peroksitler alkole indirgenirken, diğer substrat olan glutatyon ise yükseltgenir. Oluşan yükseltgenmiş glutatyon (GSSG), glutatyon redüktaz enziminin katalizlediği bir başka reaksiyon ile tekrar indirgenmiş glutatyonla dönüşür.



Eritrositlerdeki pentoz fosfat yolu, okside olmuş glutatyonun FAD içeren bir flavoprotein enzimi olan glutatyon redüktaz ile kataliz edilerek indirgenmiş glutatyonla çevrimi için gereken NADPH’ ı sağlar. Glutatyon peroksidaz aktivasyonu ile eritrositlerden

H₂O₂ in uzaklaştırılması, biriken hidrojen peroksitin hemoglobinin methemoglobine oksidasyon hızını artırarak eritrosit yaşam süresini kısaltabilmesi nedeniyle organizma için önemli bir tepkimedir (139).

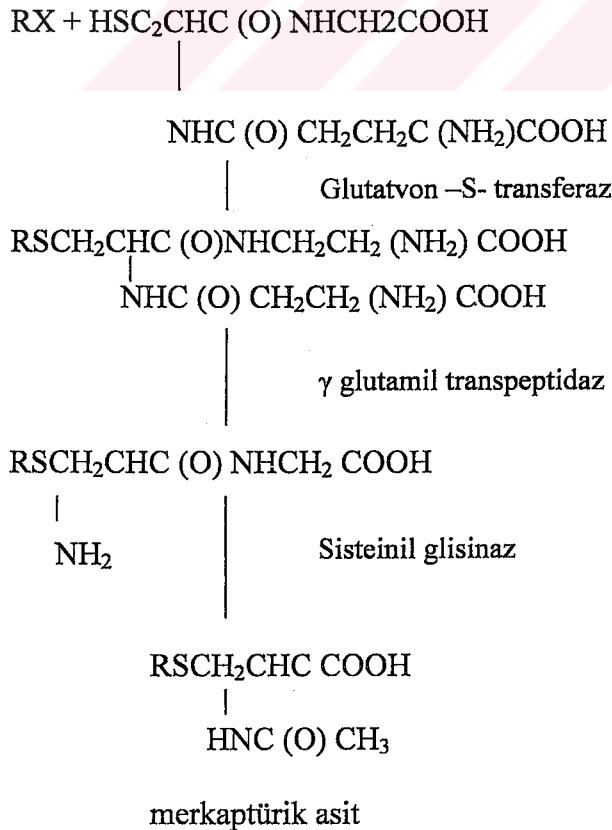
Yapısı ve fonksiyonları çok yakın zamanda aydınlatılabilmiş olan Fosfolipid-Hidroperoksit Glutasyon Peroksidaz, monomerik yapılıdır, membran yapısındaki fosfolipid hidroperoksitlerini, alkollere indirgeyerek özellikle E vitamininin yetersiz olduğu durumlarda peroksidasyona karşı korunma sağlar (140, 141).

GSH Px, peroksit radikallerine katalazdan daha yüksek affinite gösterir. GSH varlığında lipid peroksidasyonunun inhibisyonu sülfhidril substrat olarak GSH' ya hayli spesifik olan GSH Px tarafından gerçekleştirilir.



GLUTATYON-S-TRANSFERAZLAR

Aktivitesi selenyuma bağımlı olmayan glutasyon peroksidaz enzimleri Glutasyon-S-Transferazlardır. Bu enzim ailesi, biyotransformasyon yoluyla oluşan çeşitli elektrofil bileşiklerle glutasyon arasındaki konjugasyonu sağlarlar. Glutasyonla bağlanan bu bileşikler bir dizi reaksiyonla merkaptürik aside dönüşürler.



Glutasyon transferazlar başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid hidroperoksitlere (ROOH) karşı selenyum bağımsız-glutasyon peroksidaz aktivitesi gösterirler (143).

$$\text{ROOH} + \text{GSH} \longrightarrow \text{GSSG} + \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$$

GLUTATYON REDÜKTÁZ (GSH-Red)

Antioksidan savunmanın devamlılığı için oksitlenmiş glutatyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş şekle dönüşmesi gerekir. Glutatyon redüktaz, NADPH varlığında GSSG' nin indirgenme reaksiyonunu katalizleyerek bu devamlılıkta rol oynar (144). GSH-Red, NADPH varlığında GSSG' nin indirgenme reaksiyonunu katalizler.



51

NON ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR

TOKOFEROL (E VİTAMİNİ)

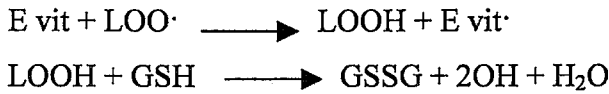
α , β , γ , δ tokoferol grubu içinde α -tokoferol en geniş doğal dağılımı gösterir ve en büyük biyolojik etkinliğe sahiptir. α -tokoferol, E vitamini sinonimi olarak kullanılır.

α -tokoferol, lipidlerde eriyebilir özelliğe sahiptir ve kanda lipoproteinler tarafından taşınır. Bu nedenle kronik steatore, abetalipoproteinemi, kolestatik karaciğer hastalıkları, kistik fibroz ve barsak rezeksiyonu geçirmiş olgularda vitamin E eksikliği bulunabilir (146).

E vitamini en önemli doğal antioksidandır. Görüldüğü kadarıyla sellüler ve subsellüler membran fosfolipdlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna karşı ilk savunma hattı olarak fonksiyon görür.

E vitamininin antioksidan etkinliği, yüksek oksijen derişimlerinde etkilidir. Bu nedenle eritrosit membranı, respiratuar sistem membranları ve retina gibi yüksek oksijen parsiyel basınçlarına maruz kalan lipid çatılarda yoğunlaşma eğilimi göstermesi şaşırtıcı değildir (146).

Lipid peroksidasyonu sırasında oluşan peroksi ve alkoksil ardikaller komşu yağ asidi zinciri yerine α -tokoferolün hidrofobik yapısına bağlı $-OH$ gruplara bağlanırlar. Lipid peroksit radikali bir hidrojen alır ve α -tokoferol yeni bir radikale dönüştür, ancak zayıf reaktif özelliği itibariyle yağ asit yan zincirleriyle etkileşemez.



Tokoferol radikali membran yüzeyine göçer ve askorbik asit (vitamin C) ile reaksiyona girerek tekrar α -tokoferole dönüşür. Glutatyon gibi tiol bileşikleri, oluşan tokoferol radikallerini α -tokoferol haline çevirmede rol alırlar (147, 148).



E vitamininin radikal biçiminin temizlenmesinde koenzim Q 10 (ubikinon) da rol oynar (149).

VİTAMİN C (ASKORBİK ASİT)

Vitamin C bir ketolaktondur. Etkin C vitamin, indirgeyici ekivalanların bir vericisi olan askorbik asitin bizzat kendisidir.

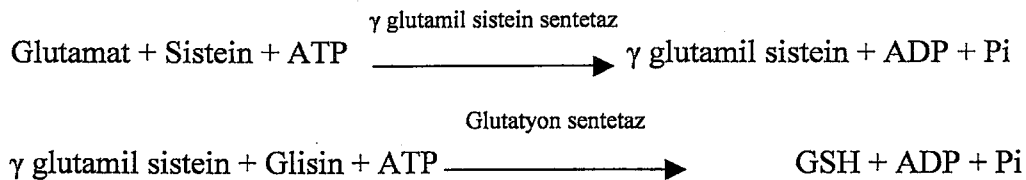
Askorbik asit moleküler oksijen, nitrat ve sitokrom a ve c gibi bileşiklerin indirgenmesine olanak sağlayan +0.08 V' luk bir hidrojen potansiyeline sahip indirgeyici bir ajandır. Tokoferoksil radikallerinin tokoferole redüklenmesi dışında serbest radikallerle reaksiyona girerek onları temizler, antiproteazların oksidan maddelerle inaktive olmasını engeller.

Etkinliklerinin birçoğunda mekanizma aydınlatılamamış isede, askorbik asitin mutlak varlığını gerektiren bazı etkiler aşağıda sunulmaktadır. Bu olayların çoğuna kendisi doğrudan katılmaz, ancak monooksijenazlardaki Cu^+ ve diğer oksijenazlardaki Fe^{++} gibi metal kofaktörleri indirgenmiş halde tutmak için gerekir.

1. Kollojen sentezinde prolinin hidroksilasyonu için gereklidir.
2. Tirozin yıkımında Cu^+ ve Fe^{++} in indirgenmiş halde tutulmasını sağlar.
3. Tirozinden adrenalin sentezindeki dopamin β -hidroksilaz basamağında gereklidir.
4. Safra asidi oluşumunda başlangıçtaki 7 α -hidroksilaz basamağında rol alır.
5. Adrenal kortekste steroidogenezin indirgeyici sentezlerinde görev alır.
6. Demir emilimi vitamin C varlığında belirgin şekilde artar. Suda çözünen bir antioksidan gibi davranarak sindirim sırasında nitrozaminlerin oluşumunu inhibe edebilir (150).

GLUTATYON (GSH)

Birçok türün hemen hemen tüm hücrelerinde bulunan glutatyon, önemli rol oynayan bir tripeptittir. GSH, glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerden oluşur. GSH sentezi ATP kullanılan iki basamaklı bir reaksiyonla gerçekleşir.



Molekülün aktif kısmı sisteinin sülfhidril grubudur. γ glutamil kısmı hücre içi stabilizeyi ve peptidazlara direnci sağlar. Canlı hücrelerde 0.5-8 mM konsantrasyonda bulunur (151). Glutatyon, suda çözünen önemli bir antioksidan ve indirgeyici ajandır.

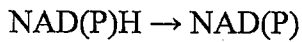
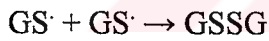
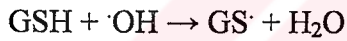
Glutatyonun önemli işlevleri:

1. Hücre zarından amino asitlerin hücre içine taşınması
2. Enzim yapısında koenzim aktivitesi

3. Proteinlerdeki sülfhidril gruplarının korunması
4. Peroksit, serbest radikaller ve reaktif toksik ara maddelerin intoksikasyonu (58, 151, 152)

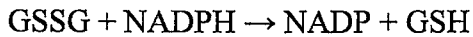
Glutasyon peroksidaz, Glutasyon redüktaz ve Glutasyon transferazın substratı veya ko-substratıdır. Glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz, ksenobiyotiklerin, karsinojenlerin, serbest radikallerin ve lipid peroksitleri gibi endojen ve eksojen bileşiklerin detoksifikasyonunda önemli rol oynayan anahtar antioksidanlardır (145, 152, 153). Bununla birlikte glutasyonun oksidatif hasarı önleme kapasitesi; serbest radikallerle direkt reaksiyona girme, disülfidleri direkt olarak indirgeme ve Glutasyon peroksidaza kofaktör olarak fonksiyon görme yeteneğine bağlıdır (144, 153). Glutasyon varlığında lipid peroksidasyonunun inhibisyonu, sülfhidril substrat olarak glutatyonla hayli spesifik olan glutasyon peroksidaz ile gerçekleşir (144).

GSH' nın peroksitler ve disülfidlerle reaksiyonu sonucu GSSG (okside glutasyon) oluşur. GSSG konsantrasyonundaki artış, oksidan baskının bir göstergesidir. GSSG, tiol içeren proteinlerin konformasyon ve aktivitesi üzerine zararlı etkileri olan bir maddedir. Hidrojen peroksit miktarındaki yükselmeler, glutasyon peroksidazın aktivitesinin artmasına neden olur. Buna bağlı olarak, başlıca redoks-aktif kofaktörler indirgenmiş şekilden okside (yükseltgenmiş) forma dönüşür.



Okside glutasyon düzeylerindeki artışa paralel olarak okside olmuş proteinlere bağlı tiollerde de glutasyonla birleşik disülfid formları oluşur. Tüm bu değişikliklere sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunun artışının da eklenmesi, oksidatif stres ve hücre buna bağlı hücre hasarlanmasını getirir (154).

GSSG' nin tekrar indirgenmesi, NADPH' nin de kullanıldığı bir reaksiyonla gerçekleşir. Bu şekilde dokularda GSH/GSSG oranı yüksek tutulur. (>100:1)



MELATONİN

Melatonini, epifiz bezinin başlıca ürünüdür. Sirkadien ritmin düzenlenmesiyle ilişkilidir, gündüz daha az, gece daha fazla miktarlarda salgılanır, yani nokturnal bir ritim gösterir. Kanda, büyük oranda albuminle (%70) taşınır, metabolizasyonunun %90' ı

karaciğerde hidroksilasyon, sülfatlama, glukuronidleme yoluyla, geri kalanı ise beyinde olur. Sonuçta tüm melatonin metabolitleri üriner yolla atılır (155).

Melatoninin antioksidan etkinliği özellikle son on yılda çok sayıda gözlem ve araştırma ile ortaya konulmuştur. Bu çalışmalarda melatoninin serbest radikal süpürücü ve antioksidan özellikleri *in vivo* ve *in vitro* olarak gösterilmiştir (156, 157, 158, 159, 160). Melatonin antioksidan özelliğini, genel olarak direkt radikal süpürücü etkisiyle ve diğer antioksidan mekanizmaları harekete geçirmek yoluyla gösterir.

Melatoninin hidroksil radikalini detoksifiye ettiği ilk kez Tan ve arkadaşları bildirmiştir. Doza bağımlı olan bu etkinin glutatyon ve mannitolden sırasıyla 5 ve 10 kat daha etkin olduğu ortaya konmuştur (161).

UBİKİNON (Koenzim Q)

Mitokondri iç membranında elektron taşıma zincirinin elemanlarından biri olarak bulunan ubikinon, LDL, plazma membranı ve tüm hücre içi membranlarda da bulunur. İndirgenmiş biçimi (ubikinol), lipid peroksidasyonunu engeller ve E vitamininin rejenerasyonunu sağlar. Ancak bu sırada kendisi ubisemikinona dönüşür. Ubisemikinon, güçlü bir süperoksit oluşturma kaynağıdır. Bu açıdan antioksidan niteliği kadar prooksidan nitelik de gösterebilmektedir (149).

SERULOPLAZMİN

Primer olarak karaciğerde sentez edilen ve alfa-2 globulin yapısında olan bir proteindir. Plazmada mevcut bakırın %90'ını taşıyabilir. En önemli görevleri bakırın karaciğerden periferik dokulara taşınması, demir transportu ve ferro-oksidad aktivitesidir. Ferro-oksidad aktivitesi ferröz (Fe^{++}) demirin ferrik (Fe^{+++}) demire dönüşümü için gereklidir (162). Böylelikle Fenton reaksiyonunu ve radikal oluşumunu etkiler.

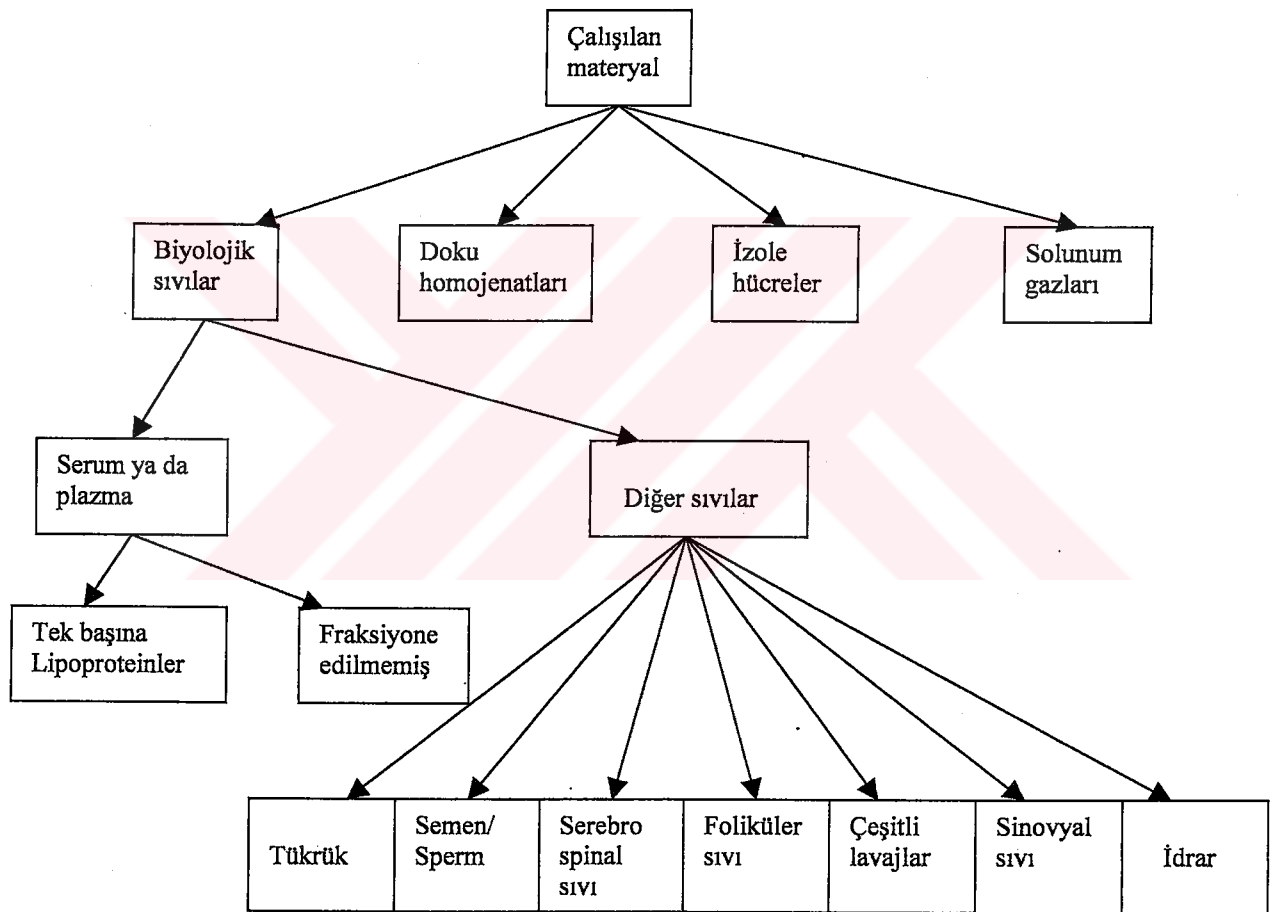
IV- OKSİDATİF STRES ve ANTİOKSİDAN STATUSUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Organizmada oksidatif stresin belirlenmesi ve antioksidan statusun değerlendirilmesine yönelik çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Tüm bu yöntemlerin değerlendirilmesi ve birbirleriyle olan korelasyonu da bugün için ayrı bir tartışma konusudur (163).

Bununla birlikte oksidatif stresi değerlendirmeye yönelik incelemeler üç ana kategoride toplanabilir:

1. Oksidatif strese işaret eden yıkım ürünleri, başlatıcılar ve inhibitörlerin çeşitli biyolojik materyallerde gösterilmesi esasına dayanan yöntemler
2. Biyolojik sıvılardaki oksidatif ya da redüktif kapasitenin belirlenmesi esasına dayanan yöntemler
3. Çeşitli vücut sıvılarında ya da onların bazı komponentlerinde ex-vivo oksidasyon duyarlılığının ölçülmesi esasına dayanan yöntemler

Tüm bu yöntemlerde değerlendirilen parametreler için kullanılan örnekler ise Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5: Oksidatif status için çalışılan materyaller (163)

Oksidatif stres ve reaktif oksijen türlerinin değerlendirilmesi ile ilgili analizler içinde bugün için en sık kullanılan lipid peroksidasyon ürünlerinin tayinine dayalı yöntemlerdir.

Lipid peroksidasyonunun inisiyal fazının sonunda ortaya çıkan dien konjugatlarının tayini bunlardan biridir. Serum ve plazmanın metanol-kloroform ekstraktlarının spektrofotometrede taranmasıyla bu değişim doğrudan analiz edilebilir. Bu aktif substansın yıkımıyla çeşitli aldehitler ve eğer orijinal yağ asidi araşidonik asit ise isoprostanlar açığa çıkar ki, bunların da analizleri mümkündür. Aldehitler HPLC (high performance liquid chromatography) sistemleri ile analiz edilir.

Lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan Malondialdehit (MDA), oksidatif stresin gösterilmesinde en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. MDA' nın tiyobarbitürik asitle birleşmesi spektrofotometrede ölçülebilen bir ürün oluşturur. Kullanılacak örnekler -80°C ' de 1-2 ay saklanabilir. MDA için diğer aldehitler gibi HPLC analizleri de mevcuttur.

Glutasyon hem intrasellüler hem de ekstrasellüler ortam için önemli bir antioksidandır. İntrasellüler kompartmandaki konsantrasyonları milimolar düzeylerde iken, plazma konsantrasyonları mikromolar düzeylerde dir. GSH/GSSG oranı, oksidatif stres için önemli bir indekstir. Bu amaçla, spektrofotometrik, fluorometrik ve HPLC analiz yöntemleriyle GSH ve GSSG düzeyleri ölçülebilmektedir (163).

Düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar başlığı altında toplanan vitamin E, vitamin C, ürik asit, karotenoidler (sıklıkla β -karoten) ve ubikinol (Q10) konsantrasyonları da çeşitli vücut sıvıları ve doku örneklerinde analiz edilebilmektedir.

Biyolojik sıvıların ve dokuların antioksidan statusunun değerlendirilmesinde antioksidan kapasite (Total Antioksidan Aktivite) ölçümleri kullanılmaktadır. Vücut sıvılarının total antioksidan analizi, farklı sıvılardarölatif antioksidan aktivitelerin genel bir görüntüsünü verir. FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma veya Ferric Reducing/Antioxidant Power) total antioksidan aktivitenin direkt ölçüm yöntemidir. Bu yöntemle temel antioksidanlar olarak ürik asit, askorbik asit, protein, α - tokoferol, bilirubin ve diğer antioksidanların plazma değerleri saptanabilmektedir.

SOD, katalaz, glutasyon peroksidaz, glutasyon redüktaz ve glutasyon-S-tranferazlar gibi enzimatik antioksidanların aktiviteleri de spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Enzim aktivitelerinin belirlenmesinde oluşan son ürünlerin ya da substrat düzeylerinin takibi sözkonusudur. Oksidatif statusa yönelik ölçümlerde en çok kullanılan SOD (164), glutasyon peroksidaz (165) ve katalazdır (166).

GEREÇ-YÖNTEM

Farklı basınç değerlerinde uygulanan Hiperbarik oksijen tedavisinin eritrosit, plazma ve doku düzeyinde malondialdehit, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz düzeyleri üzerine olan etkisini araştırılması amacı ile planlanan bu çalışma, Temmuz 2004’ de İstanbul Tıp Fakültesi Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı’ nda gerçekleştirildi.

Çalışmada Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deneysel Hayvan Laboratuvarı’ nda yetiştirilen ve ağırlıkları 180-260 gr. arasında değişen 56 adet erkek, Wistar Albino cinsi genç erişkin sıçan kullanıldı. Sıçanların çalışma öncesinde biyolojik ve beslenme koşullarının eşit ve sağlıklı olmalarına özen gösterildi. Sıçanlar, ortam sıcaklığının 21 ± 2 °C olduğu 35x50 cm. boyutlu kafeslerde, besin ve su gereksinimlerini kendilerinin karşılayabilmesine uygun 4 erli gruplar halinde izlendiler. Kafeslerin tabanındaki talaş, kuru kalacak şekilde belli aralıklarda değiştirildi. Ortamın ışıklandırılması, 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık periyotlarında düzenlendi.

Deney öncesi sıçanlar 8 erli 7 eşit alt gruba ayrıldı. Grupların işaretlenmesi amacıyla her bir sıçanın kuyruğu ve bulunduğu kafes, sabit kalemle boyandı.

Gruplar ve hiperbarik oksijen tedavisi protokolleri şu şekilde belirlendi:

Grup-I: Kontrol grubu: 8 adet sıçan ilk gün Ketalar ile anestezi altına alındı, biyokimyasal tetkikler için gerekli kan, intrakardiyak olarak sağ ventrikülden alındıktan sonra kurban edildi. (Resim 1, 2)

Grup-II: Normobarik (1 ATA) şartlarda belirlenen protokolde 10 gün boyunca %100 oksijen solutulan grup: 8 adet sıçana 10 günlük çalışma sürecinde, eşit aralıklarla, ilk gün 3 seans, ikinci, üçüncü ve dördüncü gün 2 seans, kalan günlerde günde 1 seans şeklinde belirlenen protokolde, 60 dakika boyunca %100 oksijen solutuldu. Bu tedavi, 10. günün sonunda 15. seansta sonlandırıldı ve sıçanlar, Ketalar ile anestezi altına alınıp, biyokimyasal tetkikler için gerekli kan, intrakardiyak olarak sağ ventrikülden alındıktan sonra kurban edildi. (Resim 1, 2)

Grup-III: 2 ATA’ lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup: 8 adet sıçana 10 günlük çalışma sürecinde, eşit aralıklarla, ilk gün

3 seans, ikinci, üçüncü ve dördüncü gün 2 seans ve kalan günlerde günde 1 seans şeklinde belirlenen protokolde, 2 ATA basınç değerinde Hiperbarik Oksijen Tedavisi uygulandı. Bu tedavi, 10. günün sonunda 15. seansta sonlandırıldı ve sıçanlar, Ketalar ile anestezi altına alınıp, biyokimyasal tetkikler için gerekli kan, intrakardiyak olarak sağ ventrikülden alındıktan sonra sakrifiye edildi. (Resim 1, 2)

Grup-IV: 2,4 ATA'lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup: 8 adet sıçana 10 günlük çalışma sürecinde eşit aralıklarla, ilk gün 3 seans, ikinci, üçüncü ve dördüncü gün 2 seans ve kalan günlerde günde 1 seans şeklinde belirlenen protokolde, 2,4 ATA basınç değerinde Hiperbarik Oksijen Tedavisi uygulandı. Bu tedavi, 10. günün sonunda 15. seansta sonlandırıldı ve sıçanlar, Ketalar ile anestezi altına alınıp, biyokimyasal tetkikler için gerekli kan, intrakardiyak olarak sağ ventrikülden alındıktan sonra sakrifiye edildi. (Resim 1, 2)

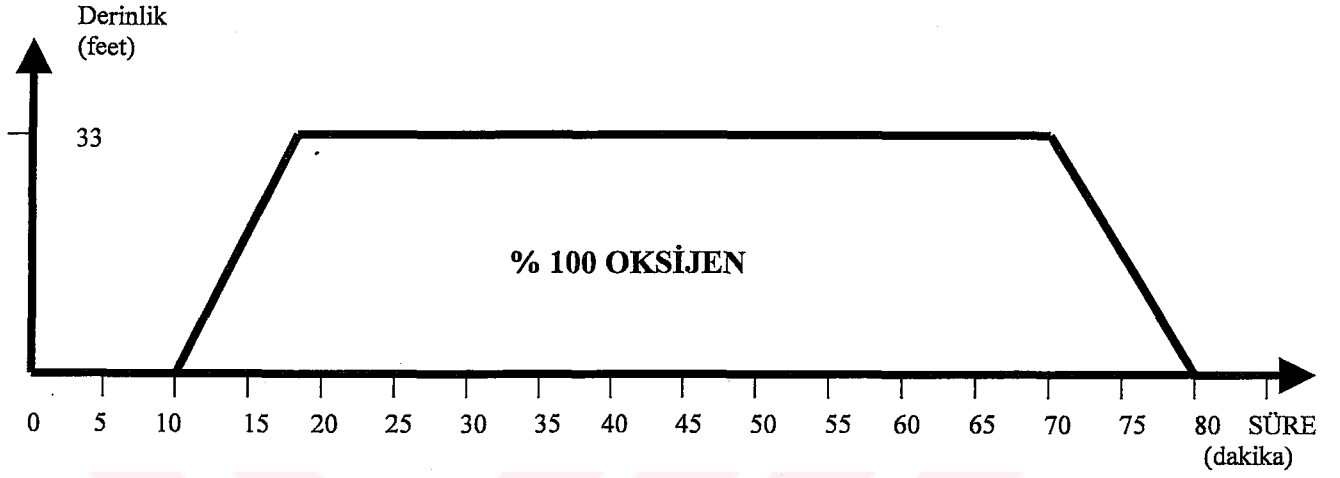
Grup-V: Normobarik (1 ATA) şartlarda 24 saatte 3 seans %100 oksijen solutulan grup: 8 adet sıçana çalışmanın ilk gününde, eşit aralıklarla, 60' ar dakikalık seanslar şeklinde, toplam 3 seans, %100 oksijen solutuldu. Bu tedavi, 24. saatin sonunda sonlandırıldı ve sıçanlar, Ketalar ile anestezi altına alınıp, biyokimyasal tetkikler için gerekli kan, intrakardiyak olarak sağ ventrikülden alındıktan sonra sakrifiye edildi. (Resim 1, 2)

Grup-VI: 2 ATA'lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup: 8 adet sıçana çalışmanın ilk gününde, eşit aralıklarla, 60 dakika boyunca, 2 ATA'lık basınç değerinde, toplam 3 seans Hiperbarik oksijen tedavisi uygulandı. Bu tedavi, 24. saatin sonunda sonlandırıldı ve sıçanlar, Ketalar ile anestezi altına alınıp, biyokimyasal tetkikler için gerekli kan, intrakardiyak olarak sağ ventrikülden alındıktan sonra sakrifiye edildi. (Resim 1, 2)

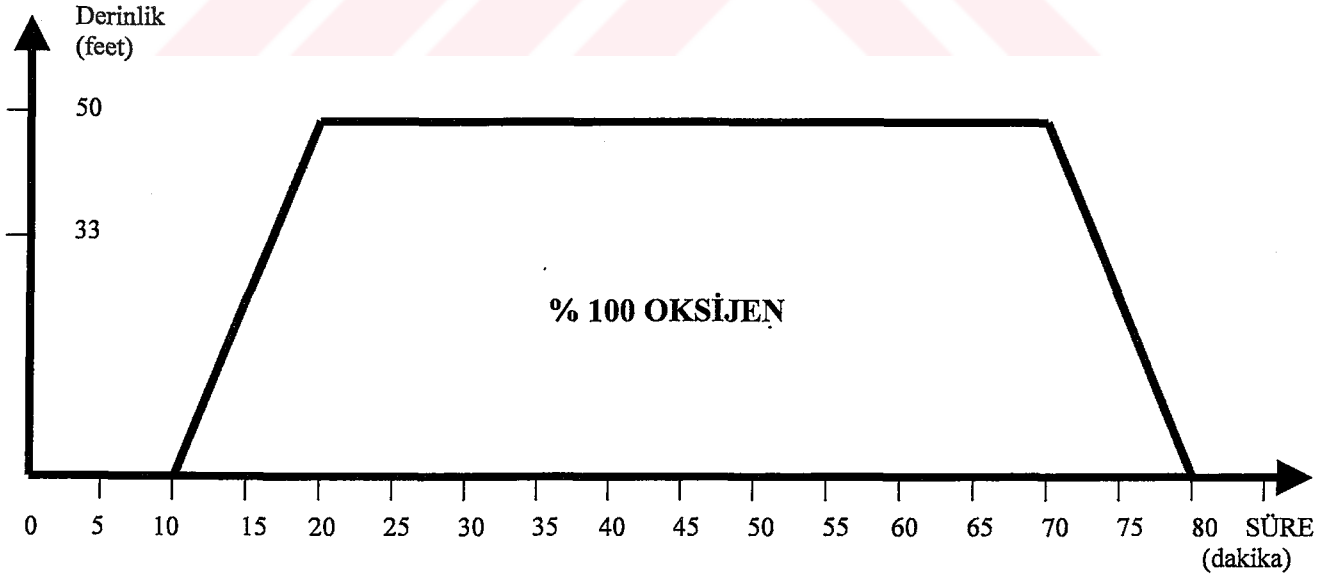
Grup-VII: 2,4 ATA'lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup: 8 adet sıçana çalışmanın ilk gününde, eşit aralıklarla, 60 dakika boyunca, 2,4 ATA'lık basınç değerinde, toplam 3 seans Hiperbarik oksijen tedavisi uygulandı. Bu tedavi, 24. saatin sonunda sonlandırıldı ve sıçanlar, Ketalar ile anestezi altına alınıp, biyokimyasal tetkikler için gerekli kan, intrakardiyak olarak sağ ventrikülden alındıktan sonra sakrifiye edildi. (Resim 1, 2)

HBO ve Normobarik oksijen tedavisi, İstanbul Tıp Fakültesi Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı'nda bulunan 0.28 m³ hacminde tek bölmeli basınç odasında gerçekleştirildi. (Resim 3)

Hiperbarik oksijen tedavisi seansları; 10 dakika ventilasyon (basınç odası içini %100 oksijenlendirmek için), 10 dakika 33 feet' e (2 ATA) ve 50 feet' e (2,4 ATA) dalış ve 10 dakika çıkış olmak üzere toplam 80 dakika idi. (Tablo 10 ve 11)



Tablo 10: 2 ATA basınç değerinde uygulanan HBO tedavi tablosu



Tablo 11: 2,4 ATA basınç değerinde uygulanan HBO tedavi tablosu

Biyokimyasal değerlendirme:

Biyokimyasal alışmalar için gerekli kan örnekleri her bir grupta belirlenen tedavinin hemen bitiminde Ketalar (50 mg/kg) ile anestezi altına alınan sıçanlardan intrakardiyak olarak sağ ventrikülden, heparinli tüplere alındı. Kan rnekleri, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında 2,500 g. de 10 dk. santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. GSH için kan rneği 3 kez % 0,9'luk NaCl ile yıkanarak, yıkanmış eritrositlerde aynı gün GSH (glutatyon) tayinleri yapıldı. Elde edilen plazma örnekleri ise ölçüm anına kadar -80⁰ C de muhafaza edildi.

Plazma Malondialdehit (MDA) lm: Plazma lipid peroksit seviyesini belirlemek için kullanılan yöntemlerden birisi olan malondialdehit düzeyinin lm, Buege ve Aust tarafından tanımlanan yönteme göre spektrofotometrik olarak saptandı (167).

Bu metod, lipid peroksidasyonunun önemli son ürünlerinden biri olan MDA' in thiobarbituric asit ile asit ve sıcak ortamda reaksiyonu sonucu kırmızı renk oluşumuna dayanmaktadır. lm prensibi, bir molekül malondialdehit ile iki molekül thiobarbitrik asidin kondansasyonu sonucu oluşan renkli kompleksin 535 nm' deki absorbansının spektrofotometrik tayini esasına dayanmaktadır.

Ayıraçlar:

Stok zelti: 1. %15 TCA (Trikloroasetik asit) zeltisi

2. %0.375 TBA (Thiobarbitrik asit) zeltisi

3. 0.25 N HCl karışımı hazırlanır.

İşlem: 250 mikrolitre plazma, 1000 mikrolitre stok çözelti ile karıştırılır. Tüplerin ağzı kapatılarak 15 dakika kaynar su banyosunda (100 °C de) bekletilir. Soğuduktan sonra, 1000 g' (gravite) de 10 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantın absorbansı 535 nm' de kre (500 mikrolitre distile su+ 1000 mikrolitre stok çözeltisi) karşı spektrofotometrik olarak okunur.

Sonuç: Örnekteki MDA konsantrasyonu, ekstinksiyon katsayısı ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ve dilüsyonlar hesaplanarak mikromol/L ya da nmol/mL plazma olarak TBARS (Thiobarbitrik asitle reaksiyon veren substratlar) değerleri ifade edilir.

Bu yöntemle deneklerden alınan plazma MDA sonuçları nmol/mL olarak verildi.

Plazma Superoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin ölçümü: Deneklerden alınan plazma örneklerinde SOD aktivitesi Sun' ın metodu kullanılarak saptandı (168).

Bu yöntemle SOD aktivitesinin tayininin esası, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile oluşturulan süperoksit anyonlarının nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgememesinin SOD tarafından inhibisyonuna dayanır. 1 ünite SOD, NBT indirgenmesini %50 inhibe eden enzim aktivitesini göstermektedir.

Reaksiyon karışımı için 200 mL' lik bir behere

- 40 mL ksantin
- 20 mL EDTA
- 20L NBT
- 12 mL Na₂CO₃
- 6 mL bovin serum albumin

konulur ve pH 10.2' ye ayarlanır.

Plazmada:

	Test (mL)
Plazma	0.02
Distile su	0.18
Kloroform – Etanol	0.16

10.000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilir.

	Kör (mL)	Test (mL)
Reaksiyon karışımı	1	1
Distile su	0.16	-
Süpernatant	-	0.16
Ksantin oksidaz	0.1	0.1

25 °C' de 20 dakika inkübe edilir.

CuCl ₂	0.05	0.05
-------------------	------	------

Spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda formazon oluşumu ölçülür.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(A_{\text{kör}} - A_{\text{numune}})}{A_{\text{kör}}} \times \%100$$

formülü ile % inhibisyondan standart CuZn- SOD aktivitesi hesaplanarak mg/L olarak değeri belirlenir.

Bu yöntemle deneklerden alınan plazma örneklerinde SOD aktivitesi Sun yöntemi modifiye edilerek ölçüldü. Sonuçlar U/mL olarak verildi.

Eritrosit Glutasyon (GSH) düzeyinin ölçümü: Glutasyon düzeyleri Beutler ve arkadaşlarının metodu kullanılarak ölçüldü (169).

Bu yöntemin prensibi, tuz çöktürmesi ile deproteinize edilen eritrosit hemolizatındaki glutasyonun 5, 5'- di tio bis – (2-nitro benzoik asit), DTNB varlığında tamponlanmış ortamda 412 nm de absorpsiyon yapan indirgenmiş sarı renkli kromojen oluşturması esasına dayanır.

Ayırıcılar:

1. Proteinsizleştirme çözeltisi: 1.67 gr metafosforik asit, 0.20 gr disodyum EDTA, 30 gr NaCl 100 ml' ye distile su ile tamamlanır.
2. Fosfat çözeltisi: 0.3 M Na₂HPO₄
3. DTNB ayırıcı: 40 mg 5, 5'- di tio bis - 2-nitro benzoik asit (DTNB), 100 ml %1 lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülerek hazırlanır.

İşlem: Oda sıcaklığına getirilen eritrositlerden 0.2 ml alınır. Üzerine 1.8 ml distile su 3.0 ml proteinsizleştirme çözeltisi eklenerek vortekste karıştırılır. 5 dakika oda ısısında bekletilip süzülür. Süzüntüden 2 ml alınıp, üzerine 8 ml Na₂HPO₄ ve 1 ml DTNB çözeltisi eklenir. Kör için 1.2 ml proteinsizleştirme çözeltisi konularak 412 nm de köre karşı absorbans okunur.

$$\begin{aligned} \text{GSH değerlerinin hesaplanması } \% \text{ mg} &= \text{Ekstinksiyon katsayısı} \times \text{Dilüsyonlar} \\ &= (\text{Abs}/13.6) \times (5/2 \times 11/2 \times 307 \times 100) \end{aligned}$$

Hemoglobin % gr = (Numune abs/Standart abs) x Dilüsyon x Std gr x 100

şeklinde formülize edilen hesaplamaların ardından eritrosit GSH düzeyleri mg/gr hemoglobin olarak verilir.

Eritrosit hemoglobin tayini: Eritrosit hemoglobin tayinindeki prensip, hemoglobin içindeki demirin ferrosiyandırle oksitlenerek methemoglobine çevrilmesi ve oluşan bu methemoglobinin siyanürle reaksiyona girerek sonuçta stabil siyanomethemoglobine dönüşmesidir. Oluşan bu renkli ürünün absorbansının 546 nm' de spektrofotometrik olarak ölçümü, eritrosit içi hemoglobin düzeyini belirler (170).

Ayırıcılar:

Drabkin ayırıcı: 50 mg potasyum siyanür, 200 mg potasyum ferrisiyanür, 1 gr sodyum bikarbonat distile suda çözünerek 1 litreye tamamlanır. Ayırıcının bozulmaması için 0.140 gr KH_2PO_4 eklenir.

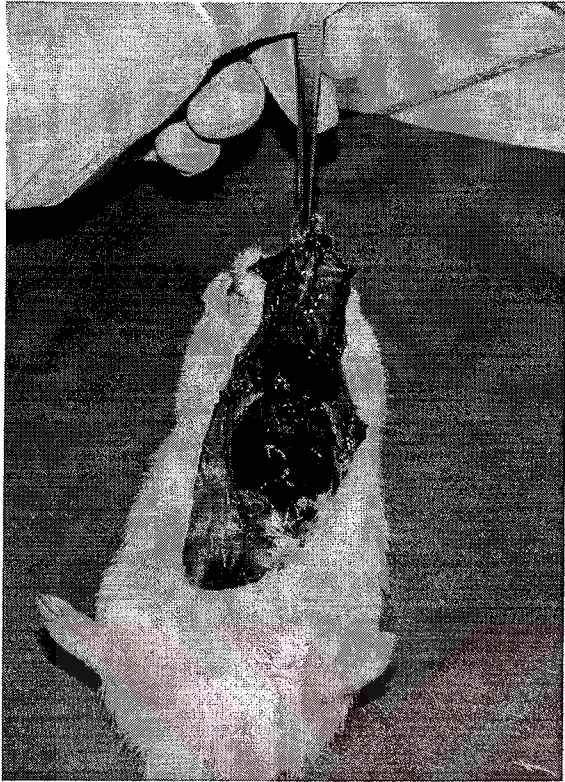
İşlem: 5 ml drabkin ayırıcı üzerine 20 µl % 0.9 NaCl ile yıkanmış eritrosit eklendi, iyice karıştırıldı. 5 dakika bekledikten sonra 546 nm' de suya karşı absorbansı spektrofotometrede ölçüldü.

Hemoglobin miktarı (gr/dl) = (Numune Abs/Standart Abs) x 36.77 formülü ile hesaplandı.

İstatistiksel Analizler: Bu çalışmada elde edilen sonuçlarda Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi yapıldı.

Kontrol grubu ile diğer tüm grupların karşılaştırılmasında Dunnett testi kullanıldı. Anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

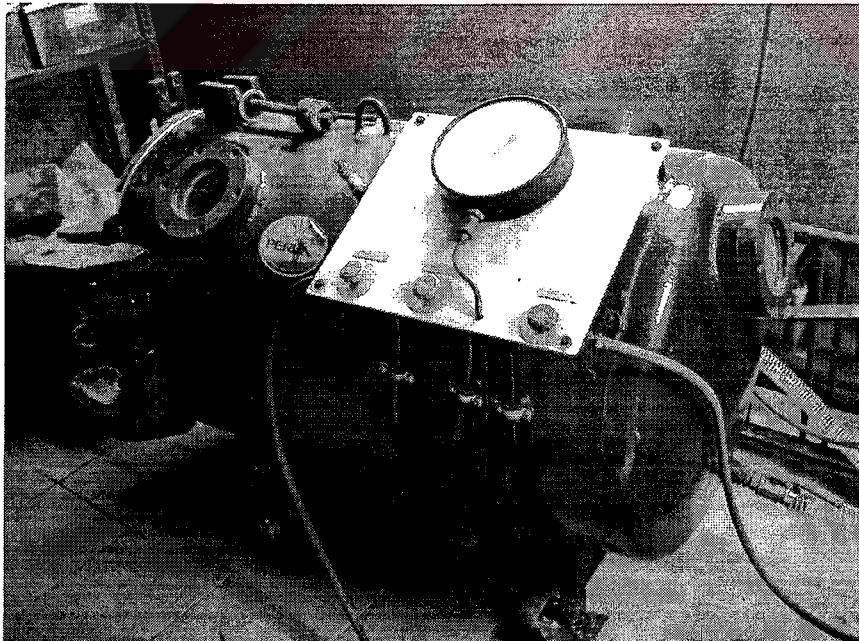
Değerlendirilen parametrelerin gruplar içinde karşılaştırılmasında ise Wilcoxon testi uygulandı. Anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak kabul edildi. .



Resim 1



Resim 2



Resim 3

BULGULAR

Farklı basınç değerlerinde uygulanan hiperbarik oksijen tedavisinin eritrosit ve plazma düzeyinde oksidatif stres ve antioksidan status üzerine olan etkisinin araştırılmasında MDA, eritrosit SOD aktivitesi ve plazma GSH düzeyleri olmak üzere üç farklı parametre kullanıldı. Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizinde gruplar arasında değerlendirilen parametrelerde MDA değerleri için $p=0.0001$, SOD değerleri için $p=0.0001$, GSH değerleri için $p=0.001$ olarak hesaplandı.

Tüm gruplarda MDA ölçümlerinde elde edilen sonuçların ortalama değerleri ve standart sapmaları Tablo 12’ de gösterilmiştir.

GRUP	ORTALAMA	STANDART SAPMA
GRUP-I (Kontrol) (n=8)	3,54	0,39
GRUP-II (Normobarik (1 ATA) şartlarda belirlenen protokolde 10 gün boyunca %100 oksijen solutulan grup) (n=8)	3,71	0,38
GRUP-III (2 ATA’ lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) (n=8)	3,65	0,34
GRUP-IV (2,4 ATA’ lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) (n=8)	3,31	0,35
GRUP-V (Normobarik (1 ATA) şartlarda 24 saatte 3 seans %100 oksijen solutulan grup) (n=8)	4,15	0,27
GRUP-VI (2 ATA’ lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup) (n=8)	4,69	0,38
GRUP-VII (2,4 ATA’ lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup) (n=8)	4,95	0,44

Tablo 12: Grupların MDA değerlerinin ortalama ve standart sapmaları

Kontrol grubu ile diğer gruplar arasında MDA değerleri açısından anlamlılık Dunnett testi kullanılarak araştırılmıştır.

Buna göre,

Grup-II' de (Normobarik (1 ATA) şartlarda belirlenen protokolde 10 gün boyunca %100 oksijen solutulan grup) elde edilen değerlerle kontrol grubunda elde edilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı.

Grup-III' de (2 ATA' lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) elde edilen değerlerle kontrol grubunda elde edilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı.

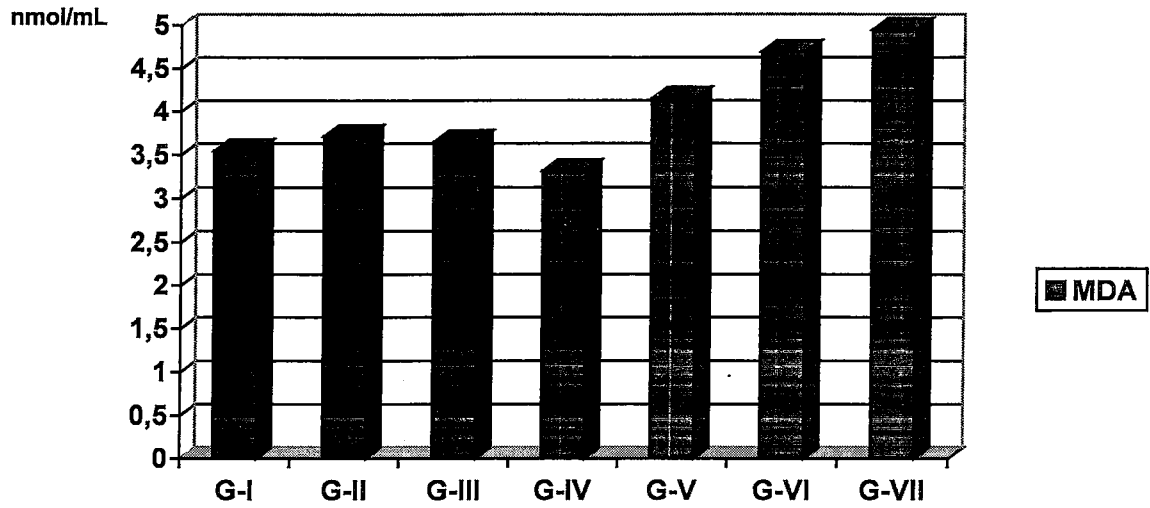
Grup-IV' de (2,4 ATA' lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) elde edilen değerlerle kontrol grubunda elde edilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı.

Grup-V' de (Normobarik (1 ATA) şartlarda 24 saatte 3 seans %100 oksijen solutulan grup) elde edilen değerlerle kontrol grubunda elde edilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı.

Grup-VI (2 ATA' lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup)' da MDA düzeyi uygulanan tedavi sonrasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu. ($p<0.05$)

Grup-VII (2,4 ATA' lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup)' de MDA düzeyi uygulanan tedavi sonrasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu. ($p<0.05$)

Grupların MDA değerleri Grafik 1' de toplu halde gösterilmiştir.



Grafik 1: MDA değerleri

Tüm gruplarda plazma SOD aktivitesi ölçümlerinde elde edilen sonuçların ortalama değerleri ve standart sapmaları Tablo 13’ de gösterilmiştir.

GRUP	ORTALAMA	STANDART SAPMA
GRUP-I (Kontrol) (n=8)	36,31	2,60
GRUP-II (Normobarik (1 ATA) şartlarda belirlenen protokolde 10 gün boyunca %100 oksijen solutulan grup) (n=8)	34,71	2,35
GRUP-III (2 ATA’ lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) (n=8)	33,93	3,33
GRUP-IV (2,4 ATA’ lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) (n=8)	38,40	4,26
GRUP-V (Normobarik (1 ATA) şartlarda 24 saatte 3 seans %100 oksijen solutulan grup) (n=8)	37,53	2,26
GRUP-VI (2 ATA’ lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup) (n=8)	28,55	2,35
GRUP-VII (2,4 ATA’ lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup) (n=8)	27,18	2,22

Tablo 13: Grupların plazma SOD aktivitesi değerlerinin ortalama ve standart sapmaları

Kontrol grubu ile diğer gruplar arasında plazma SOD aktivitesi değerleri açısından anlamlılık Dunnett testi kullanılarak araştırılmıştır.

Buna göre,

Grup-II' de (Normobarik (1 ATA) şartlarda belirlenen protokolde 10 gün boyunca %100 oksijen solutulan grup) elde edilen değerlerle kontrol grubunda elde edilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı.

Grup-III' de (2 ATA' lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) elde edilen değerlerle kontrol grubunda elde edilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı.

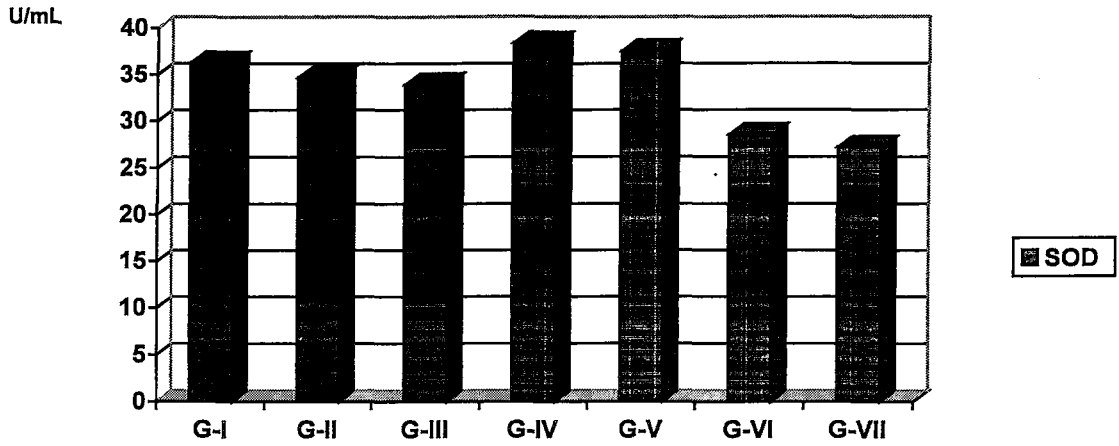
Grup-IV' de (2,4 ATA' lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) elde edilen değerler, kontrol grubuna göre bir artış gösterse de istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı.

Grup-V' de (Normobarik (1 ATA) şartlarda 24 saatte 3 seans %100 oksijen solutulan grup) elde edilen değerler, kontrol grubuna göre bir artış gösterse de istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı.

Grup-VI (2 ATA' lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup)' da plazma SOD aktivitesi düzeyi uygulanan tedavi sonrasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştı. ($p<0.05$)

Grup-VII (2,4 ATA' lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup)' de plazma SOD aktivitesi düzeyi uygulanan tedavi sonrasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştı. ($p<0.05$)

Grupların plazma SOD aktivitesi değerleri Grafik 2' de toplu halde gösterilmiştir.



Grafik 2: Plazma SOD aktivitesi

Tüm gruplarda eritrosit GSH düzeyi ölçümlerinde elde edilen sonuçların ortalama değerleri ve standart sapmaları Tablo 14’ de gösterilmiştir.

GRUP	ORTALAMA	STANDART SAPMA
GRUP-I (Kontrol) (n=8)	3,74	0,19
GRUP-II (Normobarik (1 ATA) şartlarda belirlenen protokolde 10 gün boyunca %100 oksijen solutulan grup) (n=8)	3,71	0,18
GRUP-III (2 ATA’ lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) (n=8)	3,71	0,29
GRUP-IV (2,4 ATA’ lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) (n=8)	4,09	0,42
GRUP-V (Normobarik (1 ATA) şartlarda 24 saatte 3 seans %100 oksijen solutulan grup) (n=8)	3,69	0,22
GRUP-VI (2 ATA’ lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup) (n=8)	3,43	0,32
GRUP-VII (2,4 ATA’ lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup) (n=8)	3,23	0,24

Tablo 14: Grupların eritrosit GSH düzeyi değerlerinin ortalama ve standart sapmaları

Kontrol grubu ile diğer gruplar arasında eritrosit GSH düzeyi değerleri açısından anlamlılık Dunnett testi kullanılarak araştırılmıştır.

Buna göre,

Grup-II' de (Normobarik (1 ATA) şartlarda belirlenen protokolde 10 gün boyunca %100 oksijen solutulan grup) elde edilen değerlerle kontrol grubunda elde edilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı.

Grup-III' de (2 ATA' lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) elde edilen değerlerle kontrol grubunda elde edilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı.

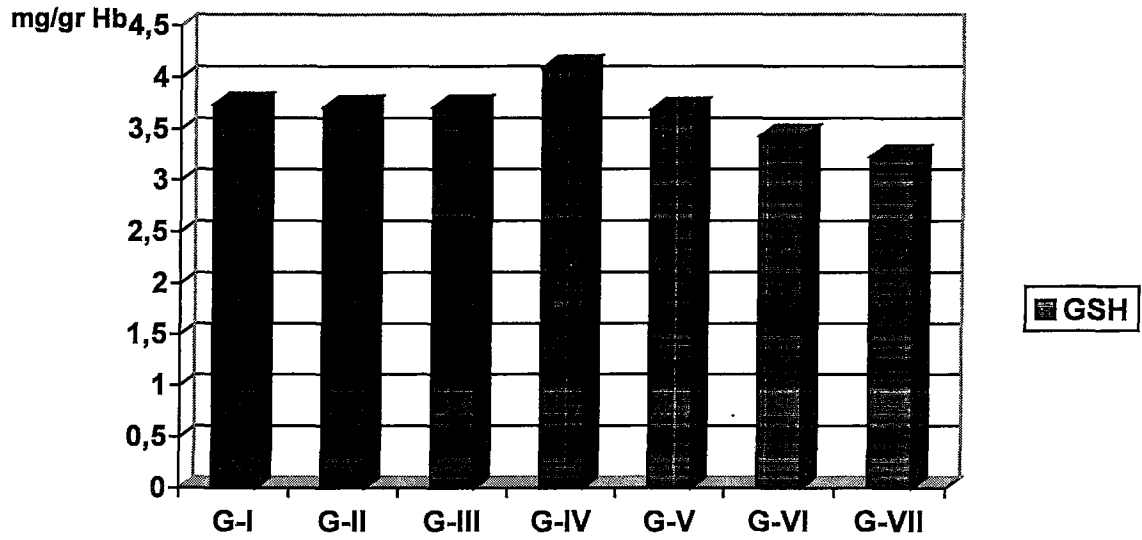
Grup-IV' de (2,4 ATA' lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) elde edilen değerler, kontrol grubuna göre bir artış gösterse de fark, istatistiksel olarak anlam ifade etmiyordu.

Grup-V' de (Normobarik (1 ATA) şartlarda 24 saatte 3 seans %100 oksijen solutulan grup) elde edilen değerlerle kontrol grubunda elde edilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı.

Grup-VI (2 ATA' lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup)' da elde edilen değerlerle kontrol grubunda elde edilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı.

Grup-VII (2,4 ATA' lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup)' de uygulanan tedavi sonrasında eritrosit GSH düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştı. ($p<0.05$)

Grupların eritrosit GSH değerleri Grafik 3' de toplu halde gösterilmiştir.



Grafik 3: Eritrosit GSH düzeyleri

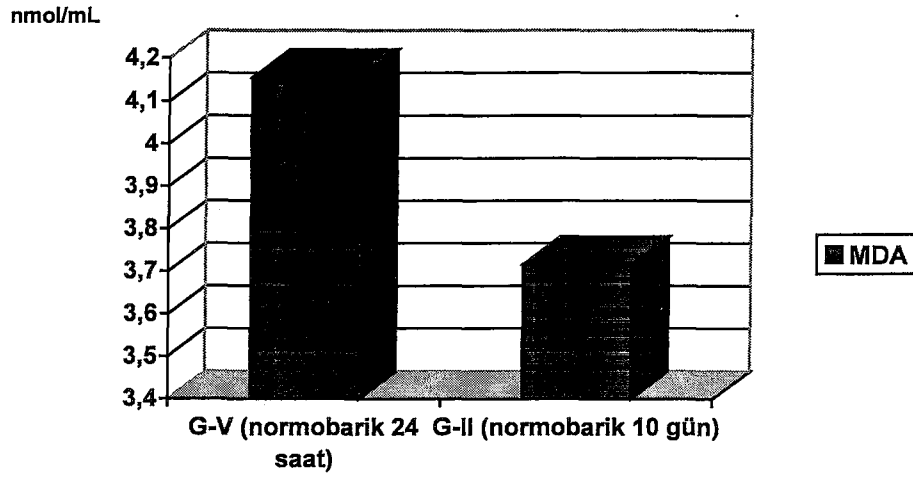
Plazma MDA, SOD ve eritrosit GSH düzeylerinin 24 saatlik gruplarla 10 günlük gruplar arasında karşılaştırılmasında Wilcoxon testi kullanıldı.

Buna göre MDA değerlerinin gruplar arası karşılaştırmasında,

Grup-V (Normobarik (1 ATA) şartlarda 24 saatte 3 seans %100 oksijen solutulan grup) ile Grup-II (Normobarik (1 ATA) şartlarda belirlenen protokolde 10 gün boyunca %100 oksijen solutulan grup) arasında MDA değerleri grup-II de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu. ($p < 0.05$) (Tablo 15, Grafik 4)

GRUP	ORTALAMA	STANDART SAPMA
GRUP-II (Normobarik (1 ATA) şartlarda belirlenen protokolde 10 gün boyunca %100 oksijen solutulan grup) (n=8)	3,71	0,38
GRUP-V (Normobarik (1 ATA) şartlarda 24 saatte 3 seans %100 oksijen solutulan grup) (n=8)	4,15	0,27

Tablo 15: Grupların MDA değerlerinin ortalama ve standart sapmaları

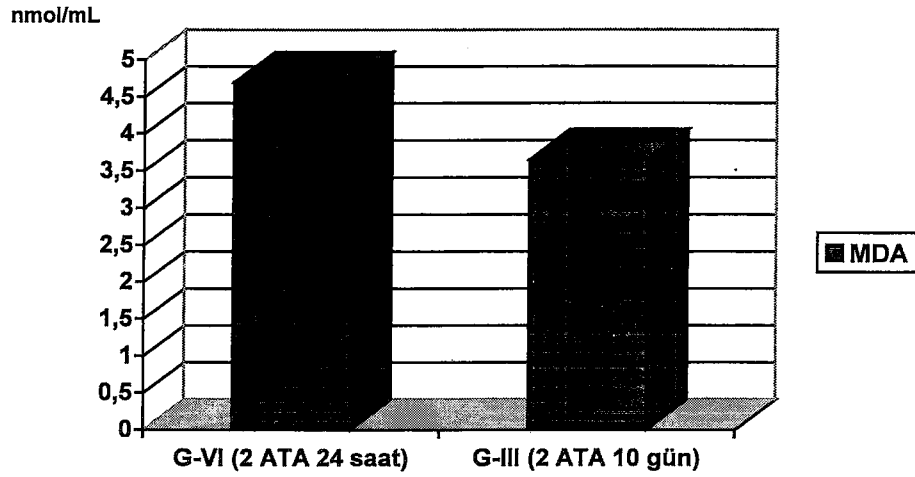


Grafik 4: Grup-V ve Grup-II MDA düzeyleri

Grup-VI (2 ATA'lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup) ile Grup-III (2 ATA'lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) arasında MDA değerleri grup VI da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu. ($p<0.05$) (Tablo 16, Grafik 5)

GRUP	ORTALAMA	STANDART SAPMA
GRUP-III (2 ATA'lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) (n=8)	3,65	0,34
GRUP-VI (2 ATA'lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup) (n=8)	4,69	0,38

Tablo 16: Grupların MDA değerlerinin ortalama ve standart sapmaları

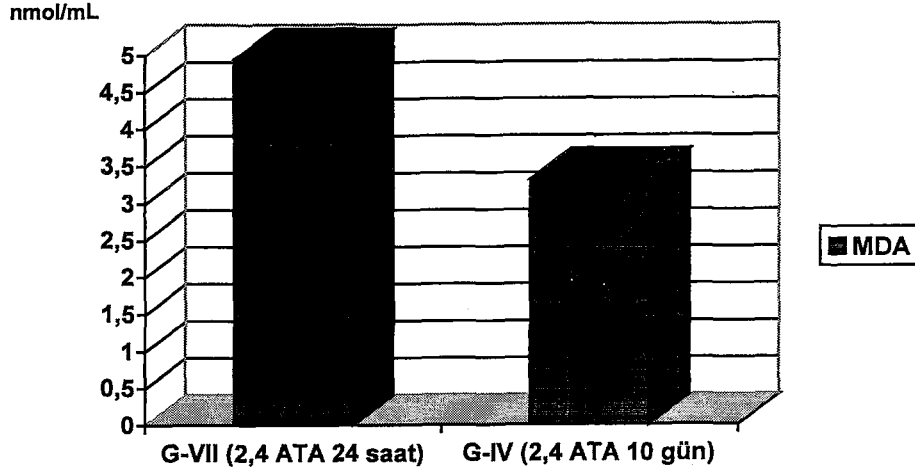


Grafik 5: Grup-VI ve Grup-III MDA düzeyleri

Grup-VII (2,4 ATA'lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup) ile Grup-IV (2,4 ATA'lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) arasında MDA değerleri grup IV de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu. ($p < 0.05$) (Tablo 22 ve 23)

GRUP	ORTALAMA	STANDART SAPMA
GRUP-IV (2,4 ATA'lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) (n=8)	3,31	0,35
GRUP-VII (2,4 ATA'lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup) (n=8)	4,95	0,44

Tablo 17: Grupların MDA değerlerinin ortalama ve standart sapmaları



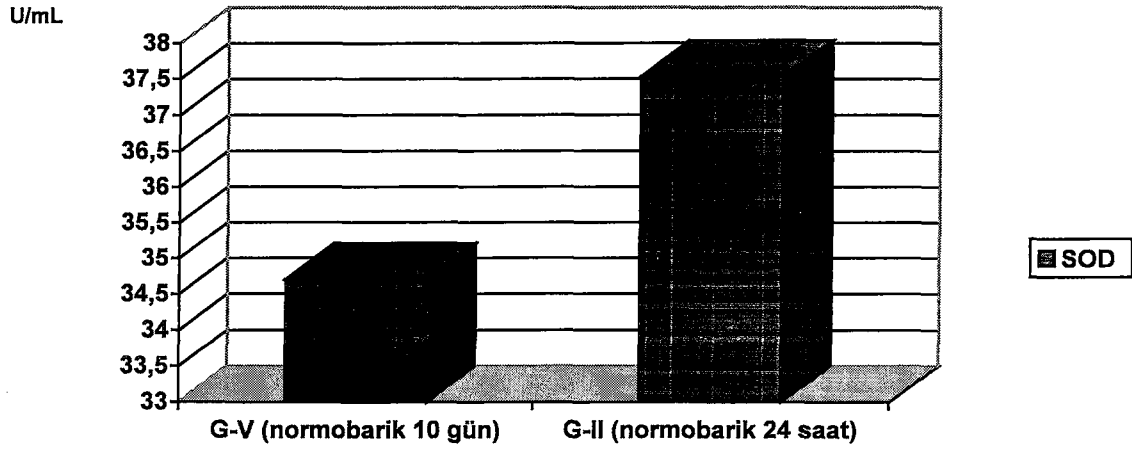
Grafik 6: Grup-VII ve Grup-IV MDA düzeyleri

Plazma SOD değerlerinin gruplar arası karşılaştırmasında,

Grup-II (Normobarik (1 ATA) şartlarda belirlenen protokolde 10 gün boyunca %100 oksijen solutulan grup) ile Grup-V (Normobarik (1 ATA) şartlarda 24 saatte 3 seans %100 oksijen solutulan grup) arasında grup II de plazma SOD değerleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu. ($p < 0.05$) (Tablo 18, Grafik 7)

GRUP	ORTALAMA	STANDART SAPMA
GRUP-II (Normobarik (1 ATA) şartlarda belirlenen protokolde 10 gün boyunca %100 oksijen solutulan grup) (n=8)	34,71	2,35
GRUP-V (Normobarik (1 ATA) şartlarda 24 saatte 3 seans %100 oksijen solutulan grup) (n=8)	37,53	2,26

Tablo 18: Grupların plazma SOD aktivitesi değerlerinin ortalama ve standart sapmaları

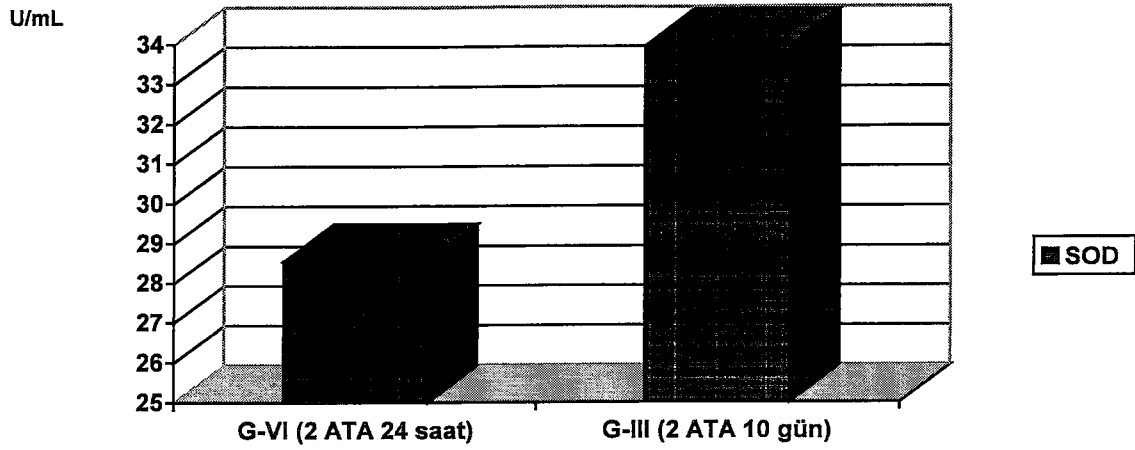


Grafik 7: Grup-V ve Grup-II plazma SOD düzeyleri

Grup-III (2 ATA'lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) ile Grup-VI (2 ATA'lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup) arasında plazma SOD değerleri grup III de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu. ($p < 0.05$) (Tablo 19, Grafik 8)

GRUP	ORTALAMA	STANDART SAPMA
GRUP-III (2 ATA'lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) (n=8)	33,93	3,33
GRUP-VI (2 ATA'lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup) (n=8)	28,55	2,35

Tablo 19: Grupların plazma SOD aktivitesi değerlerinin ortalama ve standart sapmaları

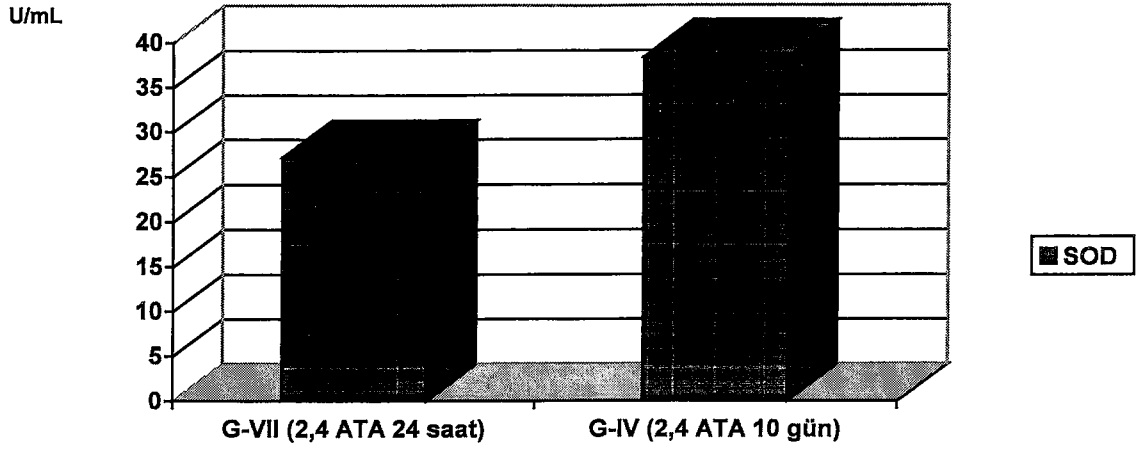


Grafik 8: Grup-VI ve Grup-III plazma SOD düzeyleri

Grup-IV (2,4 ATA'lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) ile Grup-VII (2,4 ATA'lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup) arasında plazma SOD değerleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu. ($p<0.05$) (Tablo 20, Grafik 9)

GRUP	ORTALAMA	STANDART SAPMA
GRUP-IV (2,4 ATA'lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) (n=8)	38,40	4,26
GRUP-VII (2,4 ATA'lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup) (n=8)	27,18	2,22

Tablo 20: Grupların plazma SOD aktivitesi değerlerinin ortalama ve standart sapmaları



Grafik 9: Grup-VII ve Grup-IV plazma SOD düzeyleri

Eritrosit GSH değerlerinin gruplar arası karşılaştırmasında,

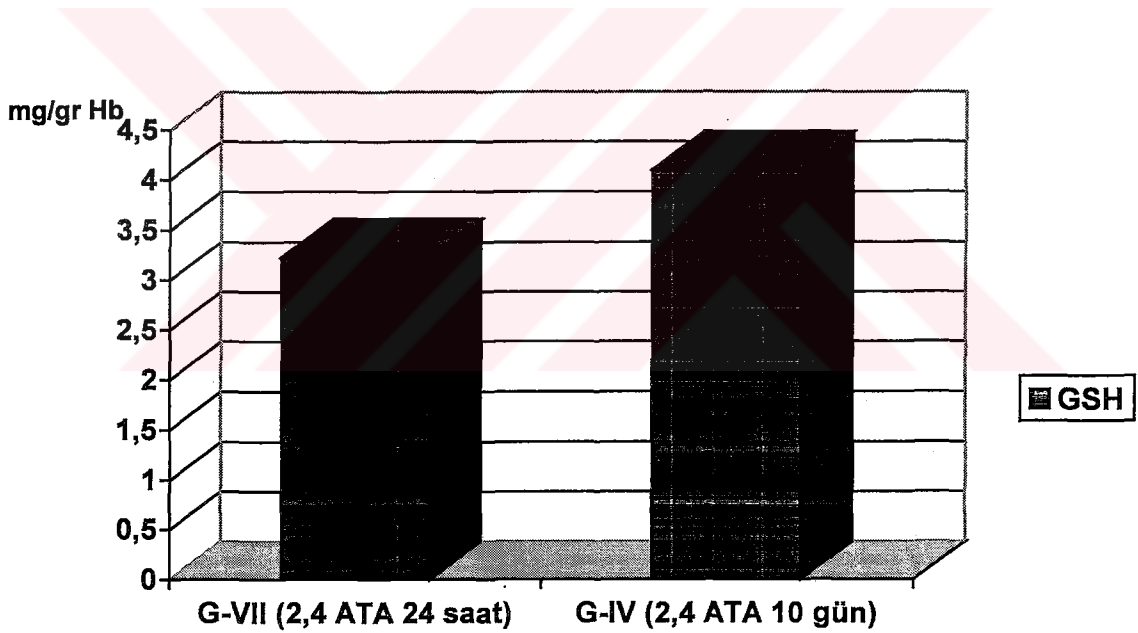
Grup-II (Normobarik (1 ATA) şartlarda belirlenen protokolde 10 gün boyunca %100 oksijen solutulan grup) ile Grup-V (Normobarik (1 ATA) şartlarda 24 saatte 3 seans %100 oksijen solutulan grup) arasında eritrosit GSH değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı. ($p>0.05$)

Grup-III (2 ATA'lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) ile Grup-VI (2 ATA'lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup) arasında eritrosit GSH değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı. ($p>0.05$)

Grup-IV (2,4 ATA'lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) ile Grup-VII (2,4 ATA'lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup) arasında eritrosit GSH değerleri grup IV için istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu. ($p<0.05$) (Tablo 21, Grafik 10)

GRUP	ORTALAMA	STANDART SAPMA
GRUP-IV (2,4 ATA' lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) (n=8)	4,09	0,42
GRUP-VII (2,4 ATA' lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup) (n=8)	3,23	0,24

Tablo 21: Grupların eritrosit GSH düzeyi değerlerinin ortalama ve standart sapmaları



Grafik 10: Grup-VII ve Grup-IV eritrosit GSH düzeyleri

TARTIŞMA

Hiperoksik koşulların hücre ve dokulardaki toksik etkilerinin nedenleri yıllardır pekçok araştırma ve tartışmaya konu olmuştur. Hiperoksinin radikal oluşturma kapasitesi bilinmekte, ancak mekanizmaları hakkında yeterli düzeyde bilgi bulunmamaktadır.

Bu durum, dekompresyon hastalığı, hava-gaz embolizmi, karbon monoksit intoksikasyonu, yumuşak dokunun nekrotizan enfeksiyonları, radyasyon doku hasarı, refrakter osteomyelit, akut travmatik periferik iskemiler gibi oldukça geniş bir endikasyon listesine sahip olan hiperbarik oksijen tedavisinin seyri sırasında ortaya çıkan bir takım etkiler için de sözkonusudur.

HBOT, dekompresyon hastalığı, hava-gaz embolizmi ve karbon monoksit intoksikasyonunda tek başına tedavi edicidir.

Diğer endikasyonlarda ise HBO' nun antibakteriyel, anti-ödem, fibroblastik stimülasyon, neovaskülarizasyon gibi etkilerinden yararlanılmaktadır. Bunların bazılarında, etki mekanizmalarının araştırılması sonucunda elde edilen bir takım bulgular reaktif oksijen türevlerini işaret etmektedir.

Hiperoksik uygulamalarda ortaya çıkan toksik etkilerde de anahtar rolü reaktif oksijen türevleri oynamaktadır.

Yani, oksijen yüksek basınçta hem terapötik, hem de toksik etkilere sahip bir farmasötik ajan gibi davranır. Bu nedenle hiperbarik oksijenasyon, tıpkı diğer medikal ilaçlar gibi terapötik marj ayarlaması gerektirir. Yeterli doz ve sürede uygulanmadığı takdirde subterapötik, aşırı dozda ise toksik etki gösterecektir.

HBO' nun hangi dozda, ne kadar sürede, ne düzeyde oksidatif stres oluşturduğu ve bu stresin hangi koşullarda ne ölçüde zararlı olduğu konusundaki tartışmalar yoğundur.

Çalışmada belirlenen farklı basınç değerlerinin seçiminde normobarik (1 ATA) ortam yanında klinik uygulamalarda en çok kullanılan 2 ATA ve 2,4 ATA' nın seçilmesi de bu nedenledir.

Serbest radikal biyolojisi, son yıllarda pekçok hastalığın patogenezeine ışık tutması nedeniyle dikkatleri üzerine yoğunlaştırmaktadır. Reaktif oksijen türevlerinin neden olduğu hasarlar oksidatif stres olarak tanımlanmakta ve prooksidan-antioksidan dengenin

prooksidan yönünde değişimiyle karakterize edilen bu olayda organizma kendini bir takım savunma sistemleriyle korumaktadır.

HBO' nun bu savunma sistemlerini etkileyip etkilemediği, etkiliyorsa bu etkinin hangi protokollerde, ne zaman, ne düzeyde, sistemin hangi elemanları üzerinde olduğu da tartışmaların üzerinde yoğunlaştığı bir diğer konudur.

Çalışmada grup-II, III ve IV' ün oluşturulma nedeni, 10 gün süreyle ilk gün 3 seans, ikinci, üçüncü ve dördüncü gün 2 seans, kalan günlerde günde 1 seans şeklinde belirlenen protokolde HBO' nun bu etkilerinin kontrol grubu ile karşılaştırılarak araştırılmasına dayanmaktadır. Tedavinin ilk 24 saatlik (3 seans) dönemindeki etkilerinin, belirlenen parametrelerde grup-II, III ve IV' le karşılaştırılabilmesi için de diğer gruplar (grup-V, VI, VII) oluşturulmuştur.

Hiperbarik oksijenasyonda radikal oluşumunun artışı ve buna bağlı ikincil olayları gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların büyük çoğunluğu antibakteriyel etkinlik üzerinde yoğunlaşmaktadır.

Brown ve Brunner' in yaptığı çalışmalarda 3 ATA' nın üzerindeki %100 oksijen uygulamalarında E. Coli' nin üreme ve respirasyon faaliyetlerinin inhibe olduğu gösterilmiştir. HBO' nun bu etkisi reaktif oksijen türevleri aracılığıyla gerçekleşmektedir (171).

Hiperoksi, SOD eksikliği açısından doble mutant E. Coli' llerde serbest radikaller aracılığıyla dihidroksasid dehidrataz gibi aminoasit sentezinde rol alan bakteriyel enzimleri inaktive etmektedir. Bakteriyel dihidroksasid dehidrataz, α -ketoizovalerat oluşumunu katalizlemektedir. α -ketoizovalerat, valin, lösin gibi aminoasitlerin sentezinde yer alan bir ara üründür. 4.2 ATA' da %100 oksijen uygulaması enzimdeki Fe-S gruplarını haraplayarak inaktivasyona neden olmaktadır. Bu şekilde bakteriyel enzim blokajının ardından tetra ve pentaforile guanozin düzeyleri belirgin olarak artar ve biriken substratlar bakteriyel karbonhidrat, lipid ve nükleotid sentezini inhibe eder (171).

HBO' nun bakteriyel protein sentezi üzerindeki inhibitör etkisinin bir diğer mekanizması da RNA transkripsiyonu için gerekli substratların transportunun serbest radikallerce blokajıdır. Süperoksit radikalleri laktoz, guanozin ve metil glukopiranozid gibi RNA transkripsiyonunda rol alan substratların transportunu inhibe eder. Hiperoksi aynı zamanda bakteriyel membranda gerçekleşen ATP sentezi için gerekli proton transportunu da inhibe etmektedir. HBO' ya bağlı azalmış transport, metabolik substratların transportunda rol alan sülfhidril içerikli proteinlerin oksidasyonu ile ilişkilidir. Okside

metioninin indirgenmesinde rol alan bakteriyel enzimler oksidatif hasara karşı bakteriyel savunmada anahtar rol oynamaktadır (171).

Park ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde normobarik oksijen tedavisi ve 2,8 ATA'da uygulanan HBOT' nin bakteriyel protein sentezi üzerindeki etkinliği araştırılmıştır. Kontrol grubuyla yapılan karşılaştırmada ³⁵S- metionin işaretli protein düzeylerinin normobarik oksijenle arttığı, HBOT sırasında ise belirgin olarak azaldığı izlenmiştir (172).

HBOT' nin bakteriler üzerindeki toksisitenin en önemli mekanizmalarından biri DNA hasarıdır. HBO, *E. Coli* üzerinde mutajenik etkili bir ajandır (123). Hassan ve Fridovich toksisiteden büyük ölçüde süperoksit radikallerinin sorumlu olduğunu belirtirken (124), Moody ve Hassan'ın gerçekleştirdiği bir diğer çalışmada da salmonella türlerinde çerçeve kayması, baz değişimi gibi mutasyonlara yüksek düzeyde SOD içeren hücrelerin daha dirençli olduğu ortaya konmuştur (125).

HBO' nun klinik uygulamalarda yararlanılan bir diğer etkisi de lökositler "bakteri öldürme" üzerindeki olumlu etkileridir. Fagositik stimuluslarla indüklenen NADPH oksidazın neden olduğu serbest radikal üretimi fagolizozomlardaki bakteriyel yıkımı sağlamaktadır. Oksijen bağımlı bakteriyel yıkımda HBOT yeterli moleküler oksijen varlığını sağlamaktadır.

Thom ve arkadaşları, inflamasyon ve mikrobiyolojik savunmada hipoksi ve iskemiyi takiben, nötrofiller ve endotel arasında ortaya çıkan adhezyon artışının nötrofillerde spesifik enzim inhibisyonu oluşturan ve β_2 integrin glikoproteinlerinin fonksiyonlarını bloke eden HBO tarafından engellendiğine işaret etmiştir (173). Ardından gelen çalışmalar bu olayda da serbest radikallerin bir takım etkilerinin söz konusu olduğuna işaret etmektedir. Bu çalışmalarda etken ajanın süperoksit radikali olduğuna dair ipuçları bulunmaktadır (174).

HBO' nun antiödem etkisinin vazokonstriksiyon ve azalmış kan akımına bağlı olduğu bilinmektedir (4, 15). Tedavi sırasında kan akımındaki bu azalmanın kısmen süperoksit radikalleri ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Süperoksit, hiperoksiyle birlikte nitrik oksit inaktivasyonuna yol açmakta ve nitrik oksitin vazodilatör etkisi hiperoksi sırasında artan süperoksitle olan reaksiyonu sonrasında bloke olmaktadır (175). Süperoksitin ayrıca vazokonstriktör prostaglandinler, tirozin kinaz aktivasyonu ile vasküler düz kas hücreleri üzerine etkisi ve belki de guanilat siklaz aktivitesinin inhibisyonu yoluyla da bu etkileri arttırdığı sanılmaktadır (174).

HBOT flep, greft, radyasyon hasarı ve problem yaralarda neovaskülarizasyonu arttırmak yoluyla da terapötik etkiler göstermektedir. HBO' nun fibroblastik proliferasyonu indükleyici etkisi hücresel mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte tüm bu endikasyonlarda açıkça görülmektedir. Çalışmalar, HBO' nun fibroblast ve endotel hücreleri üzerinde growth faktör fonksiyonları ve/ veya reseptör ekspresyonlarının sinyal aracılı modülasyonu ile proliferatif etki gösterdiğini ileri sürmektedir. Reaktif oksijen metabolitleri bu sinyal moleküllerini etkileyebilmektedir. Ayrıca süperoksit ve hidrojen peroksitin fibroblastik proliferasyon (176), endotelyal hücre proliferasyonu (177, 178) ve neovaskülarizasyonu stimüle edebildiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Bu veriler ışığında HBO' nun sinyal aracılı etkinliğinin süperoksit ve/ veya hidrojen peroksit üzerinden gerçekleştiği spekülasyonu yapılabilir.

Serbest radikallerin protein, lipid, nükleik asitler gibi hücre bileşenleri ile olan etkileşimi hücre yapı ve fonksiyonlarında önemli değişikliklere neden olmaktadır (97-127). Bu değişikliklerden biri de serbest radikallerin hücre membranlarının lipid tabakasıyla etkileşimi sonucunda başlayan ve ortamda lipid peroksitlerinin artışıyla birlikte plazma membran lipid yapısının bozulmasıyla sonuçlanan lipid peroksidasyonudur.

Hücre membranı içerdiği doymamış yağ asitleri nedeniyle serbest radikallerin esas hedeflerinden biridir. Bununla birlikte hücre dışında oluşan serbest radikaller, hücre bileşenleri ile etkileşmeden önce plazma membranını geçmek zorundadır. Bu nedenle plazma membranı serbest radikal reaksiyonları için kritik bir hedef oluşturur.

Herhangi bir lipid komponentinde oluşan oksidatif hasar, membran yapısındaki proteinleri de etkilemektedir. Tüm bunlarla birlikte hücre membranının hücresel fizyolojik faaliyetlerin önemli bir bölümünün düzenleyicisi olarak fonksiyon görmesi, çalışmamızda kullanılan parametrelerin belirlenmesinde yol gösterici olmuştur.

Lipid peroksidasyonu, oksidatif stresin değerlendirilmesinde bugün için en çok kullanılan yöntemlerin biyokimyasal temelini oluşturmaktadır.

Membran yapısını oluşturan ve özelliklerini etkileyen doymamış yağ asitlerinin biyolojik zarlardaki yüksek konsantrasyonları, lipid peroksidasyonunun en fazla bu alanları etkilediğini göstermektedir. Doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu, çift bağların ayrılmasıyla başlayan bir süreçtir. Bu sürecin sonucunda ortaya çıkan lipid peroksitleri, kolaylıkla yıkılabilen ve en önemli ürünü MDA olan reaktif karbonil bileşiklerini oluşturur.

MDA, proteinlerin amino gruplarına, fosfolipidler ve nükleik asitlere bağlanarak toksik etki gösterir. MDA' nın tiyobarbitürik asitle birleşmesi spektrofotometrede ölçülebilen bir ürün oluşturur, bu yöntem, plazma, serum, serebro-spinal sıvı semen gibi biyolojik sıvılarda ve doku homojenatlarında MDA düzeylerinin ölçülebilmeye olanak sağlamaktadır (163). Peroksidasyon sırasında oluşan dien konjugatlarının ölçümü de lipid peroksitlerinin düzeyinin belirlenmesinde önemli bir yöntemdir.

HBOT' nin oksidatif stres üzerine olan etkilerinin belirlenmesinde artan serbest radikal düzeylerinin yol açabileceği hasarı bu nedenle MDA ölçümleriyle belirlemek istedik.

Hiperbarik oksijenasyonun lipid peroksidasyonu ile ilişkisi farklı şekillerde ortaya çıkmaktadır. Chavko ve Harabin, 5 atmosferlik oksijene maruz bıraktıkları sıçanlarda beynin beş farklı bölgesinden ölçümler yapmış; protein oksidasyonunun beynin tüm bölgelerinde, lipid peroksidasyonunun ise frontal korteks ve hippokampusta arttığını bildirmiştir. Aynı çalışmada okside glutatyon (GSSG) seviyelerinde de en çok kortekste olmak üzere yine bütün bölgelerde bir artış görüldüğünü ortaya koymuşlardır (180). Sinet ve arkadaşları, yine sıçanlarda beyin dokusundaki hidrojen peroksit üretiminin parsiyel oksijen basıncı artışı ile lineer olarak arttığını göstermiştir (181).

HBO' nun paraquat (182), metaiyodobenzil guanidin (183) gibi kimyasallarla birlikte lipid peroksidasyonuna olan kombine etkilerine ilişkin çalışmalarda da benzer bulgular dikkati çekmektedir.

Tao ve arkadaşlarının sıçanlar üzerinde gerçekleştirdiği bir çalışmada 3 ATA' da 1 hafta süreyle tedaviye alınan grupta plazma lipid peroksidasyon ürünlerinin belirgin ölçüde arttığını, ancak bu şekilde bir anlamlı artışın 2 ATA' lık basınç değerinde tedaviye alınan grupta izlenmediği belirlenmiştir (184).

Bununla birlikte, iskemi-reperfüzyon modellerinde reperfüzyon sırasında artan oksijen düzeylerinin reaktif oksijen türevleri aracılığıyla lipid peroksidasyonunu ilerlettiği de bilinmektedir.

Çalışmamızda HBOT' nin başlatıldığı ve 2 ve 2,4 ATA' lık basınç değerlerinde yoğun olarak uygulandığı (24 saatte 3 seans) VI ve VII. gruplarda plazma MDA düzeylerinde ilk yirmidört saatin sonunda kontrol grubuna göre belirlenen istatistiksel olarak anlamlı düzeylerdeki artış bu görüşü desteklemektedir. Ancak ilk yirmidört saatte aynı tedavinin uygulandığı, ikinci, üçüncü ve dördüncü gün 2 seans ve kalan günlerde günde 1 seans şeklinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca tedavinin sürdürüldüğü

Grup-III ve Grup-IV' te 10. günün sonunda böyle bir artış saptanmamıştır. Yani 10 günlük tedavi protokolünün sonunda ilk 24 saatte ortaya çıkan oksidatif hasarın izleri ortadan kalkmaktadır.

Bu sonuçlar, HBO' nun organizmada ilk 24 saatte lipid peroksidasyonu ile sonuçlanan bir oksidatif strese neden olduğu, ancak bu stresin devam eden tedavi seyrinde 10. günün sonunda ortadan kalktığını göstermektedir.

Lipid peroksidasyonu şüphesiz oksijen bağımlı bir reaksiyondur, ancak paradoksal bir şekilde, HBO' nun kas reperfüzyon hasarı ve barsak reperfüzyon sendromunda oksidatif hasarı belirgin ölçüde azalttığı gösterilmiştir (185). Thom, sıçanlarda karbon monoksit intoksikasyonunda beyindeki lipid peroksidasyonunu dien konjugatlarının artışıyla belirlemiş, 2 ATA üzerindeki basınç değerlerinde uygulanan HBOT' nin lipid peroksidasyonunu azalttığını, ancak 1 ATA' da böyle bir etkinin söz konusu olmadığını ortaya koymuştur (185).

Davies ve Goldberg, eşek eritrositlerini oksidan sistemler ile inkübe ederek yaptıkları çalışmada intrasellüler proteolizis ile lipid peroksidasyonunun ayrı mekanizmalar ile gerçekleştiğini, proteolizisin iki saatte, lipid peroksidasyonunun ise, endojen koruyucu sistemler nedeniyle, dört saatten sonra başladığını, antioksidan ajanların lipid peroksidasyonlarını engelleyebildiğini ama proteolizisi etkilemediğini deneysel olarak göstermişlerdir (186).

Karbon monoksit intoksikasyonunun ardından kısa sürede içinde ya da iskemi-reperfüzyon hasarının öncesinde uygulanan HBOT' nin lipid peroksidasyonunu belirgin ölçüde azalttığı gösterilmiş, HBO' nun bu etkisinin lökosit adhezyonu üzerindeki inhibitör etkisiyle ilişkili olduğu üzerinde durulmuştur (174). Bu paradoksal etkinlikte süperoksit radikallerinin ve SOD' ın rolü olduğu düşünülmektedir. Süperoksitin lipid peroksidasyonunu antagonize edebileceği, ancak lökositlerin yokluğunda lipid peroksidasyonunda yıkıcı bir etki göstereceği hipotezi öne sürülmektedir (174). Eksojen süperoksit dismutazın yüksek ve düşük konsantrasyonları da lipid peroksidasyonundan sorumlu tutulmaktadır. Orta düzeydeki konsantrasyonları ise minimal lipid peroksidasyonu ile ilişkilidir.

Bugün için HBOT' nin neden olduğu oksidatif stresin daha çok hayvan modellerinde çalışıldığı, insanlar üzerinde sadece birkaç çalışmanın bulunduğu görülmektedir. İtalya' da Fano Hiperbarik Tedavi Merkezi' nde gerçekleştirilen bir çalışmada diyabetik ayak, kronik osteomyelit ve aseptik nekroz tanılı toplam 12 hastadan

oluşan bir grupta plazma MDA değerleri HBOT öncesi ve sonrasında ölçülmüş, tedavi sonrası değerlerde artış saptanmıştır. Bu çalışmada uygulanan 2,5 ATA, 1 saat, 15 günlük tedavi protokolünün bitiminde ölçülen MDA değerlerinin de ilk seans öncesi ve sonrası değerlerden yüksek olduğu görülmüştür (187).

HBOT' nin santral sinir sistemi ve pulmoner toksisite etkisi, oksijenin parsiyel basıncı başka bir deyişle tedavi sırasında uygulanan basınç değerleri ve maruz kalınma süresi ile ilgilidir. Bugünkü bilgilerimiz, toksik etkilerde serbest radikallerin rolünü ortaya koymaktadır.

Santral sinir sistemi toksisitesine yönelik çalışmalarda HBO uygulaması sırasında serbest radikal türevlerinin artışı in vivo ST (spin trapping) ve ESR (electron spin resonance spectroscopy) yöntemleriyle gösterilmiştir (188).

Artmış reaktif oksijen türevlerinin konvülsiyon oluşturma mekanizması eksitoksisite, metabolik disfonksiyon, intrasellüler kalsiyum homeostazisinin bozulması gibi değişik mekanizmalarla gerçekleşebilir. Bununla birlikte HBOT' nin santral sinir sistemi toksisitesinin bu mekanizmalardan hangisi yoluyla oluştuğu henüz açıklık kazanmamıştır. Yapılan son çalışmalar nitrik oksit sentaz (NOS)' ın bu olayda kritik bir rol oynadığını göstermektedir. Nitrik oksitin hiperbarik oksijenasyondaki prokonvülzan etkisinin muhtemel mekanizmaları vazodilatasyon, nörotransmitterlerin salınımının modülasyonu ve prooksidan aktivitesi ile ilişkilidir. Tüm bunlarla birlikte NOS uyarımının tekrar eden HBO uygulamalarında santral sinir sistemi toksisitesine karşı duyarlılığı arttırdığı düşünülmektedir (189).

Pulmoner oksijen toksisitesinde de serbest radikallerin etkisini gösteren çalışmalar mevcuttur. Harabin, Braisted ve Flynn, çalışmalarında HBO' nun akciğerde SOD aktivitesini arttırdığını ve akciğer ve beyinde katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinde azalmaya neden olduğunu bildirmiştir.

Topal ve arkadaşlarının sıçan akciğerlerinde HBO kaynaklı oksidatif strese eksojen melatonin uygulamasının etkilerini araştırdıkları çalışmalarında tedavi basıncı 3 ATA ve süre 2 saat olarak seçilmiştir. Bu tedavi tek seans olarak yapılmış ve ölçümler bu seans sonunda gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan 3 ATA' lık basınç değeri terapötik amaçlı uygulanan en yüksek değerdir (13, 14, 16). Bu protokole uygulanan HBO tedavisi ile, akciğer doku homojenatlarında lipid peroksidasyonunun belirgin olarak arttığı saptanmıştır. Doku homojenatlarında MDA düzeylerindeki bu artışa ek olarak SOD ve katalaz enzim aktivitelerinde de anlamlı artış tespit edilmiştir (190).

Aslında pulmoner oksijen toksisitesi hem normobarik hem de hiperbarik ortamlarda iyi tanınmaktadır. Pulmoner oksijen toksisitesinden korunmak amacıyla UPTD (Unit Pulmoner Toxic Dose) kavramı geliştirilmiştir. 1 UPTD, 1 bar basınçta 1 dakika süreyle % 100 oksijen solunumunun neden olduğu pulmoner hasarı ifade eder. UPTD değerleri ile vital kapasite değişikliklerinin korelasyonunu kuran Lambertsen' e göre, UPTD değeri 615, VK' de % 2 azalmaya, UPTD değeri 1425 % 10 ve UPTD değeri 2700 % 20 azalmaya uyar. İster normobarik ister, hiperbarik ortamda olsun oksijen solunumuyla VK' de % 10' luk bir azalma, reversibl olduğu için izin verilebilecek bir kayıptır. Bununla birlikte % 10-40 arasındaki kayıplar bile büyük olasılık ve sıklıkla reversibl olabilmektedir (41).

Klinik uygulamalara bakıldığında UPTD hesapları normal sağlıklı kişilerde yapılmış ve 1425 maksimum sınır kabul edilmiştir. Ancak bu hesaplamada devamlı maruziyet söz konusudur. Oysa HBO tedavi protokolleri devamlı değil 60, 90 dakikalık seanslar halinde Ayrıca bu tedaviler 5-10 dakikalık hava molaları ile bölünen 20 dakikalık periyotlar şeklinde uygulanır. Bu nedenle çok ağır dalış patolojileri dışında 1425 UPTD' a ulaşmaktan uzaktır (41).

Reaktif oksijen türevlerine karşı savunmada enzimatik antioksidanlar en önemli rolü üstlenmektedir. Savunma, enzimlerin aktivitesinde ve ekspresyonunda artışla gerçekleşebilmektedir.

HBO' nun organizmadaki çeşitli dokularda antioksidan mekanizmayı ne yönde etkilediği ve bu etkilerin mekanizmalarının ne olduğu gibi soruların yanıtları halen araştırılmaktadır.

Çalışmamızda HBO' nun meydana getirdiği oksidatif hasarı grup-II, III ve IV ile (10 gün süreyle ilk gün 3 seans, ikinci, üçüncü ve dördüncü gün 2 seans, kalan günlerde günde 1 seans şeklinde belirlenen protokol) ile grup-V, VI, VII (tedavinin başlangıcı olan ilk 24 saatlik (3 seans) tedavi süreci) karşılaştırmamızın temelinde de bu soru yatmakta idi.

Sorularımızın yanıtı şu şekilde oluştu:

Grup-VI (2 ATA' lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup) ile Grup-III (2 ATA' lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) arasında MDA değerleri grup-III de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu.

Grup-VII (2,4 ATA' lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup) ile Grup-IV (2,4 ATA' lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO

uygulanan grup) arasında MDA değerleri grup IV için istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu.

Bir başka deyişle, 2 ve 2,4 ATA değerlerinde uygulanan HBO tedavisinde ilk 24 saatlik periyotta kontrol grubu ile karşılaştırıldığında HBO anlamlı bir oksidatif stres yaratıyor, ancak aynı basınç değerlerinde 10 günlük tedavinin ardından 24 saatlik gruba oranla anlamlı bir azalma izlenirken, kontrol grubu ile olan anlamlılık da ortadan kalkıyordu.

Benzer şekilde,

Grup-VI (2 ATA' lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup)' da ve Grup-VII (2,4 ATA' lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup)' de plazma SOD aktivitesi düzeyi uygulanan tedavi sonrasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştı.

Grup-III (2 ATA' lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) ile Grup-VI (2 ATA' lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup) arasında ve Grup-IV (2,4 ATA' lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) ile Grup-VII (2,4 ATA' lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup) arasında plazma SOD değerleri grup-III ve grup IV için istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu.

Özetle, plazma SOD değerlerinde izlenen değişiklikler de MDA değerleri ile paralellik gösterdi.

Bu durum, HBO tedavisi sırasında ilk 24 saatte artan serbest oksijen radikallerine bağlı oksidatif stresin enzimatik düzeyde antioksidan statusu olumsuz yönde etkilediği şeklinde değerlendirildi. Ancak tedavinin ilerleyen günlerinde enzimatik düzeyde belirgin aktivite artışı izleniyor, oksidatif stresin bir göstergesi olan lipid peroksidasyon ürünleri de bu süreçte giderek azalıyordu. Yani organizmanın antioksidan savunma mekanizmalarında HBO' nun neden olduğu bu strese karşı bir adaptasyon gelişimi söz konusu idi.

Lipid peroksidasyonunun araştırılmasında ilk 24 saatlik periyotta oksidatif strese işaret eden MDA yüksekliğinin 10. günün sonunda kontrol grubu ile anlamlı bir fark oluşturmayacak düzeye inişi de bu görüşü destekledi.

İlk 24 saatteki SOD inaktivasyonu, çeşitli invivo çalışmalarda tanımlanmıştır. Escobar ve arkadaşları, SOD ve katalazın singlet oksijen ve peroksil radikalleri tarafından inaktive edilebildiğini ve benzer singlet oksijen konsantrasyonlarında her iki enzim aktivitesinin de azaldığını göstermişlerdir(187).

HBO tedavisi seyrinde ortaya çıkan oksidatif ştrese karşı adaptatif antioksidan mekanizmaların varlığını gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Gregorevic ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada 28 gün süreyle 3 ATA' da 60 dakikalık seanslar şeklinde uygulanan HBOT' nin sıçanlarda iskelet kasında SOD aktivitesini arttırdığını, katalaz aktivitesinde ise bir düşüşe neden olduğunu göstermiştir. SOD düzeylerinde tedavi sonucunda gözlenen bu artış gen transkripsiyonu ve enzim sentezindeki değişikliklerle ilgilendirilmiştir (191).

Stewart ve arkadaşları, 1994, 1995 ve 1998 yıllarında bildirdikleri çalışmalarında, hiperbarik oksijenin endojen antioksidan düzeylerini yükselttiğini, HBO ile antioksidan tedavisinin birlikte uygulanmasının ise belirgin şekilde daha başarılı sonuçlar verdiğini saptamışlardır (192).

Benedetti ve arkadaşlarının çeşitli endikasyonlarla HBO tedavisine alınan 12 hasta üzerinde gerçekleştirdikleri gözlemlerle de uyumlu görülmektedir. Bu çalışmada HBO tedavisi 2,5 ATA' da, 3 dakikalık hava molası ile ayrılmış 30 dakikalık iki periyot halinde, günde 1 seans olarak, 15 gün boyunca uygulanmış ve hastalardan birinci ve onbeşinci günlerde HBO tedavisi öncesinde ve sonrasında alınan venöz kan örneklerinde oksidatif stres ve antioksidan statusu değerlendirmeye yönelik çeşitli parametreler çalışılmıştır. Plazma ROM (Reactive oxygen metabolites) değerleri ilk seans HBO tedavisi öncesinde referans grupla aynı değerlerde ölçülürken, tedavinin bitiminde alınan örneklerde bu değerlerin anlamlı bir yükselme gösterdiği izlenmiştir. Plazma MDA değerleri de benzer şekilde yüksek bulunmuştur. Ancak çalışmada enzimatik antioksidan sistemin önemli üyelerinden olan glutatyon peroksidaz değerlerinin ilk ve 15. seans HBO tedavisi sonrasında referans gruba oranla anlamlı bir değişiklik göstermezken sistemin diğer önemli üyeleri olan SOD ve katalaz aktivitesinde her iki ölçümde de belirgin azalma olduğu bulunmuştur. Bu durum plazma MDA düzeylerindeki yükselmelerle de paralellik göstermektedir. Sonuçlar SOD ve katalazın yüksek konsantrasyondaki ROM ile inaktivasyonu şeklinde yorumlanmıştır (187).

HBO' nun genotoksisite üzerine etkilerinin araştıran Speit, 2002 yılındaki çalışmasında genç, sağlıklı gönüllülerde bir indikatör test olan comet assay yöntemi ile periferik kan hücrelerinde oksidatif DNA hasarının gerçekleştiğini, ancak mutasyon ya da kromozomal aberasyonların izlenmediğini rapor etmiştir (193). Bir diğer çalışmada ise, hem oksijenaz-I (HO-I) enziminin tekrarlanan HBO tedavileri sonrasında indüklenebildiğini ve bu olayda hidrojen peroksitin rol oynadığını ortaya koymuştur (194).

Hem oksijenaz-I, biliverdin, karbon monoksit ve serbest demir üzerine olan etkileriyle antioksidan etkinlik gösteren bir enzimdir.

Oksidatif hasara karşı organizmanın savunulmasında en önemli faktörlerden biri de mikromoleküler non-enzimatik antioksidanlardır. Peroksidan bir maddeyle inkübasyon sonucu antioksidanlardan biri olan glutatyon düzeylerinin düşmesi veya tükenmesinin oluşan hasarın daha da artmasına yol açtığı ileri sürülmüştür.

Sitoplazmik ara ürünler olan NADPH ve GSH konsantrasyonları hücrenin redoks durumunun akut değişikliğini yansıtır. NADPH/NADP ve GSH/GSSG oranlarındaki değişiklikler, akut prooksidan baskı ile antioksidan savunma arasındaki dengesizliğin belirleyicisidir. Eritrosit ve karaciğer gibi dokularda GSSG' nin küçük bir bölümü hücreler tarafından dışarı atılır. Bu miktar hidroperoksit metabolizması sırasında önemli ölçüde artmaktadır.

Oksidatif stresle birlikte glutatyon okside hale geçer. Okside glutatyon düzeylerindeki artışa paralel olarak okside olmuş proteinlere bağlı tiollerde de glutatyonla birleşik disülfid formları oluşur. Tüm bu değişikliklere sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunun artışının da eklenmesi, oksidatif stres ve hücre buna bağlı hücre hasarlanmasını getirir.

Çalışmamızda grup-VII' deki eritrosit GSH düzeyindeki azalmanın bu mekanizmalarla gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu grubun MDA değerlerinin de kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde yüksek oluşu ile, GSH' daki azalmanın MDA artışı ile paralellik gösterdiğini tespit ettik.

Gruplar arasında yapılan değerlendirmede normobarik ve 2 ATA değerlerde 24 saat ve 10 günlük değerler arasında anlamlı düzeyde bir değişiklik saptanmazken, 2,4 ATA' da 24 saatlik süreçte eritrosit GSH değerlerinin 10 günlük tedavi sonundaki değerlere oranla anlamlı ölçüde düşük olduğu izlendi.

HBO' nun özellikle tedavinin başlangıç dönemi olan akut evrede organizmada neden olduğu ve çalışmamızda da ortaya konulan oksidatif stres etkisi, tedavinin bu döneminde organizmanın antioksidan savunma sisteminin güçlendirilmesi yoluyla dengelenmeye çalışılabilir. Bu görüş, eksojen antioksidanların HBO tedavisi seyrinde kullanımı ile ilgili çalışmaların artmasında da etkili olmuştur.

Yapılan çalışmalarda E vitamini, riboflavin, selenyum ve C vitamini gibi maddeler, HBO tedavisi ile kombine edildiğinde lipid peroksidasyonu ve oksidatif hasarın azaldığına ilişkin sonuçlar elde edilmiştir (184, 190, 195, 196, 197, 198, 199, 200).

Zircle ve arkadaşları tokoferolden yoksun ve tokoferol suplementasyonu yapılmış üç grup sıçanda, tokoferol konsantrasyonu ile hiperoksijenasyona bağlı konvülsiyonların latent periyodu arasında doğru, ölüm ile ters orantı bulunduğunu saptamışlardır (196).

Jerret ve arkadaşları, HBO uygulamaları sırasında beyin dokusunda hidrojen peroksit formasyonu ve lipid peroksitleri ile konvülsiyon ilişkisini incelemişler ve tokoferolün koruyucu etkisini göstermişlerdir (197).

Yusa ve arkadaşları, 6 ATA' da oksijen uygulanan sıçanlarda konvülsiyonların latent periyodunun katalaz ve SOD verilmesiyle uzadığını, bildirmiştir (198).

Peacock ve arkadaşları, hiperbarik hiperoksiye maruz bırakılan sıçanlarda konvülsiyon ve sağkalım zamanı üzerine glutatyonun etkisini, Etlik ve arkadaşları E ve C vitamininin HBO tedavisi sırasında eritrosit membranında oluşan lipoperoksidasyona karşı ortak antioksidan etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmalar, hem glutatyon hem de tokoferol-askorbik asit kombinasyonunun koruyucu etkisinin belirgin olduğunu göstermiştir (199, 200).

Topal ve arkadaşlarının çalışmasında, keşfi yarım asıra dayanan melatoninin son yıllarda tanınan antioksidan etkisine dikkat çekilmiş, bir serbest radikal süpürücüsü olarak toksik etkilerinin de olmaması nedeniyle antioksidan olarak faydalanılabileceği fikri ortaya atılmıştır (190).

Tüm bu bulgular göz önüne alındığında, hiperbarik oksijen tedavisinin seyrinde ortaya çıkan, hem toksik hem de bazı terapötik etkilerinden sorumlu olan serbest oksijen radikallerinin bu tedavinin vazgeçilmez bir unsuru olduğu ortaya çıkmaktadır.

Reaktif oksijen metabolitlerinin hiperbarik oksijenasyondaki toksik etkileri ve subtoksik düzeydeki radikallerin yarattığı terapötik etkinliklerdeki rolü serbest radikallerin oluşum, hücrel komparmanlarla etkileşim ve moleküler düzeydeki reaksiyonlarının mekanizmalarının anlaşılması ile mümkündür.

Uygulamalarda serbest radikal oluşumunu minimal düzeyde tutacak, buna karşın maksimal tedavi edici etkinliği sağlayacak tedavi profillerinin amaçlanması önemlidir.

Endikasyon listesinde yer alan hastalıkların yapısı nedeniyle hastaların çoğunda intoksikasyon, infeksiyon, metabolik, nutrisyonel problemlerin varlığı ve sözü edilen toksik etkilerin ekarte edilebilmesi açısından antioksidan savunma mekanizmalarının güçlendirilmesine yönelik destek tedavilerin gerekliliği açıktır.

Oksidatif stres oluşturma potansiyeline rağmen, dekompresyon hastalığı, hava-gaz embolizmi, karbon monoksit intoksikasyonunda durumlarda tek başına tedavi edici

etkinliğe sahip olması nedeniyle vazgeçilmez bir tedavi yöntemi olan ve Klostridyal miyonekroz (gazlı gangren), Crush injury, kompartman sendromu ve öteki akut travmatik iskemiler, diyabetik yara, venöz staz ülseri, dekübitis ülserleri ve arteriyel dolaşım yetmezliğine bağlı ülserler, yumuşak dokunun nekrotizan enfeksiyonları, refrakter osteomiyelit, radyasyon doku hasarı, tutması kuşkulu deri greft ve flepleri, termal yanıklar ve anaerobik ve mikst beyin abseleri gibi diğer hastalıklarda önemli pozitif katkılar sağlayan hiperbarik oksijen tedavisinin dozajı yarar/zarar dengesi dikkate alınarak düzenlenmelidir.

Mevcut endikasyon listesinin genişletilmesi, bu tedavinin altta yatan mekanizmalarının anlaşılması ile mümkündür.

Bu konuda serbest radikal biyolojisinde olduğu gibi fizik, kimya, biyokimya, ortam bilim ve tıp, genetik gibi diğer bilim dallarındaki hızlı gelişmelerin takibi ve çalışmaların desteklenmesi bu sürece hız kazandıracaktır.



ÖZET

Aerobik canlıların yaşamlarını sürdürmeleri için mutlak gerekli bir element olan oksijenin metabolik faaliyetler sırasında ortaya çıkan ve serbest radikaller genel adı ile anılan toksik ürünlerinin de olması çelişkisi, organizmanın, serbest radikalleri zararlı etkilerini ortaya koyamadan etkisizleştiren güçlü savunma sistemleriyle karşılaşır.

Hiperoksik koşulların hücre ve dokulardaki toksik etkilerinin nedenleri yıllardır pekçok araştırma ve tartışmaya konu olmuştur. Hiperoksinin radikal oluşturma kapasitesi bilinmekte, ancak mekanizmaları hakkında henüz yeterli düzeyde bilgi bulunmamaktadır.

HBOT' nin klinik uygulamalarda yararlanılan birçok etkisinin ve yine bu uygulamalar sırasında karşılaşılan toksisitesinin reaktif oksijen metabolitleri ile olan direkt ilgisi, bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde çıkış noktası olmuştur.

Çalışmamızda HBOT' nin başlatıldığı ve 2 ve 2,4 ATA' lık basınç değerlerinde yoğun olarak uygulandığı (24 saatte 3 seans) VI ve VII. gruplarda plazma MDA düzeylerinde ilk yirmidört saatin sonunda kontrol grubuna göre belirlenen istatistiksel olarak anlamlı düzeylerdeki artış, HBO' nun oksidatif stres etkisini ortaya koymuş, ancak ilk yirmidört saatte aynı tedavinin uygulandığı, ikinci, üçüncü ve dördüncü gün 2 seans ve kalan günlerde günde 1 seans şeklinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca tedavinin sürdürüldüğü Grup-III ve Grup-IV' te böyle bir artış saptanmamıştır.

Yani 10 günlük tedavi protokolünün sonunda ilk 24 saatte ortaya çıkan oksidatif hasarın izleri ortadan kalkmaktadır.

Bu sonuçlar, HBO' nun organizmada ilk 24 saatte lipid peroksidasyonu ile sonuçlanan bir oksidatif strese neden olduğu, ancak bu stresin devam eden tedavi seyrinde 10. günün sonunda ortadan kalktığını göstermektedir.

Çalışmamızda, Grup-VI (2 ATA' lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup)' da ve Grup-VII (2,4 ATA' lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup)' de plazma SOD aktivitesi düzeyi uygulanan tedavi sonrasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştı.

Grup-III (2 ATA'lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) ile Grup-VI (2 ATA'lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup) arasında ve Grup-IV (2,4 ATA'lık basınç değerinde belirlenen protokolde 10 gün boyunca HBO uygulanan grup) ile Grup-VII (2,4 ATA'lık basınç değerinde 24 saatte 3 seans HBO uygulanan grup) arasında plazma SOD değerleri grup-III ve grup IV için istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu.

Bir başka deyişle, plazma SOD değerlerinde izlenen değişiklikler de MDA değerleri ile paralellik gösterdi.

Bu durum, HBO tedavisi sırasında ilk 24 saatte artan serbest oksijen radikallerine bağlı oksidatif stresin enzimatik düzeyde antioksidan statusu olumsuz yönde etkilediği şeklinde değerlendirildi. Ancak tedavinin ilerleyen günlerinde enzimatik düzeyde belirgin aktivite artışı izleniyor, oksidatif stresin bir göstergesi olan lipid peroksidasyon ürünleri de bu süreçte giderek azalıyordu.

Lipid peroksidasyonunun araştırılmasında ilk 24 saatlik periyotta oksidatif strese işaret eden MDA yüksekliğinin 10. günün sonunda kontrol grubu ile anlamlı bir fark oluşturmayacak düzeylere inmesi de bu görüşü destekledi.

Basınç altındaki oksijenin hem terapötik, hem de toksik etkilere sahip bir farmasötik ajan olması gerçeği, HBOT' nin tıpkı diğer medikal ilaçlar gibi terapötik marj ayarlaması gerektirdiğine işaret etmektedir.

Serbest radikal biyolojisi, son yıllarda pekçok hastalığın patogenezeine ışık tutması nedeniyle dikkatleri üzerine yoğunlaştırmaktadır. Bu alanda kaydedilen ilerlemeler oksijenin hücre ortamında gerçekleştirdiği reaksiyonların ve terapötik-toksik etkilerinin mekanizmalarının anlaşılmasında da önemli bir rol oynayacak gibi görünmektedir.

KAYNAKLAR

1. Del Maestro RF: An approach to free radicals in medicine and biology, *Acta Physiol Scand* 1980; 492 (suppl): 153-168
2. Kehrer JP, Smith CV: Free radicals in biology: Sources, reactivities and roles in the etiology of human disease; in Frei B (ed): *Natural Antioxidants in Human Health and Disease*, San Diego, Academic Press, pp: 25-62, 1994
3. Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans, *Free Radical Res*, 25: 57-74, 1996
4. Myers RAM: Hyperbaric oxygen therapy: A Committee Report, Undersea and Hyperbaric Medical Society Inc. USA, 1986
5. Çimşit M: Hiperbarik oksijenin kullanım alanları, *Tıbbi Ekoloji ve Hidroklimatoloji Dergisi*, Hiperbarik Oksijenasyon Özel Sayısı, Cilt: 2, Sayı: 1, s:8-15, 1984
6. Pamela S Grim MD, Lawrence J Gottlieb MD, Allyn Bodie RN, Eric Batson MD: Hyperbaric oxygen therapy, *JAMA*, April 25(16): 263, 1990
7. Davis JS, Dunn JM, Heimbach RD: Hyperbaric Medicine: Patient Selection, treatment procedures and side effects. *Problem Wounds. The role of oxygen*. Eds: Davis JS, Hunt TK, Elsevier, New York, chap: 11, 225-235, 1988
8. Çimşit M: Hiperbarik oksijen tedavisi, *Sendrom Ed: Yalman A*, Sayı: 6, 67-69, 1990
9. Davis JS, Hunt TK, Hyperbaric oxygen therapy, preface and background. Undersea and Hyperbaric Medical Society Inc. USA, 1986
10. Hammerlund C: The physiologic effects of hyperbaric oxygen, *Hyperbaric Medicine Practice*, Ed: Kindwall E, Best publishing co, 17-32, Arizona, 1995
11. Guyton AC: Gaz değişiminin fiziksel ilkeleri. *Tıbbi Fizyoloji, Textbook of Medical Physiology*, 7. Edition, Cilt I, Bölüm 40, s: 659-704, Nobel Kitabevi, 1986
12. Guyton AC: Oksijen ve Karbon Dioksit Taşınması, *Tıbbi Fizyoloji, Textbook of Medical Physiology*, 7. Edition, Cilt I, Bölüm 41, s: 705-718, Nobel Kitabevi, 1986

13. Basset BE, Bennet PB: Introduction to the physical physiological bases of hyperbaric therapy. Ed: Davis JC, Hunt TK, Undersea and Hyperbaric Medical Society Inc. Maryland, 11-24, 1977
14. Jain KK: Physical, physiological and biochemical aspects of hyperbaric oxygenation, Textbook of Hyperbaric medicine. Eds: Jain KK, Neubauer R, Correa JG, Hogrefe and Huber publishers, Toronto, 335-365, 1990
15. Edmonds C, Lowry C, Pennefather J: Hyperbaric oxygen therapy, Diving and subaquatic medicine. A diving medical center publ, Sydney, NSW, Australia, chap: 28: 493-505, 1980
16. Mader JT: Hyperbaric oxygen therapy: Acommittee report. Bethesda, Undersea and Hyperbaric Medicine Society, 1989
17. Nachum Z, Reissman P, Dolberg S, Melmed Y: Hyperbaric oxygen for purpura fulminans, Proceedings of the XVth, meeting of EUBS Eliat Israel 251-257, 1989
18. Bouchour G, Cronier P, Gouello JP, Toulemonde JL, Talha A, Alquier P: Hyperbaric oxygen therapy in the management of crush injuries: A randomized placebo controlled double blind clinical trial, J Trauma 41(2), 333-339, 1996
19. Strauss MB, Hargens AR, Gershuni DH: Reduction of skeletal muscle necrosis using intermittant hyperbaric oxygen in a model compartment syndrome, J Bone Joint Surg: 65-A(5): 656-662, 1983
20. Strauss MB: Crush injury and other traumatic peripheral ischemias, Hyperbaric Medicine Practice, Ed: Kindwall EP, Best publishing co, chap: 26, 525-549, Arizona, 1995
21. Sheffield PJ: Tissue oxygen measurements. Problem wounds. The role of oxygen. Eds: Davis JS, Hunt TK, Elsevier, New York chap: 2: 17-51, 1988
22. Hunt TK, Niinikoski J, Zederfeldt BH, Silver IA: Oxygen in wound enhancement, Cellular effect of oxygen. Hyperbaric oxygen therapy, Ed: Davis JC, Hunt TK, Undersea and Hyperbaric Medical Society Inc. Maryland, 11-24, 1977
23. Jain KK: The history of hyperbaric medicine. Textbook of hyperbaric medicine. Eds: Jain KK, Neubauer R, Correa JG, Hogrefe and Huber publishers, Toronto, chap: 1: 3-9, 1990
24. Stewart RJ, Yamaguchi KT, Mason SW, Roshdich BB, Dabashi NI, Ness VT: Tissue ATP levels in burn injured skin treated with hyperbaric oxygen, UBR.Supp. 16: 53, 1989

25. Stewart RJ, Yamaguchi KT, Mason SW, Kemp M, Madrigal M, Cianci P: Hyperbaric oxygen treatment of burn wounds, effect on ATP, phosphocreatinine and collagen synthesis in an animal model, UBR. Supp. 20: 55-56, 1992
26. Kindwall EP: A history of hyperbaric medicine, Ed: Kindwall EP, Best publishing company, Arizona, 2-16, 1995
27. Babior BM: Oxygen dependent microbial killing by phagocytes. N Eng J Med 298: 659-668, 1978
28. Rabkin JM, Hunt TK: Infection and oxygen, Problem wounds: The role of oxygen. Eds: Davis JC, Hunt TK, Elsevier Science Publ 1-16, New York, 1988
29. Park MK, Muhvich KH, Myers RA, Marzella R: Effects of hyperbaric oxygen in infectious disease. Basic mechanisms. Eds: Davis JC, Hunt TK, Elsevier Science Publ 1-16, New York, 1988
30. Park MK, Myers RA, Marzella R: Oxygen tensions and infections: Modulation of microbial growth, activity of microbial agents and immunologic responses. Cli Infec Dis 14: 720-740, 1990
31. Grim PS, Gottlieb LJ, Bodie A, Batson E: Hyperbaric oxygen therapy, JAMA, 263(16), 2216-2220, 1990
32. Enrico M Comporesi: Hyperbaric oxygen therapy: A commitee report, Underseaand Hyperbaric Medicine Society Inc, USA, 1999
33. Bakker Dj, Niinikoski J: Cronic hyperbaric oxygen therapy indications. Final report. 1st European consensus conferance on hyperbaric medicine. Reports and recommendations, Ed: Wattel F, Mathieu D, 71-86, France, 1994
34. Oriani G: Acute indications of HBO therapy: Final report. 1st European consensus conferance on hyperbaric medicine. Reports and recommendations, Ed: Wattel F, Mathieu D, 45-55, France, 1994
35. Oriani G, Michael M, Marroni A, Longoni C: Physiology and Physiopathology of Hyperbaric Oxygen; in Oriani G, Marroni A, Wattel F(eds): Handbook on Hyperbaric Medicine. Springer Verlag Berlin, 1996, pp: 18-34
36. Uysal M: Serbest radikaller, lipid peroksitleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. Klinik Gelişim 1998; 11: 336-341
37. Harabin AL, Survanshi SS, Homer CD: A test for variations in individual sensitivity to hyperbaric oxygen toxicity. UHM 1994; 21: 403-412

38. Torbati D, Church DF, Keller JM, et al: Free radical generation in the brain precedes hyperbaric oxygen –induced convulsions, *Free Rad Biol&Med*, 1992; 13: 101-6
39. Chawko M, Auker CR, Mc Carron RM: Relationship between protein nitration and oxidation and development of hyperoxic seizures. *Nitric Oxide*. 2003; 9(1): 18-23
40. Clark JM: Oxygen toxicity; in Kindwall EP (ed): *Hyperbaric Medicine Practice*. Best Publishing Comp. Flagaaff, USA, 1994, pp:33-43
41. Çimşit M: “Oksijen radikalleri ve Hiperbarik oksijen tedavisi; korkular ve gerçekler, II. Ulusal Sualtı ve Hiperbarik Tıp Toplantısı, Toplantı Kitabı, s: 63-72, İstanbul, 1999
42. De Martino G, Luchetti M, De Rosa RC: Toxic Effect of Oxygen; in Oriani G, Marroni A, Wattel F (eds): *Handbook on Hyperbaric Medicine*. Springer-Verlag Berlin, 1996, pp:215-219
43. Yıldız Ş, Aktaş Ş, Çimşit M et al, 2004
44. Andersson B: “Hyperoxic myopia” *Trans Am Ophthalmol Soc*, 1978; 7: 116-124
45. Kindwall E. Personal Communication 1998
46. Palmquist BM, Philippon B and Barr PO: “Nuclear cataract and myopia during hyperbaric oxygen therapy” *Br. J. Ophthalmol*. 1984; 68(2): 113-117
47. Camporesi EM, Mascia MF, Thom SR: Physiological Principles of Hyperbaric Oxygenation; in Oriani G, Marroni A, Wattel F (eds): *Handbook on Hyperbaric Medicine*. Springer-Verlag, Berlin, 1996, pp: 35-58
48. Thom SR, Clark JM: The Toxicity of Oxygen, Carbon Monoxide and Carbon Dioxide; in Bove AA, Davies JC (eds): *Diving Medicine*. 2nd Ed, W.B. Saunders Comp, Philadelphia, USA, 1990; 82-94
49. Penn JS, Tolman BC, Henry MM: Oxygen induced-retinopathy in the rat: Relationship of retinal nonperfusion to subsequent neovascularization. *Abstract. UHM*, 1995; 22:104
50. Torbati D, Peymen GA, Wafapoor H, Shaibani SB, Khoobehi B: Experimental retinopathy by hyperbaric oxygenation. *UHM*, 1995; 22: 31-39
51. Kobayashi T, Murakami S: Blindness of an adult caused by oxygen. *JAMA* 1972; 219: 741-742

52. Kindwall EP: Contraindications and side effects to hyperbaric oxygen treatment, Hyperbaric Medicine Practice, Second Edition Revised, Best Publishing Company, chap 5, p: 83-98, 2002
53. Kılınç K, Kılınç A: Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri, Temel Tıptan Kliniği, Hacettepe Tıp Dergisi 2002; 33(2): 110-118
54. Halliwell B: Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. Am J Med 91 (3c): 145-225, 1991
55. Halliwell B, Gutteridge JMC: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metal and disease, Biochem J, 219: 1-14, 1984
56. Halliwell B, Gutteridge JMC: Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. The Lancet June 23: 1396-97, 1984
57. Hochstein P, Atallah AS: The nature of oxidants and antioxidant systems in the inhibition of mutation and cancer, Mut Res, 202: 363-75, 1988
58. Southorn PA, Powis G: Free radical in medicine I, chemical nature and biological reactions, Mayo Clin Proc, 63: 381-8, 1988
59. Southorn PA, Powis G: Free radical in medicine II, Involvement in human disease, Mayo Clin Proc, 63: 390-408, 1988
60. Papas AM: Determinants of antioxidant status in humans. Lipids 1996; 31 (suppl): S77-S82
61. Moller P, Wallin H, Knudsen LE: Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors, Chem Biol Int 1996; 102: 17-36
62. Uysal M: "Serbest radikaller ve Lipit peroksitlerinin zararları ve organizmada prooksidan-antioksidan dengelyi etkileyen koşullar", II. Ulusal Sualtı ve Hiperbarik Tıp Toplantısı, Toplantı Kitabı, s: 44-53, İstanbul, 1999
63. Bulur H, Özdemirler G, Öz B, Toker G, Öztürk M, Uysal M: High cholesterol diet supplemented with sunflower seed oil but not olive oil stimulates lipid peroxidation in plasma, liver and aorta of rats, J Nutr Biochem, 6: 547-550, 1995
64. Tsukamoto H: Oxidative stress, antioxidants and alcoholic liver fibrogenesis. Alcohol 1993; 10: 465-467
65. Kurose I, Higuchi H, Kato S, Miura S, Ishill H: Ethanol-induced oxidative stress in liver. Alcohol Clin Exp Res 1996, 20: 77A-85A
66. Harman D: Role of antioxidant nutrients in aging: Overview, Age 1995; 18: 51-62

67. Yu BP: Aging and oxidative stress: Modulation by dietary restriction. *Free Rad Biol Med* 1996; 21: 651-668
68. Church DF, Pryor WA: Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications, *Environ Health Perspect.* 64: 111-126; 1985
69. Harman D : Aging : A theory based on free radical and radiation chemistry, *J Gerontol*, 11(1956) 298-300
70. Halliwell B and Gutteridge JMC: *Free Radicals in Biology and Medicine*, Third Edition, Oxford University Press, Oxford, 1999
71. Harman D : Aging : Overwiev, *Ann NY Acad Sci*, 928, 1-21, 2001
72. Sohal RS, Weindruch R: Oxidative stress, caloric restriction and ageing, *Science* 273 (5271), 59-63, 1996
73. Polla AS, Polla LL, Polla BS: Iron as a malignant spirit in successful ageing, *Ageing Res Rev*, 2 (1), 25-37, 2003
74. Biesalski HK: Free radical theory of ageing, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5 (1), 5-10, 2002
75. Sun Y: Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis. *Free Rad Biol and Med* 8; 583-599, 1990
76. Osada H, Takahashi T: Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer, *Oncogene* 21: 7421-7434, 2002
77. C Ceconi, A Boraso, A Cargnoni, R Ferrari: Oxidative stress in cardiovascular disease: Myth or fact?, *Arch Biochem Biophys*, 420(2), 217-221, 2003
78. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell RW: "Biyolojik oksidasyon" Harper' ın Biyokimyası: ISBN: 975-95 331-1-1, Barış Kitabevi/Appleton ve Lange, 24. Uluslar arası Baskı, 1996
79. Yenson M: Vücut moleküllerinin fonksiyonları, proksidaz işlerliği, İnsan Biokimyası, Geliştirilmiş 6. Bası, ISBN 975-486-009-2, s: 31-80, 1988
80. Ballou D, Palmer G, Massey V: Direct demonstration of superoxid anion production during by erythr cuprein, *Biochem Biophys Res Commun*, 1969; 36: 898
81. Schwartz HA: Free radicals generated by radiolysis of aqueous solutions. *J Chem Educ* 1981; 58:101

82. Wallace WJ, Houtcehens RA, Maxwell JC, Caughey WS: Mechanism of autooxidation for hemoglobins and myoglobins, *J Biophy Chem*, 1982; 257: 49-66
83. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL: Basic Pathology Temel Patoloji, altıncı edisyon ISBN 0-7216-5122-4 (W.B.S.C, Philadelphia), ISBN 975-420-044-0 (Nobel, İstanbul), 2000
84. Murray RK: Kan hücreleri, Harper' ın Biyokimyası: ISBN: 975-95 331-1-1, Barış Kitabevi/Appleton ve Lange, 24. Uluslar arası Baskı, s: 781-798, 1996
85. Cros CE, Halliwell B, Boris ET, et all: Oxygen radicals and human disease, *Annals Int Med*, 107: 526-45, 1987
86. Wetberg AB, Weitzman SA, Clark EP: Effects on antioxidants on antioxidant induce: Sister chromatid exchange formation, *J Clin Invest*, 75: 1835-7, 1985
87. Cohen G: Oxygen radicals and Parkinson' s disease, In: Oxygen Radicals and Tissue injury, pp: 130-135, Ed: Halliwell B, Federation of American Societies for Experimental Biology, Washington, 1988
88. Imlay JA; Chin SM and Linn S: Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and invitro, *Science* 240, 1302-1309, 1988
89. Halliwell B and Gutteridge JMC: Role of free radicals and catalitic metal ions in human disease: A review, *Meth Enzym* 186, 1-85, 1990
90. Yamasaki I and Piette LH: EPR spin trapping study on the oxidizing species formed on the reaction of the ferrous ion with hydrogen peroxide, *J Am Chem Soc*, 113, 7588-7593, 1991
91. Bielski BHJ: Studies of hypervalent iron, *FreeRad Biol Med*, 12, 469-477, 1991
92. Halliwell B and Gutteridge JMC: Free Radicals in Biology and Medicine, 2nd Edn, Calerandon, Oxford, 1989
93. Fenton HJJ: Oxidition of tartaric acid in presence of iron, *J Chem Soc*, 65: 899, 1984
94. Cochrane C: Mechanisms of oxidant injury of cells, *Mol Aspects Med*, 12, 137-147, 1991
95. Meshnick SR, Department of Epidemiology, University of Michigan School of Public Health, Ann Arbor, USA, *Lancet* 1994 Nov 19;344(8934):1440-2
96. Sies H: Oxidative stress II Oxidants and Antioxidants, Academic Press, London, 1991
97. Slater TF: Free radical mechanism in tissue injury, *Biochem J*, 222: 1-15, 1984

98. Bonnes D, Marie T, Guerin C, et al: Is malonaldehyde a valuable indicator of lipid peroxidation? *Biochemical Pharmacology* 44: 5: 985-988, 1992
99. Esterbauer H: Estimation of peroxidative damage *Path Biol* 44: 25-28, 1996
100. İnal ME, Kanbak G, Sunal E: Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging *Clinica Chimica Acta* 305: 75-80, 2001
101. Kasapoğlu M, Özben T: Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging *Experimental Gerontology* 36: 209-220, 2001
102. Liehr JG (Ed): Antioxidant and prooxidant properties of estrogens *J Lab Clin Med* 128: 344-345, 1996
103. Mantle D, Falkous G, Walker D: Quantification of protease activities in synovial fluid from rheumatoid and osteoarthritis cases: Comparison, with Antioxidant and Free Radical Damage Markers. *Clinica Chimica Acta* 284: 45-58, 1999
104. Richter C, Schweizer M: Oxidative stress in mitochondria. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses, 169-200, 1997
105. Sower MF, Lachance L: Vitamins and arthritis, Osteoarthritis, 25: 2: 315-332, 1999
106. Tiku ML, Shah R, Allison GT: Evidence Linking Chondrocyte Lipid Peroxidation to Cartilage Matrix Protein Degradation, *J Biol Chem*, 275: 20069-20076, 2000
107. Trevisan M, Browne R, Ram M et al... Correlates of markers of oxidative status in the general population, *American Journal of Epidemiology*, 154: 4: 348-356, 2001
108. Dhalla NS, Zhao D: Cell membrane Ca^{+2} -Mg-ATPase, *Prog Biophys Mol Biol*, 52: 1-27, 1988
109. Amirici A, Levine RL, Tsai L, Stadtman ER: Nonenzymatic metal ion-catalyzed oxidation system, *J Biol Chem*, 264: 3341-46, 1989
110. Levine AL, Gorland D, Olivier CN: Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods-Enzymol*, 186: 464-78, 1990
111. Akkuş İ: Serbest oksijen radikalleri ve Fizyopatolojik Etkileri, MIMOZA Basım Yayın ve Dağıtım, Konya, 1995, 1-20
112. Tszo JL, Dudley S, Kwak B, Nickel AE, Laine PW, Siegmund KD, Liskoy RM, Shibata D: Diet, cancer and aging in DNA mismatch repair deficient mice. *Carcinogenesis* 23(11): 1807-1810, 2002
113. Tsai DC, Hsu WM, Chou CK, Chen SJ, Peng CH, Chi CW, Holl Liu JH, Chiou SH: Significant variation of the elevated nitric oxide levels in aqueous humor from patients with different types of glaucoma. *Ophthalmologica* 216(5): 346-350, 2002

114. Dillard CJ, Tappel AL: Fluorescent products of lipid peroxidation of mitochondria and microsomes, *Lipids* 6(10): 715-20, 1971
115. Clair DK, Holland J: Complementary DNA encoding human colon cancer manganese superoxide dismutase and the expression of its gene in human cells, *Cancer Res*, 51: 939-43, 1991
116. Cros CE, Halliwell B, Borris ET et al: Oxygen radicals and human disease, *Annals Int Med*, 107: 526-45, 1987
117. Srivastava SK, Ansari NH, Liu S, et al: The effect of oxidants on biomembranes and cellular metabolism, *Mol Cell Biochem*, 91: 149-57, 1989
118. Gille JJP, Jeonje H: Cell culture models for oxidative stress: Superoxide and hydrogen peroxide versus normobaric hyperoxia, *Mut Res*, 275: 405-14, 1992
119. Smith MAC, Bortolado MKH, Melaragno MI, Neto ST: Investigation of the effect of hydrogen peroxide on the chromosomes of young and elderly individuals, *Mech Age Dev*, 56: 107-115, 1990
120. Halliwell B, Aruoma O: DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurements in mammalian systems, *FEBS Lett*, 281 (1991), 9-19
121. Wiseman H, Halliwell B: Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role in inflammatory disease and progression to cancer, *Biochem J*, 313 (1996), 17-29
122. Denq R, Fridovich I: Formation of endonuclease III sensitive sites as a consequence of oxygen radical attack on DNA, *Free Rad Biol Med*, 6: 120-126, 1989
123. Gifford GD: Mutation of an auxotrophic strain of *Escherichia coli* by high pressure oxygen, *Biochem Biophys Res Commun*, 1968; 33: 294-298
124. Hassan HM, Fridovich I: Superoxide radical and the oxygen enhancement of the toxicity of paraquat in *Escherichia coli*, *J Biol Chem*, 1978; 253: 8143-8148
125. Moody CS, Hassan HM: Mutagenicity of oxygen free radicals, *Proc Natl Acad Sci*, 1982; 79: 2855-2859
126. Tappel AL: Lipid peroxidation damage to cell components, *Fed Proc*, 32: 1870-4, 1973
127. Halliwell B, Chirico S: Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement and significance, *Am J Clin Nutr* 1993; 57(suppl): 715S-725S

128. Sorg O: Oxidative stress: A theoretical model or a biological reality? Article Press, Comptes Rendus Biologies, P.1 (1-14), Geneve, Switzerland, 2004
129. Halliwell B and Gutteridge JMC: Free radicals in biology and medicine, Oxford: Calerandon, 1996
130. McCord JM, Fridovich I: Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein), J Biol Chem, 244: 6049-6055, 1969
131. Sherman L, Levanon D, Lieman-Hurwitz J, Dafni N, Groner Y: Human Cu/Zn superoxide dismutase gene: molecular characterization of its two mRNA species, Nucleic Acids Res, 12: 9349-9365, 1984
132. Wan XS, Devalaraja MN, StClair DK: Molecular structure and organization of human manganese superoxide dismutase gene, DNA Cell Biol, 13: 1127-1136, 1994
133. Church SL: Manganese superoxide dismutase: nucleotide and deduced amino acid sequence of a cDNA encoding a new human transcript, Biochim Biophys Acta, 1087: 250-252, 1990
134. Marklund SL: Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight, Proc Natl Acad Sci USA, 79: 7634-7638, 1982
135. Enghild JJ, Thøgersen IB, Oury TD, Valnickova Z, Hojrup P, Crapo JD: The heparin binding domain of extracellular superoxide dismutase is proteolytically processed intracellularly during biosynthesis, J Biol Chem, 274: 14818-14822, 1999
136. Hendrikson DJ, Fisher JH, Jones C, Ho YS: Regional localization of human extracellular superoxide dismutase gene to 4pter-q21, Genomics, 8: 736-738, 1990
137. Perinandi NL, Thompson W, Schmid HHO: Diabetic heart and kidney exhibit increased resistance to lipid peroxidation Biochim Biophys Acta, 1047: 63-9, 1990
138. Yoshimura S, Suemizu H, Taniguchi K, et al: The human plasma glutathione peroxidase encoding gene: Organization sequence and localization to chromosome 5q32, Gene, 145: 293-297, 1994
139. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell RW: "Pentoz fosfat yolu ve heksoz metabolizmasının diğer yolları" Harper' ın Biyokimyası: ISBN: 975-95 331-1-1, Barış Kitabevi/Appleton ve Lange, 24. Uluslar arası Baskı, 1996
140. Kiechle FL, Malinski T: Nitric oxide: Biochemistry, pathophysiology and detection, AML Clin Pathol, 100: 567-575, 1993

141. Halliwell B, Gutteridge JM: Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxydant therapy, *The Lancet*, 23(June): 1396-1397, 1984
142. Farooqui MY, Ahmed AE: Circadien periodicity of tissue glutathione and its relationship with lipid peroxidation in rats, *Life Sci*, 34: 2413-18, 1984
143. Prohoska E: Glutathione peroxidase activity of Glutathione-S-Transferases, *Biochim Biophys Acta*, 611: 87-98, 1980
144. Shan X, Aw TY, Jones DP: Glutathione dependent protection against oxidative injury, *Pharmac Ther*, 47: 61-71, 1990
145. Berger SJ, Gosky D, Zberowska E, et all: Sensitive enzymatic cycling assay for glutathione, *Cancer Res*, 54: 4077-83, 1994
146. Mayes PA: Yağda çözünür vitaminlerin çatı ve işlevi, Harper' ın Biyokimyası: ISBN: 975-95 331-1-1, Barış Kitabevi/Appleton ve Lange, 24. Uluslar arası Baskı, s: 781-798, 1996
147. Rouach H, Fataccid V, Gyentil M, et all: Effect of chronic feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology, *Hepatology*, 25: 351-55, 1997
148. Yoshida K, Hirokawa S, Tagami S, et all: Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus, *Diabetologia*, 38: 201-10, 1995
149. Aydın Z: Antioksidan sistemler, II. Ulusal Sualtı ve Hiperbarik Tıp Toplantısı, Toplantı Kitabı, ISBN 975-7958-26-3, Turgut Yayıncılık ve Ticaret AŞ, İstanbul, 2000
150. Mayes PA: Suda çözünür vitaminlerin çatı ve işlevi, Harper' ın Biyokimyası: ISBN: 975-95 331-1-1, Barış Kitabevi/Appleton ve Lange, 24. Uluslar arası Baskı, s: 781-798, 1996
151. Meister A: Selective modification of glutathione metabolism, *Science*, 220: 472-6, 1983
152. Anderson ME, Meister A: Glutathione monoesters, *Anal Biochem*, 183: 16-20, 1989
153. Meister A: Glutathione, Ascorbate and cellular protection, *Cancer Res* , 54: 1969-75, 1994
154. Dormandy TL: An approach to free radical, *The Lancet*, 29: 1010-1011, 1983
155. Reiter RJ: Pineal melatonin: Cell Biology of Its Synthesis and Its Physiological Interactions, *Endocrine Reviews*, 12(2): 151-80, 1991

156. Hardeland R, Balzer I, Poeggeler B, Fuhrberg B, Uria H, Behrmann G, Wolf R, Meyer TJ, Reiter RJ: On the Primary Function of Melatonin in Evolution: Mediation of Photoperiodic Signals in a Unicell, Photooxidation and Scavenging of Free Radicals, *J Pineal Res*, 18: 104-11, 1995
157. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Karbownik M, Calvo JR: Significance of Melatonin in Antioxidative Defense System: Reactions and Products *Biol Signals Recept*, 9: 137-59, 2000
158. Pappolla MA, Chyan YJ, Poeggeler B, Frangione B, Wilson G, Ghiso J, Reiter RJ: An Assessment of the Antioxidant and Anti-amyloidogenic Properties of Melatonin: Implications for Alzheimer's Disease, *J Neural Transm*, 107: 203-31, 2000
159. Reiter RJ, Carneiro RJ, Oh CS: Melatonin in Relation to Cellular Antioxidative Defence Mechanisms, *Horm Metabol Res*, 29: 363-72, 1997
160. Reiter RJ: Oxidative Damage in the Central Nervous System: Protection by Melatonin, *Prog Neurobiol*, 56: 359-84, 1998
161. Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ: Melatonin: A potent endogenous Hydroxyl Radical Scavenger, *Endocrine J*, 1: 57-60, 1993
162. Cuthbert JA. Wilson's disease : update of a systemic disorder with protean manifestations. *Gastroenterol Clin North Am*, 27: 655-681, 1998
163. Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I: Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion oxidative stress, *Progress in Lipid Research* 43 (2004), 200-227
164. Spitz DR, Oberley LW: *Anal Biochem* 1989, 179: 8-18
165. Flohe L, Gunzler WA: *Methods Enzymol* 1984, 105: 114-21
166. Aebi H: *Methods Enzymol* 1984, 105: 121-6
167. Buege JA, Aust SD: Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 12:302-310, 1978
168. Sun Y, Oberley LW, Li YA: Simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*. 34 (3): 497-500, 1988
169. Beutler E, Duran O and Kelly BM: Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 61: 882-888, 1963
170. Frankel S, Reitman S & Sonnenwirth AC (1974) Hemoglobin In: *Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis*, 7th ed, edited by JD Bauer, The CV Mosby Company, Saint Louis, US, pp: 403-404

171. Kindwall EP: Effects of hyperbaric oxygen in infectious disease: Basic mechanism, Hyperbaric Medicine Practice, Second Edition Revised, Best Publishing Company, chap 10, p: 205-245, 2002
172. Park MH, Muhvich KH, MyersRAM, Marzerella L: "Hyperoxia prolongs the aminoglycoside-induced postantibiotic effect in *Pseudomonas aeruginosa*" Antimicrob Agents Chemother, 1991; 35: 691-695
173. Thom SR, Mendiguren I, Hardy K, Bolotin T, Fisher D, Nebolon M, and Kilpatrick L: Inhibition of human neutrophil β_2 -integrin-dependent adherence by hyperbaric O₂, Am J Physiol, 1997, 272: C770-7
174. Hink J, Jansen E: Are superoxide and/or hydrogen peroxide responsible for some of the beneficial effects of hyperbaric oxygen therapy? Medical Hypotheses (2001), 57(6), 764-769
175. Demchenko IT, Boso AE, Bennett PB, Whorton AR, Piantodosi CA: Hyperbaric oxygen reduces cerebral blood flow by inactivating nitric oxide, Nitric Oxide: Biology and Chemistry, Vol 4, No: 6, pp: 597-608, 2000
176. Murrell GA, Francis MJ, Bromley L: Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals, Biochem J, 1990, 265(3): 659-665
177. Yasuda M, Ohzeki Y, Shimizu S, et al: Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells, Life Sci 1999, 64(4)
178. Heinloth A, Heermier K, Raff U, Wanner C, Galle J: Stimulation of NADPH oxidase by oxidized low-density lipoprotein induces proliferation of human vascular endothelial cells [In Process Citation], J Am Soc Nephrol 2000, 11(10): 1819-1825
179. Monte M, Davel LE, de Lustig ES: Inhibition of lymphocyte-induced angiogenesis by free radical scavengers, Free Radic Biol Med 1994; 17(3): 259-266
180. Chavko M, Harabin AL: Regional lipid peroxidation and protein oxidation in rat brain after hyperbaric oxygen exposure. Abstract. Free Radic Biol Med 1996; 20: 973-978
181. Sinet PM, Heikkila RE, Cohen G: Hydrogen peroxide production by rat brain in vivo. J Neurochem 1980; 34: 1421-1428
182. Giulivi C, Lavagno CC, Lucasoli F, Bermudez JMN, Boveris A: Lung damage in paraquat poisoning and hyperbaric oxygen exposure: Superoxide-mediated

- inhibition of phospholipase A₂, *Free Radical Biology and Medicine*, 18(2): 203-13, 1995
183. Cornelissen J, Van Kuilenburg ABP, Van der Kleij ADJ, VoutePA, Van Gennip AH: Hyperbaric oxygen enhances the effects of MIBG on energy metabolism and lipid peroxidation in the human neuroblastoma cell line SK-N-BE (2C), *Anticancer research*, 17: 259-264, 1997
 184. Tao H, Lei C, Li W, Li M: Oxygen toxicity under different ATA- An experimental study, *Proceedings of the Eleventh International Congress on Hyperbaric Medicine*, Sec: Cramer FS, San Francisco, California, USA
 185. Kindwall EP: The physiologic effects of hyperbaric oxygenation, *Hyperbaric Medicine Practice*, Second Edition Revised, Best Publishing Company, chap 3, p: 37-69, 2002
 186. Davies KSA, Goldberg AL: Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *J Biol Chem* 1987; 17: 8220-8226
 187. Benedetti S, Lamorgese A, Piersantelli M, Pagliarani S, Benvenuti F, Canestrari F: Oxidative stress and antioxidant status in patient undergoing prolonged exposure to hyperbaric oxygen, *Clinical Biochemistry*, 37(2004), 312-317
 188. Torbati D, Church DF, Keller JM, Pryor WA: Free radical generation in the brain precedes hyperbaric oxygen-induced convulsions, *Free Radicals Biology Medicine* 13 (1992), 101-106
 189. Chavko M, Xing G, Keyser DO: Increased sensitivity to seizures in repeated exposures to hyperbaric oxygen: Role of NOS activation, *Brain Research*, 900 (2001), 227-233
 190. Topal T, Oter S, Korkmaz A, Sadir S, Metinyurt G, Korkmazhan ET, Serdar MA, Bilgiç H, Reiter RJ: Exogenously administered and endogenously produced melatonin reduce hyperbaric oxygen-induced oxidative stress in rat lung, *Life Sciences*, 75 (2004), 461-467
 191. Gregorevic P, Lynch GS, Williams DA: Hyperbaric oxygen modulates antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscles, *European Journal of Applied Physiology*, Springer-Verlag, 2001

192. Stewart RJ, Yamaguchi KT, Lee SM, Stefonacci H, Clark H, Mello G, Mercady C: The effect of hyperbaric oxygen on endogenous levels of superoxide dismutase and catalase. Abstract, UHMC, 1998; Supp to 25: 53
193. Speit G, Dennog C, Radermacher P, Rothfuss A: Genotoxicity of hyperbaric oxygen, *Mutation Research*, 512 (2002), 111-119
194. Speit G, Rothfuss A: Investigations on the mechanism of hyperbaric oxygen (HBO)-induced adaptive protection against oxidative stress, *Mutation Research*, 508 (2002), 157-165
195. Shang F, Gong X, Egtesadi S, Meydani M, Smith D, Perrone G, Scott L, Blumberg JB, Taylor A: Vitamin C hyperbaric-induced growth retardation and lipid peroxidation and attenuates the oxidation-induced up-regulation of glutathione in guinea pigs, *J Nutr Biochem*, 13: 307-13, 2002
196. Zircle LG, Mengel CE, Horton BD, Duffy EJ: Studies of oxygen toxicity in the central nervous system. *Aerospace Med*, 1965; 36: 1027-1032
197. Jerret SA, Jefferson D, Mengel CE: Seizures, H₂O₂ formation and lipid peroxides in brain during exposure to oxygen under high pressure, *Aerospace Med* 1973; 44: 40-44
198. Yusa T, Crapo JD, Freeman BA: Inhibition of CNS oxygen toxicity by liposome-mediated augmentation of brain antioxidant enzyme activity; in Kindwall EP (ed): *Proceeding of the Eight International Congress on Hyperbaric Medicine*. Best Publishing Company, San Pedro, California, USA, 1987, pp: 57-61
199. Peacock MD, Schenk DA, Lawrence RA, Morgan JA, Jenkinson SG: Elimination of glutathione-induced protection from hyperbaric hyperoxia by acivacin, Abstract, *J Appl Physiol*, 1994, 76: 1279-1284
200. Etlik O, Tomur A, Dündar K, Erdem A, Gündoğan NU: The effect of antioxidant vitamins E and C on lipoperoxidation of erythrocyte membranes during hyperbaric oxygenation, Abstract, *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 1997, 8: 269-277