

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
ANKARA HASTANESİ
BİYOKİMYA VE KLİNİK BİYOKİMYA LABORATUVARI
Şef : Dr. Fuat BİNGÖL

**DENEYSEL SODYUM-SELENİT KATARAKTLI RATLARDA
AMİLORİD TEDAVİSİNİN LENS PEROKSİDATİF HASARI
İLE SODYUM, POTASYUM VE KALSİYUM DÜZEYLERİNE
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Nermin ÇELEBİ

Ankara 1997

ÖNSÖZ

Biyokimya ve Klinik Biyokimya ihtisasım süresince bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen Sayın Hocam Şef Dr. Fuat BİNGÖL'e, asistanlık eğitimimin yanısıra tezimin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı sayın Doç. Dr. Selvin AYDIN'a ;

Tez materyallerimin sağlanmasında ve hazırlanmasında yardımlarından dolayı Prof. Dr. Belma TURAN, Doç. Dr. Emine DEMİREL YILMAZ ve Uzman Dr. Gürsel YILMAZ'a ;

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma ve tüm Biyokimya personeline ;

Beni bugünlere ulaştıran aileme, her zaman yanımda olan sevgili eşim Cihan ÇELEBİ'ye

Teşekkür ederim.

Dr. Nermin ÇELEBİ

İÇİNDEKİLER

I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
1. Lens ve Katarakt Oluşumu	3
a) Lens Fizyolojisi	3
b) Lenste Antioksidan Sistemler	5
c) Sıvı-Elektrolit Transportu ve Ca^{+2} Homeostazisi	8
d) Katarakt Patogenezinde Oksidasyon ve Ca^{+2} 'un Rolü	9
2. Serbest Radikaller	13
a) Tanımları	13
b) Radikal Oluşumu	14
c) Hücre Hasarındaki Rollerini	17
3. Lipid Peroksidasyonu	23
4. Peroksidatif Hasara Karşı Koruyucu Sistemler	26
5. Glutasyon ve Serbest Radikal Hasarından Koruyucu Etkinliği	31
6. Membran Transport Sistemleri	33
a) Hücre Membranlarının Yapısı	33
b) Membran Transportu	34
7. Amilorid	38
III. MATERYAL VE METOD	40
IV. BULGULAR	46
V. TARTIŞMA	54
VI. ÖZET	59
VII. İNGİLİZCE ÖZET	61
VIII. KAYNAKLAR	63

I. GİRİŞ

Son 20 yılda katarakt, ateroskleroz, romatizmal hastalıklar, artritler, Parkinson hastalığı, reperfüzyon hasarları gibi pek çok hastalık ile serbest oksijen radikalleri arasındaki ilişki gösterilmiştir¹. Bu hastalıklarda görülen inflamasyon, ateş, şok gibi stresler de hücrel antioksidan sistemlerin indüksiyonuna karşı koyarak oksijen türlerinin aktivasyonlarına aracılık ederler¹.

Serbest oksijen radikallerinin oluşumu hücre için ciddi bir tehdittir. Serbest radikaller hücrede birçok otooksidasyon reaksiyonu ve enzim katalizli reaksiyonlar sonucu oluşarak, hücrel komponentlerin ve özellikle hücre membranında fazla miktarda bulunan doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olurlar².

Çeşitli oküler patolojiler ve hastalıklarda da serbest oksijen radikallerinin etkisi çalışmakta ve antioksidanların tedavideki yerine sık sık değinilmektedir^{3, 4}. Serbest oksijen radikalleri çeşitli oküler dokularda gösterilmiştir³. Yine oküler dokular koruyucu antioksidan sistemleri de içermektedir. Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz, katalaz gibi antioksidan enzimler ile askorbik asit, karotenoidler, vitamin E gibi antioksidan vitaminler gözde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır^{3, 4, 5, 6, 7, 8}.

Lens saydamlığının kaybolması olarak tarif edilen kataraktın patojenezinde serbest oksijen radikallerinin rolü olduğu gösterilmiştir. Katarktlı lenslerde elektron spin rezonans ile serbest radikaller saptanmış ve kataraktlı lenste hidrojen peroksit (H_2O_2) seviyelerinde belirgin artış gösterilmiştir. Serbest radikal üreten ajanlar olan ultraviyole ışık, X ışınları, hiperbarik oksijen ve fotosensitif kimyasallar kataraktojenik etkilidirler⁹.

Antioksidan sistemin önemli bir elemanı olan glutatyon lenste yüksek miktarda bulunur ve sadece % 6.8'i okside formdadır. Redükte glutatyonun başlıca görevi lense oksidatif hasara karşı korumaktır. Redükte glutatyonun azaldığı, okside glutatyonun arttığı durumlarda oksidan etki ve kataraktojenik etkinin arttığı, Na^+ - K^+ -ATPaz pompasının aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir¹⁰.

Bu çalışmanın amacı, hem Na-selenit verilerek katarakt oluşturulan rat lenslerinde yüksek doz selenyumun oksidatif etkisini, hem de Na^+ - Ca^{2+} exchanger blokleri olan amilorid tedavisinin kataraktı önleyici etkisi olup olmadığını araştırmaktır. Katarakt ve tedavi gruplarında, peroksidatif hasarın göstergesi olarak lipid peroksidasyon ürünü malondialdehit (MDA), lenste antioksidan sistemin en önemli elemanı olan redükte glutatyon (GSH) ve katarakt patogenezinde rol oynayan lens membran transport sistemlerinin göstergesi olarak Na^+ , K^+ ve Ca^{2+} düzeyleri çalışılmıştır.

II. GENEL BİLGİLER

II.1. LENS VE KATARAKT OLUŞUMU

II.1.a. Lens Fizyolojisi

Lens, iris ile vitreus arasında zonülalar ile asılı duran, pupilladan göze giren ışığı kırarak retina üzerine odaklayan optik bir yapıdır. Lensin başlıca fonksiyonları :

1. Refraktif gücü ile gözün optik sisteme katkıda bulunmak,
2. Akomodasyon yapmak,
3. Ultraviyole ışınlarını absorbe etmek,
4. Kendi saydamlığını korumaktır^{11, 12, 13}.

Bikonveks disk şeklindeki lensin ön kısmı ön kutup, perifer kısmı ekvator ve arka bölgesi arka kutup olarak adlandırılır. Ön ve arka kutup geometrik olarak lensin optik aksını oluşturur^{11, 12}.

Lens kapsül, korteks ve nükleus olarak üç komponentten oluşur. Dış yüzeyi kapsülle sarılıdır. Kollajen benzeri glikoprotein yapısında olan lens kapsülü yapısal bütünlüğü sağlar ve metabolik bariyer olarak görev yapar. Ön kapsülün altında epitelyal hücre katı bulunur. Ekvatora yakın epitelyal hücreler çoğalarak arka kutup yönüne doğru uzarlar ve lens fibrillerini oluştururlar. Merkezdeki yaşlı fibriller nükleusu, çevresindeki genç fibriller korteksi oluşturur^{11, 12}.

Sinir ve damar içermeyen bir doku olan lensin beslenmesi çevresindeki sıvı yapılar olan humor aköz ve vitreustan sağlanır^{11, 12, 13}.

Lens epitelı tek sıra küboidal hücrelerden oluşur, metabolik aktivitenin en yüksek olduğu bölgedir. Hücre sitoplazmaları çok sayıda mitokondri, golgi cihazı, endoplazmik retikulum, serbest ribozomlar ve mikrotübüller gibi hücre organellerini içerir. Glukoz ve O₂ lens epitelı tarafından kullanılır. ATP ve enzimler en fazla bu bölgede bulunur^{10, 11, 12}.

Lens fibrilleri arasında “gap junction” denilen apozisyonel boşluklar bulunur. Ekstrasellüler bölgeyi oluşturan bu boşluklar çok küçüktür ve lens hacminin sadece % 5’ini oluşturur. “Gap junction”lar derin ve yüzeyel fibriller arasında iyonların ve küçük metabolitlerin serbest diffzyonunu sağlar^{11, 12}.

Yetişkin insan lensleri yaklaşık % 66 su ve % 33 protein içerir. Lens hidrasyonu, her bir lens fibrili ve lens epitelindeki hücre membranlarında bulunan transport sistemleri tarafından korunur. Lens total ağırlığının % 33’n oluşturan proteinlerin % 85’i suda eriyebilir (solubl), % 15’i ise eriyemez (insolubl) yapıdadır. Albuminoid olarak isimlendirilen insolubl proteinler daha çok nükleusta, solubl proteinler ise kortekste ge fibrillerin membranlarında yer alır¹¹.

Lens proteinlerinin % 85’i kristalin adı verilen lense spesifik proteinlerden oluşur. Solubl yapıda olan bu proteinler lens saydamlığının temelini oluştururlar. Nükleustaki lens fibrillerinde bulunan nükleer kristalinler lensin en yaşlı proteinleridir. Bu kristalin proteinlerde yaşlanmayla meydana gelen yapısal değişiklikler lenste işık saçılması ve opasiteye neden olarak katarakt gelişiminde rol oynar. Kristalinler elektriksel alanlarına göre üç ana gruba ayrılır : α-kristalin (% 15), β-kristalin (% 55) ve γ-kristalin (% 15). Yaşlanma sürecinde ve katarakta albuminoid fraksiyonu artarken, α-kristalin azalır^{11, 12, 13}.

Solüt kompartmanın diğer önemli elemanı da lipidlerdir, lens kuru ağırlığının % 3-5'ini oluştururlar. İnsan lensindeki lipidlerin yaklaşık % 50'si kolesterol, % 45'i fosfolipid ve % 5'i sfingolipidler ve seramididir. Lipidler lens fibril membranlarının ana komponentidir ve sentezindeki azalma veya degradasyonundaki artma membran hasarına ve lens opasitesine neden olur¹¹.

Lens, kan damarı içermeyen bir doku olduğu için beslenmesi ve son ürünlerinin atılımı humor aköz yoluyla olur. Enerji üretimi için metabolize edilen primer substrat glukozdur. Humor aköz ve vitreustan insülinde bağımsız olarak diffüzyonla lens içine giren glukoz 4 yolla metabolize olur :

1. Anaerobik glikoliz (% 80),
2. Sitrik asit siklusu ve oksidatif fosforilasyon (% 5),
3. Heksoz monofosfat şantı (% 15),
4. Sorbitol yolu¹¹.

Heksoz monofosfat şantı lenste oldukça aktiftir. Bu yolla ATP üretilemez, fakat oluşan pentoz şekerler ribonükleik asit sentezinde kullanılır. Yine bu yolda oluşan NADPH ise glutatyonun redükte formda tutulmasında kullanılır¹¹.

II.1.b. Lenste Antioksidan Sistemler

Lens proteinlerini oksidasyona karşı koruyan glutatyon ve metabolizmanın oksidasyon reaksiyonlarına H⁺ donörü olarak katılan askorbik asit lenste yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Glutatyon humor aköze göre lenste 1000 kat daha fazladır. Lens glutatyonunun çoğu redükte, sadece % 6.8'i okside formdadır. Lenste glutatyon

sentezi için gerekli enerji, ATP'den sağlanır. Lenste total ATP'nin yaklaşık % 12'si glutatyon sentezi için kullanılır^{6, 10, 11, 14}.

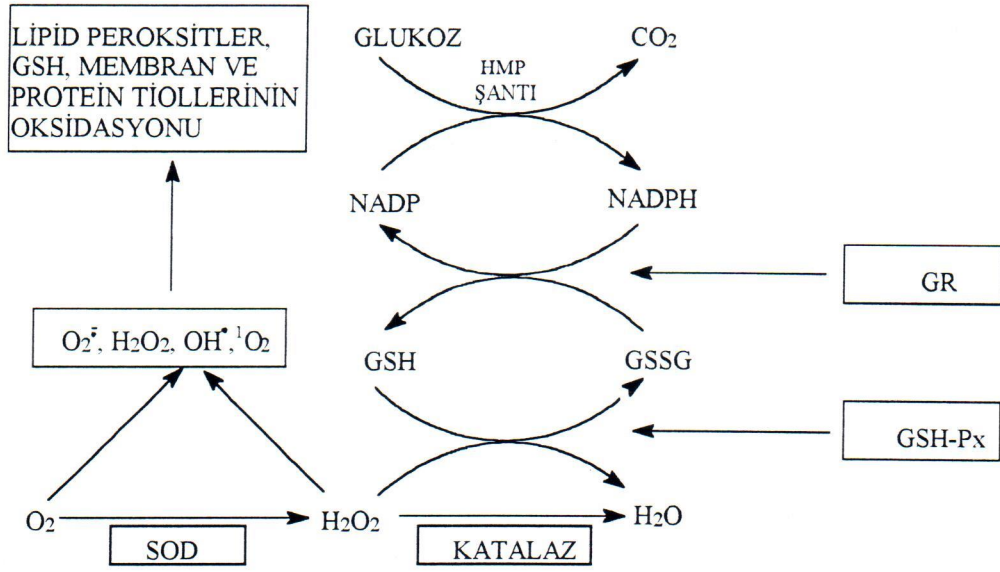
Redükte glutatyonun lenste üç ana fonksiyonu vardır. Birincisi, protein tiollerinin redükte durumunun sürdürülmesidir. Böylece lens opasifikasyonu ve ışığın saçılmasına temel oluşturan yüksek moleküler ağırlıklı protein agregatlarının oluşumunu önler. İkincisi, katyon transportu ve permeabilitede önemli olan membran -SH gruplarının korunmasıdır. Üçüncü fonksiyonu ise H₂O₂ ve diğer organik peroksitlerin detoksifikasyonudur¹⁰.

GSH'un lenste önemli fonksiyonlarından biri protein tiol gruplarının korunmasıdır. Böylece GSH insolubl proteinlerin oluşumunu ve solubl kristalinin çapraz bağlanmasını önler. Yapılan çalışmalar katarakt oluşumu sonucu lens GSH düzeyinde düşme olurken, insolubl yüksek moleküler ağırlıklı (HMW) protein içeriğinde önemli bir artış olduğunu göstermiştir. Yine bu HMW proteinlerde yapılan analizlerde -SH gruplarının % 50'sinin okside durumda olduğu ve kovalan disülfid bağlarının oluştuğu saptanmıştır. GSH'un rolü mikst disülfitlerin oluşumunu, protein tiollerinin çapraz bağlanmasını ve protein agregasyonunu önlemektir^{10, 15}.

Lens epitelyal hücrelerinde bulunan GSH membran permeabilitesinde ve katyon transportunda etkili olan -SH gruplarını korur. Hücrede GSH düzeylerinin azalması sonucu -SH içeren bir enzim olan Na⁺, K⁺-ATPaz inaktive olur. Enzimin yapısında disülfid bağlarının oluşumuna bağlı olarak konformasyonel değişiklik meydana gelir. Yapılan araştırmalar tersiyer bütül hidroperoksit ile GSH'un oksidasyonu sonucu Na⁺, K⁺-ATPaz'ın irreversibl olarak inhibe olduğunu göstermiştir^{10, 15}.

Glutasyon peroksidaz, glutasyon redüktaz ve glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimleri oküler dokularda oksidatif stresin artışına cevap olarak, reaktif oksijen türlerine karşı dirençte rol oynarlar. GSH, GSSG'a okside olurken, aktivitesi için selenyum (Se)'a ihtiyaç duyan glutasyon peroksidaz, ortamdaki H_2O_2 'i uzaklaştırır. Oluşan okside glutasyon, glutasyon redüktaz enzimi ile GSH'a çevrilir. Bu reaksiyonlar glutasyon redoks siklusunu oluşturur^{6, 16}.

Lenste serbest radikaller ve diğer oksidan ajanların oluşturduğu oksidatif hasardan korunmada GSH dışında mekanizmalar da vardır. Lenste süperoksit radikali, hidroksil radikali, singlet oksijen gibi serbest radikaller ; iyonize radyasyon, ultraviyole ve görünür ışığın ürünü olduğu kadar, moleküler O_2 'den de kaynaklanabilir. Bunların bir kısmı GSH tarafından direkt olarak ortadan kaldırılır. SOD enzimi süperoksit radikalini H_2O_2 'e dönüştürür. Lenste katalaz enzimi de mevcuttur ve H_2O_2 ile reaksiyona girerek su ve moleküler O_2 oluşturur. Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda gözde fizyolojik H_2O_2 konsantrasyonlarında glutasyon peroksidazın katalazdan çok daha önemli olduğu ortaya çıkmıştır. Glutasyon peroksidaz katalaz ile H_2O_2 substratını paylaşırken, tek başına efektif olarak lipid ve diğer organik hidroperoksitlerle reaksiyona girer. Böylece organik peroksitlerin ortadan kaldırılması ve onarım mekanizmalarında rol alır (Şekil-1)^{10, 16}.



Şekil-1 : Lenste antioksidan enzimler¹⁰.

GR : Glutasyon redüktaz, GSH Px : Glutasyon peroksidaz, SOD : Süperoksit dismutaz.

II.1.c. Lenste Sıvı-Elektrolit Transportu ve Ca⁺² Homeostazisi

Lens diğer vücut hücrelerine benzer şekilde yüksek K⁺, düşük Na⁺ ve Cl⁻ konsantrasyonuna sahiptir. Lensle, ekstrasellüler sıvı yapısında olan humor aköz arasında bir konsantrasyon gradienti ve elektriksel potansiyel farkı söz konusudur. Lens kapsülü ile lens dışı ortam arasında -64 ile -78 mV'luk bir potansiyel farkı vardır. Lensin ön ve arka yüzleri arasında da -23 mV'luk potansiyel farkı bulunur ve lens içindeki elektrolit dengesi bu elektriksel gradiente göre oluşur¹¹.

Birçok katarakt tipinde ve bizim oluşturduğumuz Na-selenit katarakt modelinde lens epiteli ve fibrillerinde artan Ca⁺² konsantrasyonu katarakt oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Na-selenit kataraktının mekanizmasının açıklanmasında lens Ca⁺² regülasyonunda rol oynayan mekanizmalar önemlidir. Lens saydamlığının korunması için hücre içi düşük Ca⁺² konsantrasyonunun kritik rolü olduğu tespit edilmiştir^{11, 17, 18, 19, 20}.

Lens epitel hücrelerinin sitoplazmik membranında Na^+ , K^+ pompası ve Na^+ , K^+ -ATPaz enzimi yoğun şekilde bulunmaktadır. Bu pompa konsantrasyon ve elektriksel gradient yönünde lens içine giren Na^+ 'un dışarı atılmasını ve K^+ 'un lens içine alınmasını sağlar. Lens sitoplazmik membranında ayrıca nonspesifik katyon kanalları tespit edilmiştir. Ca^{+2} 'un lens epitel hücrelerine girişi bu kanallar yolu ile, hücre içi ve dışı konsantrasyon gradientine göre meydana gelir. Konsantrasyon gradientinin sürdürülmesi plazma membranında lokalize olmuş Ca^{+2} -ATPaz'ın etkisi ile hücre içinden aktif transport ile Ca^{+2} 'un dışarı pompalanması ve Na^+ gradientinin varlığında çalışan Na^+ - Ca^{+2} antiport sisteminde Na^+ - Ca^{+2} değişimi ile sağlanır¹⁷.

İn vitro olarak intakt lenslerde yapılan çalışmalarda Ca^{+2} homeostazisine katkıda bulunan bileşimler Na^+ , K^+ -ATPaz, Ca^{+2} -ATPaz ve Na^+ gradientinin varlığında Na^+ - Ca^{+2} değişimi olarak saptanmıştır. Na^+ - Ca^{+2} değişimi rat lenslerinde gösterilmiştir. Sağlam Na^+ - K^+ pompası varlığında Na^+ - Ca^{+2} değişimi lens Ca^{+2} artışına karşı direnç yaratarak Ca^{+2} dengesinin korunmasına yardımcı olur^{17, 19, 20}.

II.1.d. Katarakt Patogenezinde Oksidasyon ve Ca^{+2} 'un Rolü

Lenste ışık geçirgenliğinin azalması, optik aberasyonlar, görme keskinliğinde azalma ve bunların tümünü içeren morfolojik ve biyokimyasal anormallikler katarakt olarak tanımlanmaktadır. Katarakt oluştuğunda lens saydamlığı kaybolur ve lens opak bir hal alır. Kataraktın etiopatogenezinin açıklanmasında çok çeşitli mekanizmalar ileri sürülmüştür^{6, 11}.

Çevresel nedenlerle ve fotokimyasal olarak humor aközde reaktif oksijen türlerinin oluşumu katarakt etiyojisinde önemli bir risk faktörünü oluşturur. Lens

yapılarında oksidatif hasar öncelikle süperoksit, H_2O_2 ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türleri ile hasar sonucu meydana gelir. Serbest radikaller yaşam boyu maruz kalınan ultraviyole ışık tarafından indüklenerek lens fibrillerinde peroksidasyona ve hücrel metabolik reaksiyonlarda bozukluklara neden olur. Meydana gelen doku hasarı sonucu lens opaklaşır. Serbest radikallerin toksik etkileri lenste glutatyon redoks siklusunu kapsayan antioksidan savunma mekanizmaları tarafından önlenmeye çalışılır^{6, 7, 13}.

Lens proteinlerinin oksidasyonu katarakt formasyonunda erken olaydır. Metionin sülfoksit oluşumu, lens proteinlerinde disülfid bağlarının ve konformasyonel değişikliklerin meydana gelmesi katarakt oluşumu ile ilişkilidir. Kataraktogenezin süresince GSH düzeyleri düşer⁶.

Çeşitli çalışmalarda katarakt oluşumunun indüksiyonunda lipid peroksitlerin rolü gösterilmiştir. Lenste lipid peroksit oluşumunun iki kaynağı vardır. Birincisi lenste reaktif O_2 türlerinin oluşumu sonucu epitel hücreleri ve lens fibrillerinin membranlarında lipid peroksidasyonunun gelişmesi, diğeri ise çevresel dokulardan humor aköze gelen lipid peroksitlerin lense penetrasyonudur. Kataraktlı lenslerde yapılan çalışmalarda lipid peroksidasyonun göstergesi olarak MDA düzeylerinde artış saptanmıştır. Lipid peroksitler çapraz bağlarda artışa ve zincir uzunluğunda yayılmaya neden olur. Bu dönüşüm membranların seçici geçirgenlik özelliklerini değiştirir^{5, 7, 21}.

X ışınları, oabain (Na^+ , K^+ -ATPaz inhibitörü), klorpromazin (Ca^{+2} -ATPaz inhibitörü), triparanol (kolesterol sentezini durdurur), H_2O_2 , aminotriazol (katalaz inhibitörü), lizofosfolipidler ve araşidonik asit uygulaması ile ya da diabet ve galaktozemi

oluşturularak meydana getirilen deneysel katarakt modellerinde lenste çeşitli biyokimyasal anormallikler tespit edilmiştir :

1. Kompensatuar NADPH sentezinde artma ile birlikte GSH düzeylerinde azalma,
2. K^+ iyonlarının hücre dışına akışında artma,
3. Lensten K^+ iyonları, inositol ve aminoasitlerin kaybı,
4. Na^+ iyonlarında artış,
5. Lens solubl proteinlerinde azalma ve insolubl proteinlerde artma ile birlikte lens protein sentezinde azalma,
6. Protein disülfid gruplarında ve Ca^{+2} iyonlarında artma,
7. Pekçok enzim aktivitesinde azalma ve hidrolitik enzim aktivitesinde artma,
8. ATP içeriğinde azalma¹¹.

Selenyum hem esansiyel bir besin, hem de tehlikeli bir element olarak tanımlanır. Se konsantrasyonu normal fizyolojik durumun sürdürülmesinde kritik bir rol oynar. Yüksek konsantrasyonları ise toksiktir. Se düşük konsantrasyonlarda glutatyon peroksidaz yapısında antioksidan olarak fonksiyon görürken, yüksek konsantrasyonlarda direkt olarak oksidan etkilidir^{5, 7, 22, 23}.

Selenyumun kataraktojenik potansiyeli ilk kez 1978'de Ostadolova tarafından gösterilmiştir. 10 günlük ratlara 20-30 $\mu\text{mol/kg}$ dozunda subkutanöz Na-selenit enjekte edildiğinde 3-4 gün içerisinde rat lenslerinde bilateral nükleer opasite gelişmiştir. Bu modelde katarakt indüksiyonu oldukça hızlıdır, akut stres altında ve kısa sürede deneyin tamamlanmasına izin verir^{5, 7, 17, 18, 22, 23}.

Daha sonra David ve Shearer'in yaptıkları çalışmalarda nükleer kataraktın Ca^{+2} 'a bağımlı bir proteaz olan "Calpain II" aktivitesi sonrası lens nükleusunda proteolizise ve

irreversibl hasara neden olması sonucu oluştuğu saptanmıştır. Hem Calpain II aktivasyonu, hem de protein agregasyonu sitoplazmik Ca^{+2} konsantrasyonunun artışına bağlıdır. Lens Ca^{+2} 'u enjeksiyondan sonra 24-72 saat arasında 3-5 katına ulaşır. Çünkü selenit hücre membranının pasif Ca^{+2} geçirgenliğini iki kattan fazla artırır. Lens Ca^{+2} artışı diğer katarakt tiplerinde de gösterilmiştir. Fakat bu modelde diğerlerinden farklı olarak lens Na^{+} ve K^{+} konsantrasyonunda herhangi bir değişiklik oluşmamakta ve lenste şişme meydana gelmemektedir. Ca^{+2} 'un çoğunlukla epitelyal ve kortikal bölgeler dışında nükleer bölgede biriktiği saptanmıştır. Lens Ca^{+2} geçirgenliğinin enjeksiyondan 72 saat sonra spontan olarak normale döndüğü gösterilmiştir. Enjeksiyondan 48 saat sonra Na^{+} - Ca^{+2} değişiminin belirgin şekilde azaldığı saptanmıştır. Yine Ca^{+2} pompasının gücü enjeksiyondan 24 saat sonra azalmaya başlar ve 48 saat sonra % 50-75 oranında kaybolur. Aynı anda meydana gelen nükleer opasite ile birlikte nükleusta normalden 3-5 kat daha fazla Ca^{+2} birikimi olur^{17, 19}.

Kataraktz lenslerde Na-selenit tarafından indüklenen Ca^{+2} birikimi hem hücre içinde Ca^{+2} akışının artması, hem de hücre dışına akışın azalması sonucu meydana gelir^{17, 19}.

Bunce ve Hess Na-selenit kataraktlı lenslerde enjeksiyondan 24 saat sonra GSH'un 5 μ mol/g yaş doku ağırlığından 2 μ mol/g'a düştüğünü, heksoz monofosfat şantı aktivitesinin % 60 oranında arttığını bulmuşlar. Bu olay NADPH şeklindeki redükte ekivalanlara ihtiyaın arttığı şeklinde yorumlanmıştır. Redükte glutatyon ise selenit tarafından katalize edilerek selenoglutatyona (GS-Se-SG) oksitlenmiştir. Yani Se, -SH grupları ile kovalan biçimde bağlanarak hem GSH'un oksidasyonuna, hem de protein dislfitlerin oluşumuna neden olur¹⁸.

Aynı modelle yapılan çalışmalarda katarakt oluşumu ile birlikte MDA düzeylerinde yükselme görülmüştür. MDA artışı lipid peroksidasyonun göstergesidir. Se kataraktlı lenslerde glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon S-transferaz enzim aktiviteleri de ölçülmüştür. Yalnızca glutatyon peroksidaz aktivitesinin sabit kaldığı, diğer enzim aktivitelerinin azaldığı saptanmıştır^{5, 24}.

Selenit kataraktlı lenslerle yapılan çalışmalarda ; lens GSH içeriğinde azalma ve MDA'in ortaya çıkması ile selenitle indüklenmiş oksidatif stres ve membranda "Na⁺-Ca⁺² exchanger" ile Ca⁺²-ATPazın sensitivitesi katarakt patogenezinin temelini oluşturmaktadır. Na⁺, K⁺-ATPaz aktivitesinin ise minimal düzeyde azaldığı tespit edilmiştir^{17, 18, 19}.

II.2. SERBEST RADİKALLER

II.2.a. Tanımları

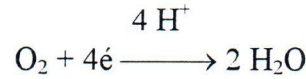
Yaşam için zorunlu olan oksijen, serbest radikal oluşumuna sebep olarak organizma için toksik de olabilmektedir. Birçok hastalığın, yaşlanma ve inflamasyonun patogenezinde serbest oksijen radikallerinin rol oynadığı gösterilmiştir^{2, 25}.

Elektronlar atomlarda belli enerji seviyelerinde yerleşmiştir. Orbital denilen bu enerji seviyelerinde bulunan elektron sayıları sınırlıdır ve n orbital sayısını belirtecek şekilde $2n^2$ formülü ile gösterilir. Herbir orbitalin s, p, d, f harfleriyle gösterilen alt enerji seviyeleri vardır. Bu alt enerji seviyelerinin içerdikleri elektron sayıları hep çifttir. s orbitalinde 2, p orbitalinde 6, d orbitalinde 10, f orbitalinde 14 elektron vardır. Her çift elektronun dönme yönleri (spinleri) birbirine zıttır ve atom ancak bu şekilde stabildir².

Serbest radikal, dış yörüngesinde çiftleşmemiş bir elektron içermesi nedeniyle özel bir durumda bulunan herhangi bir atom veya molekül olarak tanımlanır. Çiftleşmemiş elektron orbital üzerinde her iki yönde de hareket edebildiğinden bu tür atom veya moleküller oldukça reaktiftir^{2, 25, 26}.

Atom numarası 8 olan oksijen, dış yörüngesinde 6 elektron bulundurur. Elektronlar 1s yörüngesinde 2, 2s alt enerji düzeyinde 2, 2p alt enerji düzeyinde 4 adet şeklinde yerleşmişlerdir ($1s^2 2s^2 2p^4$). p yörüngesinde bulunan ve aynı yönde dönen çiftleşmemiş 2 elektronu ($2p_x, 2p_y$) ile oksijen atomu bir biradikaldir. Oksijen atomu bu kararsız yapısını giderebilmek için bir diğer oksijen atomuyla dış yörüngesindeki 2 elektronu ortaklaşa kullanır ve oksijen molekülünün (O_2) yapısını oluşturur^{27, 28, 29, 30}.

Normal koşullarda oksijenin % 98'i mitokondride yer alan sitokrom oksidaz enzim sistemi tarafından kademeli olarak 4 elektron ile indirgenerek su oluşur^{2, 28, 31, 32}.



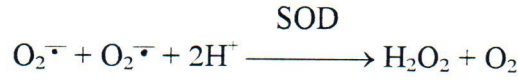
II.2.b. Radikal Oluşumu

Organizmada moleküler oksijenin toksik oksijen radikallerine dönüşümü mitokondrial ya da mikrozomal elektron transport zinciri tarafından veya ksantin oksidaz, aldehid oksidaz, flavin dehidrogenaz, aminoksidaz, siklooksijenaz ve lipooksijenaz gibi oksidan enzim sistemleri sayesinde bir elektron transferi sonucu oluşur. Potansiyel olarak sitotoksik oksijen türleri süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^{\bullet})'ni kapsar^{26, 32}.

Oksijen molekülünün 2p orbitallerinden birine bir elektron girişi ile dış yörüngesinde bir fazla elektron içeren süperoksit radikali meydana gelir. Yani süperoksit, oksijen molekülünün bir elektron ile indirgenmiş şeklidir. Süperoksit radikali birçok biyolojik substratla reaksiyona girerek redüktan veya oksidan etki gösterir. Reaktivitesi düşüktür. Fizyolojik önemi en fazla miktarda üretilen ve diğer reaktif oksijen radikallerinin yapımını sağlayan bir madde olmasıdır^{2, 25, 28, 31, 32}.



Süperoksit radikali aköz solüsyonlarda süperoksit dismutaz (SOD) enziminin katalizi ile hızla dismutasyona uğrar, H₂O₂ ve O₂ oluşur^{2, 29, 32}.

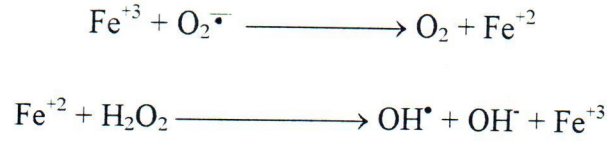


H₂O₂ ayrıca ürat oksidaz, glukoz oksidaz ve D aminoasit oksidaz gibi enzimlerin etkisiyle O₂ molekülüne 2 elektron transferi ile de oluşur. Zayıf bir oksidan ve redüktandır. Molekül yüksüz, kovalan bir yapıya sahiptir. Elektronları eşleşmiş olduğu için radikal olarak kabul edilmez. Ancak metal iyonları ve onların organik veya inorganik kompleksleri ile reaksiyona girerek, potansiyel olarak aktif hidroksil radikaline dönüşür^{2, 32}.

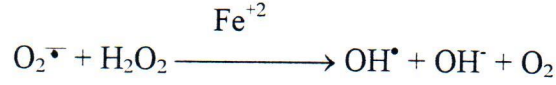


H₂O₂'e 1 elektron veya direkt olarak O₂ molekülüne 3 elektron eklenmesiyle oluşan hidroksil radikali en kuvvetli oksidan radikaldir. Bütün biyolojik moleküllerle reaksiyona girebilir. Hücre membranlarındaki doymamış yağ asitleri, hücre içinde ve membrandaki proteinler, karbonhidratlar, DNA zincirleri gibi önemli hücresel komponentlerin yapı ve fonksiyonlarını bozar^{2, 26, 28, 31, 32}.

Toksik hidroksil radikallerinin oluşum reaksiyonları demir ve bakır gibi bazı metaller tarafından da katalizlenebilir. Organizmada redoks olaylarında iki önemli sistem Fe^{+2}/Fe^{+3} ve Cu^{+}/Cu^{+2} 'dir. Bu oksidoredüktanlar ortamdaki süperoksit radikalini O_2 molekülüne çevirirken kendileri indirgenirler. İndirgenmiş demir (Fe^{+2}), H_2O_2 ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturur. Bu reaksiyon "Fenton reaksiyonu" olarak bilinir^{2, 25, 28, 31, 32}.



Süperoksit radikali ile H_2O_2 'in Fe^{+2} katalizörlüğünde reaksiyona girmesi ile hidroksil radikali oluşur. Bu, "Haber-Weiss reaksiyonu" olarak bilinir^{2, 25, 28, 32}.



Süperoksit radikaline direkt olarak bir proton (H^+) eklenmesi ile perhidroksil radikali oluşur².



Perhidroksil radikali, süperoksit radikalinden daha kuvvetli bir oksidandır. Etkisini reaksiyona girdiği substratlarla, hidroksil radikali oluşturarak gösterir. Perhidroksil radikalinin proton verme özelliği yani pKa değeri 4.8'dir ve ancak asidik ortamlarda bulunabilir^{2, 27}.

Diğer zararlı bir oksijen bileşiği de singlet oksijen (1O_2)'dir. Çiftleşmemiş elektron içermediği için yapı olarak serbest radikal değildir. Singlet oksijenin son yörüngesindeki 2

elektron aynı orbitaldedir ve birbirine zıt yönde dönerler. Elektronların bu durumundan dolayı moleküler O_2 'den çok daha reaktiftir ve kimyasal maddelerle kolayca etkileşir. Singlet oksijen oluşumu fotokimyasal reaksiyonlarda çok önemlidir^{13, 32}.

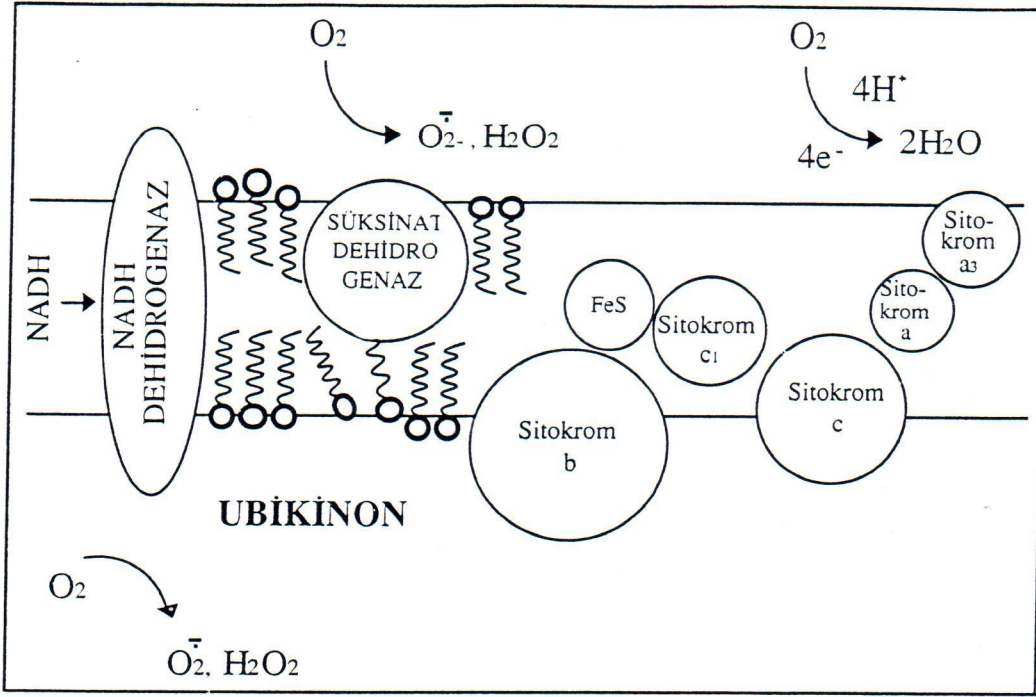
II.2.c. Serbest Radikallerin Hücre Hasarındaki Rollerini

Memeli hücresinde, moleküler O_2 oksidatif fosforilasyon yoluyla enerji üretiminde gereklidir. O_2 yokluğunda hücre hızla ölüme gider. Normal şartlar altında moleküler O_2 'in büyük bölümü intrasellüler sitokrom oksidaz enzim sistemi ile tetravalan indirgenmeye tabi tutulur. Bazı durumlarda ise yalnızca 1 elektron transferi ile univalan indirgenme oluşur. Bu, yüksek derecede reaktif olan serbest radikallerin oluşumu ile sonuçlanır^{25, 26}.

Tablo-I'de gösterildiği gibi biyolojik sistemlerde serbest radikallerin hücresel ve çevresel olmak üzere başlıca iki kaynağı vardır. Hücrede serbest radikallerin en önemli kaynağı, moleküler O_2 'in kademeli olarak suya kadar redüklendiği yer olan mitokondrilerdir. Mitokondride serbest radikaller özellikle solunum zincirinin NAD-Ubikinon-Sitokrom b bölgesinde oluşurlar. Burada O_2 'den süperoksit radikali, ondan da H_2O_2 oluşur (Şekil-2)^{2, 28, 31}.

Tablo-I : Biyolojik sistemlerde serbest radikallerin kaynakları³¹.

KAYNAKLAR		ÖRNEKLER	
I. Hücrel Metabolizma	- PG sentezi		
	- Mitokondrial elektron transportu		
	- Endoplazmik retikulum oksidasyonu		
	- Enzim aktivitesi	- NADPH oksidaz - Ksantin oksidaz	
	- Oksihemoglobin		
	- Otooksidasyon	- Adrenalin - Melanin tiolleri - Redükte riboflavin - FMN, FMNH ₂ - FAD, FADH ₂	
II. Çevresel	- İlaçlar	- Halotan - Parasetamol	
	- Sitotoksikler	- Bleomisin - Doksorubisin	
	- Pestisidler	- Parakuat	
	- Fotokimyasal hava kirleticiler		
	- Sigara içimi		
	- Radyasyon	X-ışını Işık	Su radyolizisi → O ₂ ^{-•} Fotoiyonizasyon → O ₂ ^{-•} Organik moleküllerin fotoeksitasyonu → O ₂ ^{-•}



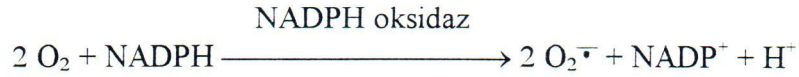
Şekil-2 : Solunum zincirinde oksijen radikallerinin oluşum bölgeleri².

Endoplazmik retikulum ve nükleer membranlarda elektron transportu sırasında serbest radikaller meydana gelebilir. Bu bölgede serbest radikallerden en çok etkilenen DNA'dır. Hidroksil radikali DNA'daki timin bazının yapısını bozar^{2, 25}.

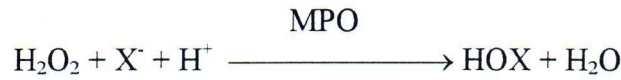
Hücrelerde bulunan katekolaminler, tioller, hidrokinonlar, flavinler ve tetrahidropterin gibi küçük moleküller fizyolojik ortamda otooksidasyonla O₂'i indirgeyerek süperoksit radikalini oluştururlar^{2, 32}.

Serbest radikal oluşumunda rolü olan diğer bir enzim NADPH oksidazdır. Bu enzim nötrofillerin plazma membranında bulunur. Nötrofile bir uyarı geldiğinde "respiratory burst" denilen bir dizi reaksiyon meydana gelir. Heksoz monofosfat şantı

aktive olarak mitokondri dışı enerji üretimiyle NADPH artar ve plazma membranında NADPH oksidaz enzim sistemi aktive olur. NADPH oksidaz, sitoplazma kaynaklı NADPH'ların elektronlarını O_2 'e aktarır ve fagositik vakuolün iç yüzeyinde süperoksit radikali oluşur^{2, 25, 28, 31, 33}.



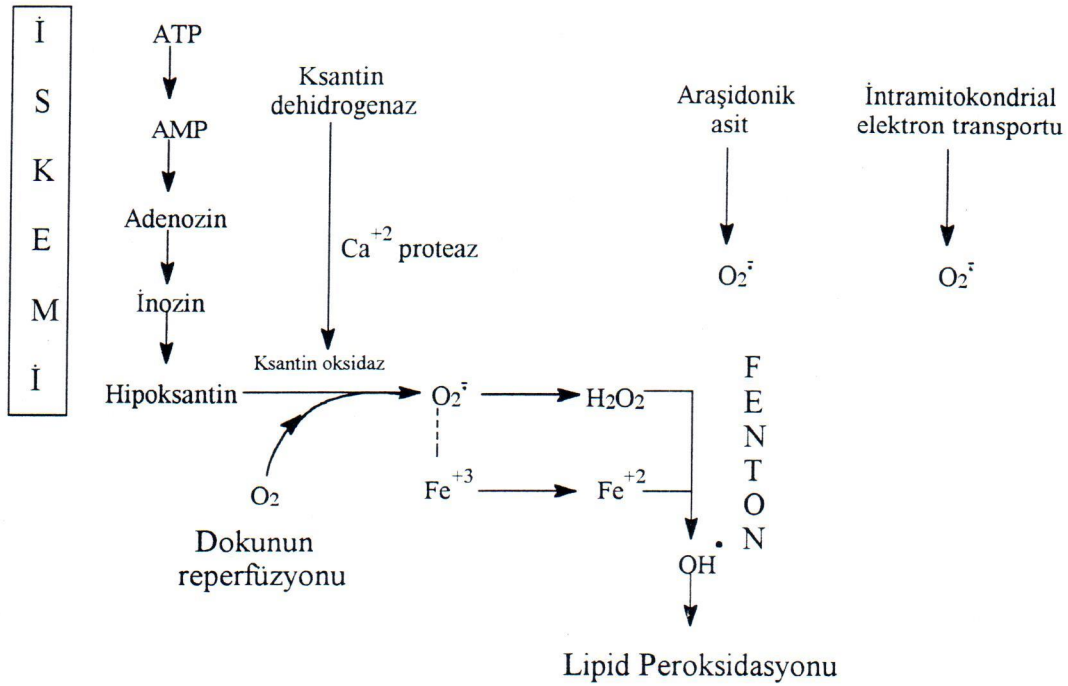
Süperoksit radikali fizyolojik pH'da dismutasyon ile H_2O_2 'e çevrilir. Nötrofillerdeki lizozomal granüllerden salgılanan myeloperoksidaz enzimi (MPO) ise H_2O_2 'i kullanarak halojenlerin (X^-) oksitlenmesini sağlar ve hipohalöz asitler oluşur. Hipohalöz asitler kuvvetli oksidanlardır ve çeşitli biyolojik moleküllerle reaksiyona girerler^{2, 25, 31}.



Bu yolla oluşan serbest radikaller ise hücrel hasara yol açar^{2, 28, 33}.

Hipoksik koşullarda da patolojik olarak serbest radikal oluşumu görülür. Barsaklar, akciğer ve karaciğerde bol miktarda bulunan ve purin bazlarının katabolizmasında kullanılan ksantin dehidrogenaz enzimi oksijen kullanmaz, elektron akseptörü olarak NAD^+ kullanır. Bu dokuların iskemisinde sitozolde Ca^{+2} iyonlarının

artışı ile proteazlar aktive olur. Aktive proteazlar ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşümüne neden olur. Reperfüzyon durumunda, elektron akseptörü olarak oksijeni kullanan bu enzimin etkisiyle süperoksit radikali ve H_2O_2 oluşur. Ortamda Fe^{+2} ve Cu^+ iyonları varsa süperoksit radikali ve H_2O_2 bu iyonlarla fenton reaksiyonuna girerek hidroksil radikali oluşur ve primer hasara yol açar (Şekil-3) ^{2, 25, 28, 31, 33, 34}



Şekil-3 : İskemi-reperfüzyon olayında serbest radikal oluşumu ve doku hasarı³¹.

Organizmada fizyolojik ve patolojik koşullar altında oluşan serbest radikaller doğal antioksidan sistemler ile ortadan kaldırılamayacak miktarlara ulaştıklarında hücrelere toksik etki gösterirler. Serbest radikallerin protein, lipid ve nükleik asit gibi makromoleküllerle etkileşmeleri hücre yapı ve fonksiyonlarında önemli değişikliklere neden olur. Serbest radikallerin proteinlere bağlanması proteinlerde fragmantasyon, çapraz bağlanma, agregasyon ve in vitro olarak da ölçülebilen ot Floresans oluşumu ile

sonuçlanır. Floresans oluşumu kataraktlı lens proteinlerinde, romatoid artrit ve diabetli hastalarda IgG ve albumin gibi proteinlerde gösterilmiştir^{2, 25, 31}.

Serbest radikaller sülfidril grubu (-SH) içeren enzimlere bağlanarak bunların inaktivasyonuna sebep olurlar. Polisakkaritlerin depolimerizasyonuna, glukoz gibi monosakkaritlerin otooksidasyonu ile H₂O₂, peroksit ve okzoaldehit oluşumuna neden olurlar. Özellikle hidroksil radikali nükleik asitlere bağlanarak DNA bütünlüğünün bozulmasına, bazların ve deoksiriboz şekerlerin fragmantasyon ve destrüksiyonuna neden olur. Bu olay sitotoksisite ve mutasyonla sonuçlanır³¹.

Serbest radikaller membranlardaki doymamış yağ asitlerine kolayca bağlanırlar. Bu oksidatif hasar lipid peroksidasyonu ile sonuçlanır, membran permeabilitesinde bozulmaya yol açar³¹.

Serbest radikal oluşumu ile ilişkili hastalıklar Tablo-II'de özetlenmiştir.

Tablo-II : Serbest radikal oluşumu ile ilişkili hastalıklar³¹.

İntrasellüler	- Hiperoksijenasyon	- Hiperbarik oksijen
		- Respiratuar hastalıklar
		- Komplet iskemi
	- Hipooksijenasyon	- İnkomplet iskemi
		- Transplantasyon
	- Kimyasallar ve ilaçlar	- Parakuat, Bleomisin
	- Alkolik karaciğer hastalığı	
	- Hemolitik demir yüklenmesi	
	- Parkinson hastalığı	
	- Yaşlanma	
Ekstrasellüler	- İnflamatuar hastalıklar	- Romatoid artrit
		- Ülseratif kolit
		- Vaskülitler
	- İmmunolojik otoimmün hastalıklar	
	- Diabetes mellitus	
	- Ateroskleroz	
	- Katarakt oluşumu	

II.3. LİPİD PEROKSİDASYONU

Lipid peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılan ve hücre membranları yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olay olarak tanımlanmaktadır. Bu olay otokatalitik bir şekilde yürümektedir^{25, 32, 35}.

Biyolojik sistemlerde enzimatik yollarla oluşan süperoksit ve hidroksil radikalleri membranlarda serbest yağ asitleriyle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu başlatırlar. Süperoksit radikalının Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları ile hidroksil radikaline dönüştüğü bilinmektedir. Bu nedenle organizmada lipid peroksidasyonunu başlatan başlıca radikalın hidroksil radikali olduğu kabul edilir^{25, 31, 36}.

Hücre membranlarındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu membran yapısını bozarak hücre tahribatına yol açar. Lipid peroksidasyonu üç aşamada gerçekleşir^{2, 25, 31, 32, 26}.

1. Başlangıç

İlk reaksiyon radikaller tarafından doymamış yağ asidi zincirindeki α -metilen gruplarından bir hidrojen atomunun çıkarılmasıdır. Hidrojen atomu 1 elektron içerdiğinden karbon üzerinde 1 adet eşleşmemiş elektron kalır ($\cdot\text{CH}$). Böylece lipid radikalleri oluşur. Lipid radikalleri kararsız bileşiklerdir ve moleküler O_2 ile birleşerek lipid peroksit radikallerini ($\text{ROO}\cdot$) oluştururlar^{2, 25, 32, 36}.



2. İlerleme

Bu aşamada lipid peroksit radikalleri zar yapısındaki doymamış yağ asitlerinden yeni lipid radikalleri oluştururken, kendileri de hidrojen atomlarını alıp lipid hidroperoksitlerine dönüşürler. Tek bir yağ asidinin etkilenmesi ile başlayan reaksiyon yüzlerce yağ asidi yan zincirinin lipid hidroperoksitlerine dönüşmesi ile devam eder^{2, 25, 32, 36}.

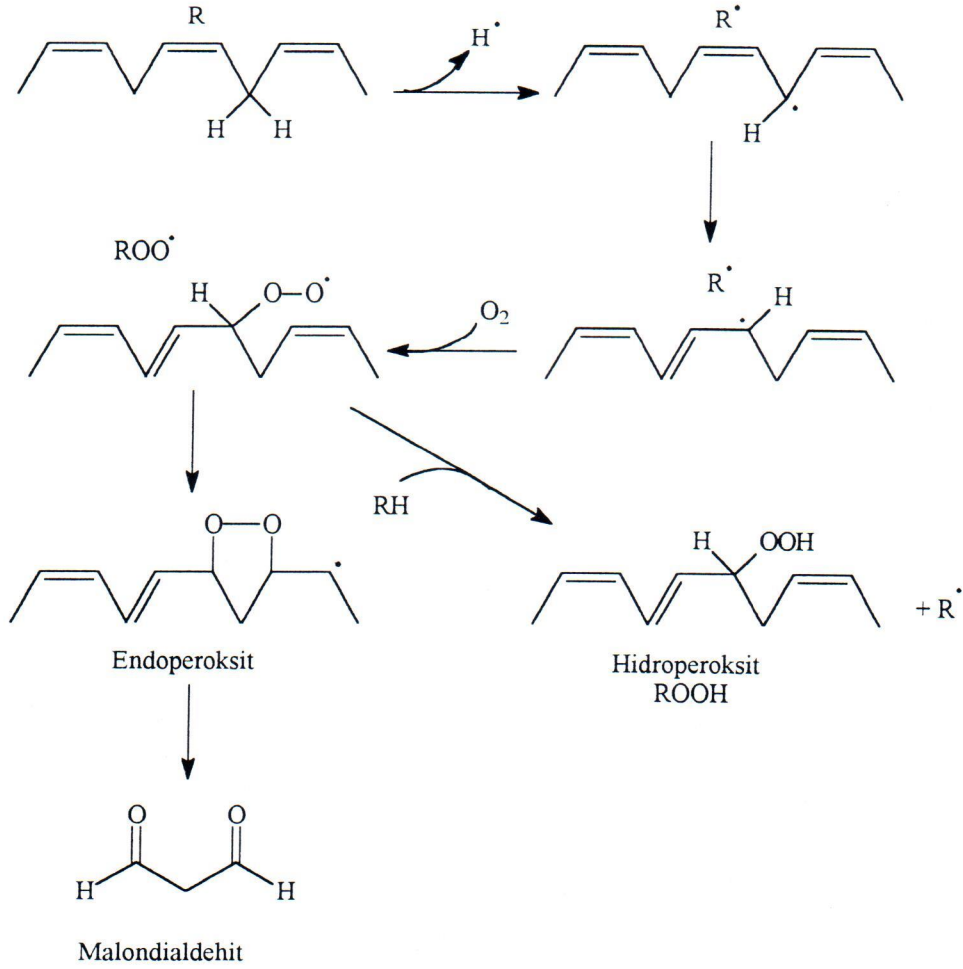


3. Sonlanma

Oluşan lipid radikali veya lipid hidroperoksitin inaktive olduğu dönemdir. Bu aşama iki şekilde gerçekleşir. Ya iki lipid radikali birbiriyle reaksiyona girerek nötralize olur ya da bir antioksidan etkisiyle yıkılır^{25, 32}.



Sonuçta lipid peroksitler aldehitler, alkanlar ve malondialdehit (MDA) gibi ürünlere dönüşür. Oluşan MDA membranlarda lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak kullanılır^{25, 32, 35, 36, 37, 38}.



Şekil-4 : Lipid peroksidasyonu³⁹.

Lipid hidroperoksitler ortamda demir ve bakır gibi metallerin varlığında bir substrat olarak kullanılarak yeniden zincir reaksiyonlarını başlatabilir (reinitation). Redükte metal iyonları Fe^{+3} ve Cu^{+2} , lipid hidroperoksitleri ile lipid peroksit radikalleri oluşturur. Bu radikaller ise doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek yeni lipid radikallerini oluştururlar^{2, 25, 31, 32, 36}.





Lipid peroksidasyonunun en önemli fizyolojik katalizörü Fe^{+2} iyonudur. Fe^{+2} , genelde transferrin, ferritin ve hemosiderine bağlı olarak bulunur. Ancak ışık, radyasyon veya kimyasal bir etki ile veya stres altında kalmış bir hücrede kompartmanlarından ayrılıp serbest radikal oluşumunu başlatır^{25, 36}.

Lipid peroksidasyonunun sitoplazmik membran, mitokondri, lizozom ve mikrozoim membranları gibi bütün hücre membranlarında olduğu gösterilmiştir. Lipid peroksidasyonuna maruz kalan doymamış yağ asitleri membran yapısını değiştirerek permeabilitenin artmasına ve hücresel transport mekanizmalarının bozulmasına neden olur. Membranlardaki peroksidatif hasar sonucu hücre içi ve hücre dışı iyon dengeleri bozulur, membranın Ca^{+2} gibi iyonlara geçirgenliği artar ve hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu artar. Mitokondri zarındaki geçirgenlik değişimiyle oksidatif fosforilasyon olayı bozulur, lizozom zarındaki lipid peroksidasyonu sonucu hidrolitik enzimler lizozom dışına çıkarak hücresel hasara neden olurlar³⁶.

II.4. PEROKSİDATİF HASARA KARŞI KORUYUCU SİSTEMLER

Canlı organizmalar yaşamlarını oksidatif tehditin sürekli olarak bulunduğu bir ortamda sürdürmek zorundadırlar. Bu nedenle oksidatif hasara karşı kendilerini koruyacak antioksidan sistemlere sahiptirler^{2, 25, 26, 28, 32}.

Serbest radikallerin oluşum hızı ile antioksidan sistemlerin aktivitesi dengede olduğu sürece organizma bu bileşiklerden etkilenmez. Buna karşılık antioksidan aktivite azalır veya serbest radikallerin oluşum hızı sistemin gücünü aşarsa denge bozulur ve serbest radikallere bağlı zararlı etkiler ortaya çıkar^{26, 34, 40}.

Oksidan hasara karşı organizmayı koruyan sistemler etki mekanizmalarına göre üç grupta toplanırlar².

1. Serbest Radikal Oluşumunu Önleyen Sistemler

Glukokortikoidler : Fosfolipaz aktivitesini inhibe ederek oksidatif metabolitlerin önemli bir kaynağı olan araşidonik asit kaskadını bozarlar. Bu amaçla metilprednizolon kullanılır. Steroidler ayrıca oksidatif metabolitlerin farklı oluşum yollarını etkileyerek inflamatuvar hücrelerin sayısını azaltır ve antioksidan etki gösterirler^{2, 41}.

Allopurinol : Hipoksantin analogudur. Ksantin oksidazı kompetitif olarak inhibe ederek serbest radikal oluşumunu önler^{2, 41}.

Antiinflamatuvar ilaçlar : Sodyum salisilat, indometazin gibi antiinflamatuvar ilaçlar iltihaplı dokuda aktif oksijen radikallerinin oluşumunu önlerler veya oluşmaları bağlayarak inaktive ederler. Yapılan çalışmalarda naproksenin aldoz redüktaz inhibisyonu yaparak serbest radikal oluşumunu önlediği gösterilmiştir^{2, 5}.

Bu grupta ayrıca renal kan akımını artırıcı mannitol, furosemid, ksantin oksidaz inhibitörü dimetilsülfoksit, desferrioksamın gibi metal şelatörleri, folik asit, pterin aldehit bulunur^{2, 25, 31}.

2. Zincir Kırma Aşamasında Etkili Sistemler

E vitamini (α -tokoferol) : Lipofilik özelliği nedeniyle membranlarda görevli etkin bir antioksidandır. Lipid peroksidasyonunu, lipid radikali ile reaksiyona girerek durdurur. E vitamininin oksidasyon potansiyeli düşüktür ve lipid peroksitlerle kolayca reaksiyona girerek oksitlenir. E vitamininden lipid peroksit radikallerine elektron veya H^+ transferi sonucu E vitamini radikalleri oluşturur^{2, 25, 32, 42, 43}.



E vitamini radikali ya diğer bir lipid radikali tarafından oksitlenir ya da C vitaminine bağlı bir sistemle tekrar E vitaminine indirgenir²⁵.



C vitamini (Askorbik asit) : Suda çözünür özelliğiyle elektron transport sistemlerinde etkilidir. Etkisini sitozolde ve ekstrasellüler sıvıda gösterir. Lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu sonlandırmada E vitamini ile beraber çalışır ve E vitamininin etkisini artırır. E vitamini radikalini indirgeyerek kendisi radikal haline gelir. Oluşan C vitamini radikali de NADPH redüktaz tarafından redüklenerek C vitaminine dönüşür. C vitamininin süperoksit radikali, hidroksil radikali ve H_2O_2 'i efektif olarak ortadan kaldırdığı gösterilmiştir^{2, 7, 25, 32}.

A vitamini (β -karoten) : Düşük parsiyel oksijen basıncında etkilidir. Lipofilik bir antioksidandır. Fotooksidasyon olaylarını önlemede esansiyel rol oynar^{2, 32, 34}.

Transferrin : Demir transport proteinidir. Plazma serbest demir konsantrasyonunun 1/3'ünü yapısında depolayarak, efektif olarak kontrol eder. Transferrine bağlı demir, radikal reaksiyonlarına katılamaz. Düşük pH'da (pH = 4) etkili olan ve protein molekülü başına 2 molekül demir bağlayan laktoferrin de benzer etkiyi gösterir. Hemoglobin ve Hem demirini bağlayan haptoglobulin ve hemopeksin de bu grupta sayılabilir^{2, 32, 42, 43}.

Serüloplazmin : Bakır iyonlarını bağlayarak, süperoksit ve H₂O₂'den hidroksil radikali oluşmasını sağlayan Fenton reaksiyonunun katalizlenmesini önler. Ferrooksidaz aktivitesi de vardır ve ferröz demirin (Fe⁺²), ferrik demire (Fe⁺³) oksidasyonunu katalizler. Fe⁺²'in O₂ ile, enzimatik olmayan oksidasyonundan farklı olarak bu reaksiyonda serbest oksijen radikalleri meydana gelmez^{2, 32, 42, 43}.

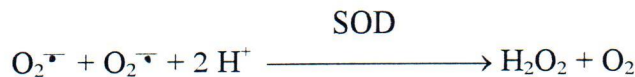
Glutasyon : Lipid peroksidasyonunu başlatacak radikallerin membranlara ulaşmasını önler. Yapısındaki redüktan ekivalanları (-SH grupları) glutasyon peroksidaz enziminin etkisiyle oksidan maddelere aktarır².

Bu grupta ayrıca ubikinon, retinoik asit, ürik asit, albumin, bilirubin ve glukoz bulunur^{2, 25}.

3. Zararsız Hale Getirmede Etkili Ajanlar

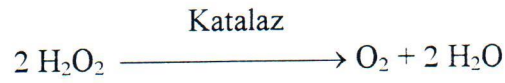
Hücrede antioksidan rolü olan üç önemli enzim mevcuttur. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutasyon peroksidaz (GSHPx)^{2, 8, 25, 26, 31, 35, 42}.

Süperoksit dismutaz (SOD) : Süperoksit radikalinin H₂O₂'e dismutasyonunu katalizler.

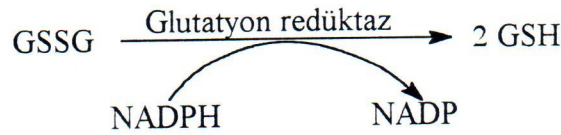


SOD, sitozolde ve mitokondrial matrikste bulunur. Sitozolik enzim, herbiri içinde bir ekivalan Cu^{+2} ve Zn^{+2} taşıyan iki alt üniteden meydana gelir. Mitokondrial enzim ise Mn^{+2} içerir. Ayrıca ekstrasellüler sıvıda yüksek moleküler ağırlıklı bir SOD bulunur ve eksternal hücre yüzeylerine bağlanarak serbest radikal yıkımında rol alır^{2, 25, 39, 40, 43}.

Katalaz : Başlıca sitozol ve peroksisomlarda bulunan ve demir içeren bu enzim H_2O_2 'i suya yıkar. Daha çok peroksisomlarda bulunduğundan aktivitesi glutatyon peroksidaza göre sınırlıdır^{2, 25}.



Glutatyon peroksidaz (GSHPx) : H_2O_2 ile redükte glutatyon reaksiyona girerek GSHPx katalizörlüğünde okside glutatyon ve su oluşur. Okside glutatyon, NADPH bağımlı glutatyon redüktazla indirgenir ve tekrar redükte glutatyon oluşur^{2, 25, 32, 42}.

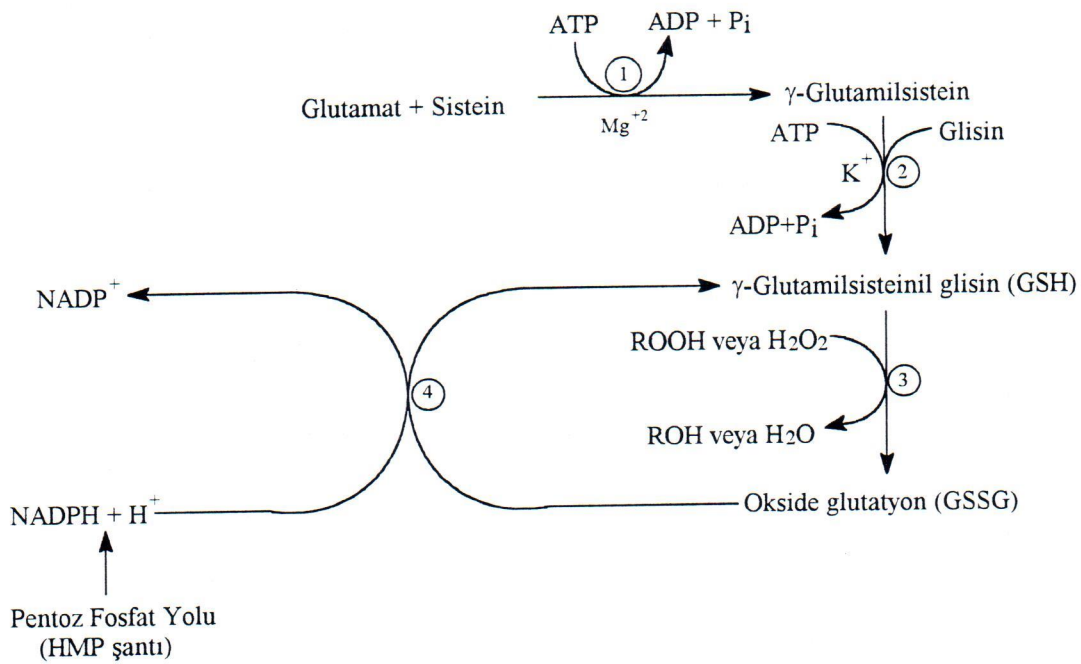


Glutatyon peroksidaz tetramer yapıda bir enzimdir. Selenyuma bağımlı ve bağımsız iki farklı tipi vardır. Selenyum içermeyen tipi sadece lipid hidroperoksitlerini, selenyuma bağlı tipi ise H_2O_2 ve lipid hidroperoksitlerini metabolize eder. Total enzim

miktarının 2/3'si sitozolde, 1/3'i mitokondride bulunur. Hücre dışı sıvıda da çok az oranda glutatyon peroksidaz aktivitesi gösterilmiştir^{2, 6, 32, 44}.

II.5. GLUTATYON VE RADİKAL HASARINDAN KORUYUCU ETKİNLİĞİ

Glutatyon ; γ glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşmuş bir tripeptiddir.



Şekil-5 : Glutatyon metabolizması⁴⁵.

1. γ -glutamil sistein sentetaz, 2. GSH sentetaz, 3. Glutatyon peroksidaz, 4. Glutatyon redüktaz

Glutatyon, γ -glutamil sistein sentetaz ve GSH sentetaz enzimleri tarafından sentezlenir. Sentez için iki basamakta birer ATP gerekir⁴⁵.

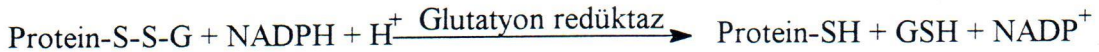
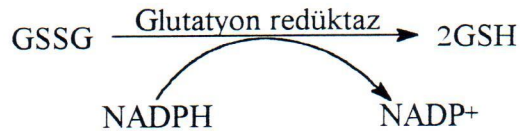
Glutatyon (GSH) organizmada birçok hücrede bulunur. Yapısındaki sistein aminoasidinin “-SH” grubu sayesinde oksidatif strese karşı korunma mekanizmasını oluşturur. Organik lipid peroksitlerin ve H₂O₂'in inaktivasyonunda rol oynar^{39, 45}.



Hücresel proteinleri ve zarları serbest radikal hasarından koruyan enzim glutatyon peroksidazdır. Bu enzim, herbiri bir selenyum atomu içeren 4 subünitten oluşur. Selenosistein yapısında olan bu subünitler asıl reaksiyona giren kısımlardır. Redükte glutatyon, glutatyon peroksidazla okside glutatyona dönerken serbest radikalleri de indirger^{44, 45, 46}.

Glutatyon ayrıca proteinlerin “-SH” gruplarının sağlanmasında, eritrositlerde hem demirinin ferröz (Fe^{+2}) şekilde kalmasında etkilidir. GSH, potansiyel olarak zehirli bazı elektrofilik ksenobiyotikleri konjuge ederek hücreden atılımını sağlar. Bu sırada glutatyon S-transferaz enzimini kullanır. Bu enzim Se içermeyen bir peroksidaz enzimidir^{39, 47}.

Okside glutatyon yeniden redükte glutatyona dönerken glutatyon redüktaz enzimini kullanır. Glutatyon redüktaz, insanda 8. kromozomun kısa kolunda, tek bir loküste kodlanmıştır. Flavin adenin dinükleotid yapısında ve iki subünitten oluşur. Glutatyon redüktaz, glutatyon ve proteinlerin mikst disülfid bağlarının redüksiyonunu katalizler. Bu reaksiyonlarda heksoz monofosfat şantından elde edilen NADPH'ı kullanır⁴⁵.



Hücrelere aminoasit transportunda kullanılan γ -glutamil siklusu glutatyonun yeniden sentezini de sağlar. Bu siklusta sadece γ -glutamil transferaz enzimi membranda, diğer enzimler sitozolde yerleşmiştir. Her bir aminoasit transferi için 3 ATP gereklidir. Siklusa giren GSH, siklus sonunda yeniden sentezlenir. Siklusun regülasyonunu γ -glutamil sistein sentetazın nonallostreik inhibisyonu sağlar⁴⁵.

Karaciğer, böbrek, eritrositler gibi pekçok dokuda önemi gösterilmiş olan glutatyon, katarakt oluşumuna karşı lensin korunmasında da rol oynar. Bu koruyucu etki üç aşamada olmaktadır :

1. Lens proteinlerinin tiollerinin redükte durumunun sürdürülmesi,
2. Katyon transportu ve permeabilitede önemli olan membran “-SH” gruplarının korunması,
3. H_2O_2 ve diğer organik peroksitlerin detoksifiye edilmesi¹⁰.

II.6. MEMBRAN TRANSPORT SİSTEMLERİ

II.6.a. Hücre Membranlarının Yapısı

Hücre membranları, hücrenin etrafını çevirerek hücre sitoplazması ile ekstrasellüler çevre arasındaki farklılıkların devamını sağlar ve geçirgenlik bariyeri olarak rol oynar. Biyolojik membranlar tabakalı yapılardır ; 4-5 nm kalınlığa sahip olup, lipid, protein ve karbonhidrat moleküllerini içerirler. Lipid : protein : karbonhidrat oranı, hücre tipine göre değişir. Yapının yaklaşık % 50'sini lipidler oluşturur ve lipid çift tabaka şeklinde bulunurlar. Zar yapısında en belirgin lipid fosfolipidlerdir ve zarın yapısal temelini oluştururlar, diğerleri ise kolesterol ve glikolipidlerdir⁴⁸.

Hücre zarında 4 majör fosfolipid grubu bulunur. Bunlar fosfotidilkolin, sfingomyelin, fosfotidilserin ve fosfotidiletanolamindir. Zardaki lipid çift tabakanın iki yarısındaki fosfolipid içerikleri farklıdır, asimetrik dağılım vardır. Zar yapısında bulunan kolesterol, lipid çift tabakanın geçirgenlik bariyeri olma özelliğini artırır. Hücre zarında yer alan glikolipidler, yapısında şeker içeren lipid molekülleridir. Bunlar lipid çift tabakanın dış yarısında bulunurlar. Zar yapısında bulunan glikolipidler gangliozidler ve serebrozidlerdir⁴⁸.

Hücre zarının yapısı 1972'de Singer ve Nicholson tarafından tanımlanmıştır. Bu modelde sıvı ve asimetrik lipid çift tabaka bulunur. Proteinlerin bir kısmı ya sadece iç yüzde ya da sadece dış yüzde yerleşmiştir. Bunlara periferel zar proteinleri denir. Ankrin ve spektrin birer örnektir. Zarda bulunan diğer proteinler ise lipid çift tabakanın iki tarafında asimetrik olarak dağılmışlardır ve her iki yüze de bakan kısımları vardır. Bunlara integral zar proteinleri denir ve spesifik moleküllerin ya da kimyasal sinyallerin zar boyunca taşınmasında rol alırlar. Zar proteinleri de karbonhidratlar ile kovalan olarak bağlı bulunurlar, bunlara glikoproteinler denir⁴⁸.

II.6.b. Membran Transportu

Hücre zarlarının en önemli görevi seçici geçirgenliği sağlamaktır. Moleküller çeşitli yollarla hücre membranı boyunca taşınırlar. Moleküllerin membrandan geçişi tek yönlü ise uniport, geçmesi için bir başka maddeye ihtiyaç duyuyorsa simport ya da kotransport, kendi girerken başka bir maddenin çıkması gerekiyorsa antiport denir. Membran transportu üç mekanizma ile olur :

1. Basit diffüzyon,
2. Kolaylaştırılmış diffüzyon
3. Aktif transport^{39, 45, 48}.

Basit Diffüzyon

Membran transportunun en basit tipidir. Çözünmüş moleküller konsantrasyon gradienti yönünde hareket ederler. Geçiş, zarın iki tarafındaki madde konsantrasyonu aynı olana kadar devam eder⁴⁹.

Bir maddenin lipid çift tabakadan kolay geçebilmesi için yağda çözünürlüğünün fazla, suda çözünürlüğünün az olması gerekir. CO₂, O₂, N₂ ve gliserol gibi küçük moleküller zarın hidrofobik bölgelerinden elektrokimyasal gradient boyunca kolayca diffüze olurlar^{39, 47}.

Hücre zarında taşıyıcı proteinlere benzemeyen transmembran kanal proteinleri bulunur ve zar boyunca hidrofilik kanallar oluştururlar. Kanal proteinlerinin bir grubu “gap junction” denilen ve uygun hücreler arasında bağlantıyı sağlayan kanallardır. Hücreler arasında yer alan ve bir hücreden diğerine uzanan bu bağlantılar elektriksel ve kimyasal sinyallerin iletilmesini sağlar. Hücre zarındaki diğer kanal proteinlerinin çoğu inorganik iyonlar için seçici geçirgenliği olan kanallardır. Bunlara “iyon kanalları” denir. Bu taşımada enerji gerekmez, basit taşımadır. İyon kanalları Na⁺, K⁺, Cl⁻ ya da Ca⁺² iyonları için spesifiktir. İyon kanallarının birinci özellikleri iyon seçiciliği, ikinci özellikleri ise devamlı açık bulunmamalarıdır. Çoğunlukla spesifik bir uyarıya cevap olarak açılırlar. Bu uyarı membran potansiyel değişikliği veya bir mediatör ya da nörotransmitter olan bir ligandın bağlanması olabilir^{39, 48}.

Hücre membranlarındaki kanalların çoğu K^+ 'a geçirgendir. K^+ kanalları istirahatteki hücrede açıktır. Bu geçirgenlik membran potansiyelinin korunmasında önemli rol oynar. Normalde membran potansiyeli -50 mV ile -90 mV arasında değişir⁴⁸.

Kanallar Ca^{+2} iyonu konsantrasyonunda değişikliklere cevap olarak açılır ya da kapanır. Ca^{+2} iyonlarının heksamerik kanalın protein alt birimlerinin konformasyonunu değiştirdiği düşünülmektedir⁴⁹.

Kolaylaştırılmış Diffüzyon

Taşıyıcı aracılı diffüzyondur. Enerji gerektirmez, taşınan moleküllerin konsantrasyon gradienti yönünde çalışır. Kolaylaştırılmış diffüzyon fosfolipid çift tabakada yer alan integral membran proteinlerine bağlıdır. Transport proteinleri bir molekül ya da grup için spesifiktir. Taşıma esnasında transport proteini iki ayrı konformasyon arasında değişime uğrar. Transport proteinin taşınacak molekülü bağlama bölgesi zarın dışına doğrudur, molekülü bağlayınca proteinde konformasyon değişikliği olur ve molekül zarın öbür yüzüne aktarılır. Sonra protein eski konformasyonuna döner^{39, 48, 49}.

Taşıyıcı aracılı diffüzyona hücre membranlarındaki Na^+-Ca^{+2} ve Na^+-H^+ antiport sistemleri örnek olarak verilebilir. Na^+-Ca^{+2} değiştirici normal şartlarda Na^+ gradientinden yararlanarak hücre içine 3 Na^+ iyonunun taşınmasına karşılık 1 Ca^{+2} iyonunu hücre dışına pompalayarak, hücre içinde düşük Ca^{+2} konsantrasyonunun sürdürülmesine katkıda bulunan bir proteindir⁵⁰. Ancak hücre içi Na^+ arttığı durumlarda durum tersine döner ve dışarı Na^+ atılmasına karşılık içeri Ca^{+2} alınır ve hücre içi Ca^{+2} artar.

Aktif Transport

Membran transportunun üçüncü tipidir. Moleküller, zardaki taşıyıcı proteinler aracılığıyla, enerji kullanılarak, konsantrasyon gradientine karşı olarak taşınır. Primer aktif transport, sekonder aktif transport ve grup translokasyonu olarak üçe ayrılır^{47, 49}.

Primer aktif transportun en önemli örneği Na^+ ve K^+ iyonlarını taşıyan Na^+ , K^+ -ATPaz antiportudur. Diğer örnekler ise Ca^{+2} iyonlarını hücre dışına taşıyan Ca^{+2} -ATPaz ve proton transportu yapan bakteriyorodopsindir⁴⁷.

Na^+ - K^+ pompası

Konsantrasyon gradientine karşı çalışarak hücre içi ve dışı Na^+ ve K^+ konsantrasyonlarını sabit tutar. Böylece hücre volümünün korunmasını ve osmotik dengenin sürdürülmesini sağlar. ATP ile yürüyen pompanın antiport sistemi her hidrolize olan ATP molekülü başına hücre içine 2 K^+ iyonu, hücre dışına 3 Na^+ iyonu pompalar. Na^+ , K^+ -ATPaz 2 α ve 2 β olmak üzere dört alt birimden oluşan bir integral zar proteinidir. İyon transportu için ATP ve Na^+ hücre içinde, K^+ ise hücre dışında bulunmalıdır. Zarın sitozolik yüzünde 3 Na^+ iyonu Na^+ , K^+ -ATPaz ile bağlanır. ATPaz'ın bir aspartat yan grubuna ATP'den fosforil grubu transfer olur ve yüksek enerjili açil-fosfat bağı oluşur. Na^+ , K^+ -ATPaz'da konformasyonel değişiklik meydana gelir ve 3 Na^+ iyonu hücre dışına geçer. 2 K^+ iyonu ise hücre dışında Na^+ , K^+ -ATPaz'a bağlanır, açil-fosfat hidrolizi ile tekrar konformasyonel değişiklik oluşur ve 2 K^+ iyonu hücre içine geçer^{47, 48, 49}.

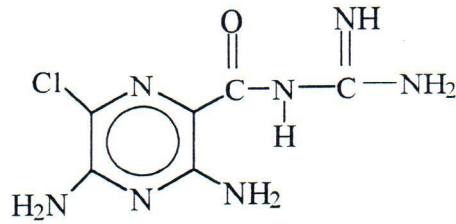
Ca²⁺-ATPaz

Kas hücrelerinde bir uyarı ile zar potansiyeli değiştiğinde sarkoplazmik retikulumdan hücre içine Ca²⁺ iyonları boşalımı başlar. Bu, kas kontraksiyonunu uyarır. Ca²⁺-ATPaz, sarkoplazmadan, sarkoplazmik retikuluma Ca²⁺ iyonlarının geri depolanmasını sağlar. Ca²⁺-ATPaz hidrolize ettiği her ATP molekülü başına sarkoplazmik retikulum lümenine 2 Ca²⁺ iyonunun transportunu sağlar⁴⁹.

Birçok hayvan hücresi sitoplazmik membranlarında, sarkoplazmik retikulumdaki enzime yapı ve mekanizması çok benzeyen Ca²⁺-ATPaz pompası saptanmıştır. Bu pompanın kinetik mekanizması Na⁺, K⁺-ATPaz enzimininkine çok benzer, fakat tersine çalışan 2 Ca²⁺ ile 3 Na⁺ iyonu değişimi şeklindedir⁴⁷.

II.7. AMİLORİD

Bir pirozinoilguanidin derivativesidir (Şekil-6). Primer olarak renal epitelyal Na⁺ kanalları inhibitörü olarak kullanılır. Organik baz yapısında olduğu için, proksimal tübülde organik baz sekretuar mekanizması ile taşınır⁵¹.



Şekil-6 : Amiloridin kimyasal yapısı⁵¹.

Amiloridin organizmada renal orijinli olmayan diğer epitel hücreleri üzerine de etkili olduğu gösterilmiştir. 1 µmol'ün altındaki konsantrasyonlarda maksimum

inhibisyonun yarısını oluşturur. Amilorid epitel hücre membranındaki Na^+ kanallarında Na^+ ile kompetitif veya nonkompetitif olarak etkileşir. Nöron ve kas hücreleri gibi eksitabl hücrelerdeki voltaj bağımlı Na^+ kanallarına etkisi yoktur⁵¹.

Canessa ve arkadaşlarının 1994'te yaptıkları moleküler klonlama çalışmasında rat distal kolon epitelindeki amilorid sensitif Na^+ kanallarının üç subünittten oluştuğu gösterilmiştir (α , β , γ). Kanal aktivitesi için α subününün yeterli olduğu, üç subünit birlikte aktive olduklarında maksimum Na^+ geçirgenliğinin meydana geldiği saptanmıştır. Oligomerik yapıda olan subünitler bir heterotrimerik proteinde birleştirilmiştir. Amiloridin Na^+ kanalı üzerinde kesin olarak bağlandığı yer bilinmemektedir⁵¹.

Amilorid daha yüksek konsantrasyonlarda Na^+-H^+ ve $\text{Na}^+-\text{Ca}^{+2}$ antiport sistemlerini de bloke eder²¹.

III. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma S.B. Ankara Hastanesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Çalışmada ağırlıkları 15-20 gram arasında değişen 10 günlük yavru Wistar-Albino ratlar kullanılmıştır. Ratlara ilaç uygulanması, bakımı ve cerrahi prosedür Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Biyofizik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

III.1. KULLANILAN ARAÇLAR

Homojenizatör	: B. Braun Melsungen AG Tıp 853202
Spektrofotometre	: Shimadzu 120-01
Santrifüj	: Heraeus Megafuge 1,0 ve Jouan CR 4 11
pH metre	: Radiometer Copenhagen
Vorteks	: Elektro-mag
Terazi	: Libror AEG 220 (Shimadzu)
ISE	: Nova Stat Profile Plus 5

Ayrıca Biyokimya ve Klinik Biyokimya Laboratuvarı'nda bulunan ve analizlerde kullanılan diğer malzemeler.

III.2. DENEY HAYVANLARININ HAZIRLANMASI

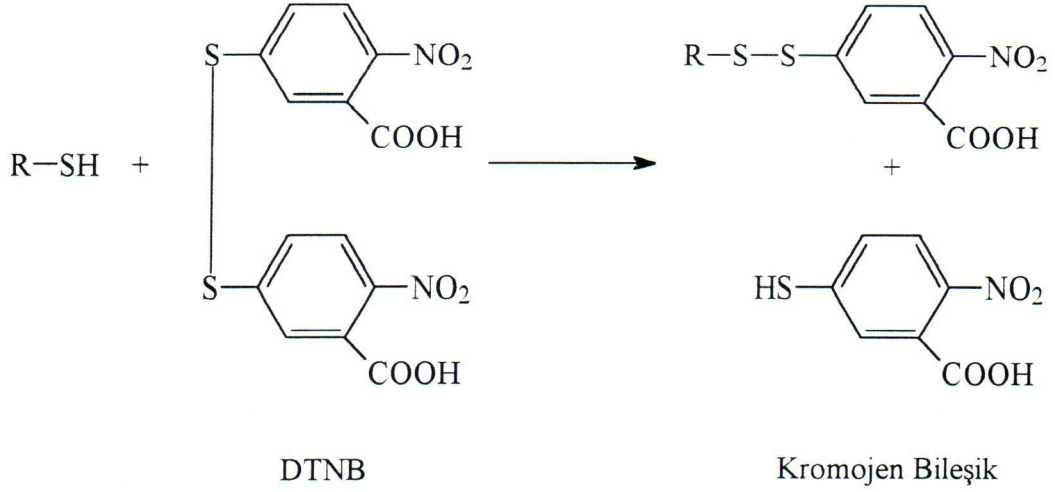
Ağırlıkları 15-20 gram arasında değişen 10 günlük yavru Wistar-Albino ratlar üç gruba ayrıldı.

- I. Grup : Kontrol grubu (22 rat)
II. Grup : Na-Selenit kataraktı grubu (23 rat)
III. Grup : Na-Selenit kataraktı + Amilorid tedavi grubu (23 rat)

Yavru ratlar tartıldıktan sonra birinci grup hiçbir uygulama yapılmaksızın ayrıldı. İkinci gruba 30 µmol/kg vücut ağırlığı dozunda Na-selenit, üçüncü gruba ise yine 30 µmol/kg vücut ağırlığı dozunda Na-selenit ile 1 µmol/kg vücut ağırlığı dozunda amilorid subkutan enjeksiyonla uygulandı. Üç haftalık deney protokolü süresince ratlar normal laboratuvar koşullarında tutuldular ve aynı şekilde beslendiler. Üç haftalık izleme süresi sonunda tüm hayvanlar tekrar tartıldı. Ratlar 35 mg/kg intraperitoneal Na-pentobarbital anestezisi ile uyutuldu. Lensler intrakapsüler olarak çıkarıldı ve % 0.9'luk NaCl ile yıkandı. Lenslerin herbiri görsel olarak değerlendirildi. Her grupta 3 veya 4 lens bir araya getirilerek GSH ve katyon analizi için çalışma numuneleri, aynı şekilde 3 veya 4 lens bir araya getirilerek MDA analizi için çalışma örnekleri oluşturuldu. Örnekler hassas terazide tartılarak lenslerin yaş doku ağırlıkları tespit edildi. Aynı gün bütün numuneler çalışıldı.

III.3. REDÜKTE GLUTATYON ÖLÇÜLMESİ

Lenslerdeki redükte glutatyon (GSH) düzeyleri Ellman metodu ile ölçüldü. Ellman reaktifi olarak da isimlendirilen 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB)'in substrattaki her -SH grubu içeren molekül başına, 1 molekül 2-nitro-5-merkaptobenzoik aside, -SH grupları tarafından redüklenmesi temeline dayanır. Nitro-merkaptobenzoik asidin oluşturduğu sarı renk spektrofotometrik olarak ölçülür^{52, 53}.



Şekil-7 : DTNB'nin -SH grupları ile reaksiyonu.

Reaktifler

Triklorasetik asit % 10 (Riedel-De Haen Ag 272 42)

Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) 0.3 M (Merck 6573)

Dithionitrobenzoik asit (DTNB) (Sigma D-8130)

Trisodyum sitrat % 1 (Merck 6431)

Redükte glutatyon (Sigma G-4251)

Örnekler 1 ml distile suda 5 cm'lik cam başlıklı strok homojenizatörle homojenize edilerek aköz lens ekstraktı elde edildi. Homojenatın 0.5 ml'si katyonların analizi için ayrıldı, kalan 0.5 ml'si GSH tayini için kullanıldı.

0.5 ml homojenat üzerine 0.5 ml % 10'lük TCA ilave edildi. $+4^\circ\text{C}$ 'de 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek protein içermeyen berrak bir süpernatan elde edildi.

0.5 ml süpernatant ayrı bir tüpe alınarak üzerine sırayla 4 ml 0.3 M Na₂HPO₄ ve 0.5 ml DTNB reaktifi eklendi. DTNB reaktifi, 10 ml % 1'lik trisodyum sitrat solüsyonunda 4 mg DTNB'nin eritilmesi ile hazırlanmıştır.

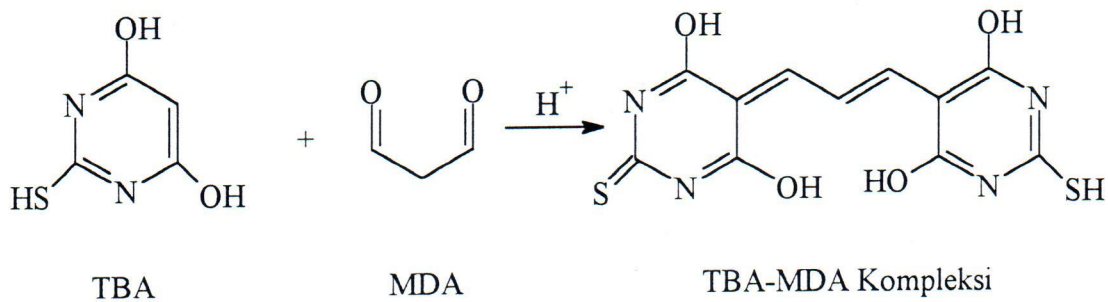
2. dakikada, oluşan sarı renk spektrofotometrede 410 nm dalgaboyunda okunarak absorbanslar alındı.

100-5 µM arasında değişen konsantrasyonlarda GSH standartları hazırlanarak standart eğrisi çizildi.

Hesaplama, ölçülen absorbans değerleri standart eğriden yararlanılarak konsantrasyona çevrildi. Lenslerin GSH konsantrasyonları µmol/g yaş doku olarak hesaplandı^{5,7}.

III.4. LİPİD PEROKSİDASYONUN ÖLÇÜLMESİ

Lipid peroksidasyonun son ürünü olan malondialdehit (MDA) düzeyi Ohkawa ve arkadaşlarının tanımladığı tiyobarbitürik asit (TBA) testi ile belirlendi. TBA testi "TBA reaktif substans" olarak nitelendirilen lipid peroksitlerin düşük pH'da TBA ile girdikleri reaksiyon sonunda oluşan pembe renkli kompleksin konsantrasyonunun kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanır⁵⁴.



Şekil-8 : TBA reaksiyonu.

Reaktifler

Potasyum klorür (KCl) 0.15 M (Merck 4935)

Sodyum dodesil sülfat (SDS) % 8.1 (Merck-Schuchardt 822050)

Asetat tamponu 3 M (pH = 3.5)

Tiyobarbitürik asit (TBA) % 0.82 (Sigma T5500)

Sodyum dodesil sülfat (SBS) % 35 (Merck-Schuchardt 822050)

1, 1, 3, 3-tetraetoksipropan

Deneyin Yapılışı

Örnekler 1 ml KCl içinde homojenize edildi. Üzerine sırayla 0.2 ml % 8.1'lik SDS, 1.5 ml 3 M asetat tamponu (pH = 3.5) ve 1.5 ml % 0.82'lik aköz TBA solüsyonu ilave edildi.

Karışım 45 dakika süre ile 95°C'deki su banyosunda bekletildi. Oda sıcaklığına kadar soğuduktan sonra üzerine 0.5 ml % 35'lik SDS ilave edildi ve tüpler 10 dakika daha 95°C'deki subanyosunda bekletildi.

Karışım soğuduktan sonra 10 dakika süre ile 3500 rpm'de santrifüj edildi.

Pembe renkli süpernatanın 532 nm dalgaboyunda absorbansı alındı.

Tetraetoksi propandan 10-0.3215 nmol/ml arasında değişen konsantrasyonlarda standart solüsyonları hazırlanarak standart eğrisi çizildi.

Ölçülen absorbans değerleri standart eğriden yararlanılarak konsantrasyona çevrildi. Lenslerin MDA konsantrasyonları nmol/g yaş doku olarak hesaplandı^{5,7}.

III.5. Na⁺, K⁺ ve Ca⁺² ANALİZLERİ

Daha önceden hazırlanmış olan 0.5 ml'lik aköz lens ekstraktlarında ölçümler yapıldı. Na⁺, K⁺ ve Ca⁺² analizi Nova Stat Profile Plus 5 ile yapıldı. Sonuçlar mmol/L olarak alındı. Lenslerin daha önce ölçülmüş yaş doku ağırlıkları ve yapılan seyreltmeler göz önüne alınarak sonuçlar µmol/g yaş doku cinsinden ifade edildi.

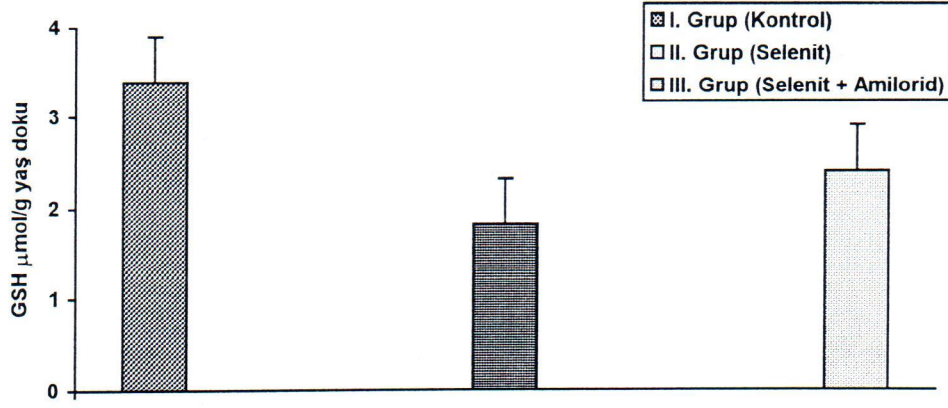
İstatistiksel analizler IBM Compatible PC'de Sigma Plat programı ile yapıldı. İstatistiksel değerlendirmede Student's t testi kullanıldı.

IV. BULGULAR

Normal rat lenslerinde, Na-selenit uygulanan rat lenslerinde ve Na-selenit + amilorid grubu lenslerinde redükte glutasyon değerleri Tablo-III ve Şekil-9'da, istatistiksel analiz Tablo-IV'de gösterilmiştir.

Tablo-III : Kontrol grubu, Na-selenit grubu ve Na-selenit + amilorid grubu rat lenslerinde redükte glutasyon (GSH) düzeyleri ($\mu\text{mol/g}$ yaş doku).

	I. GRUP Kontrol	II. GRUP Na-selenit	III. GRUP Na-selenit + amilorid
1	3.36	1.55	1.85
2	4.21	1.52	2.12
3	3.10	1.42	1.95
4	3.07	2.12	2.01
5	3.58	1.71	1.87
6	3.02	1.84	2.64
7	3.33	1.92	2.34
8	3.50	2.44	2.66
9			2.87
10			3.61
n	8	8	10
Ort \pm SH	3.3963 \pm 0.1368	1.8150 \pm 0.1210	2.3920 \pm 0.1773



Şekil-9 : Kontrol grubu, Na-selenit grubu ve Na-selenit + amilorid grubu rat lenslerinde GSH düzeylerinin karşılaştırılması.

Tablo-IV : Lens GSH düzeylerinin istatistiksel analizleri.

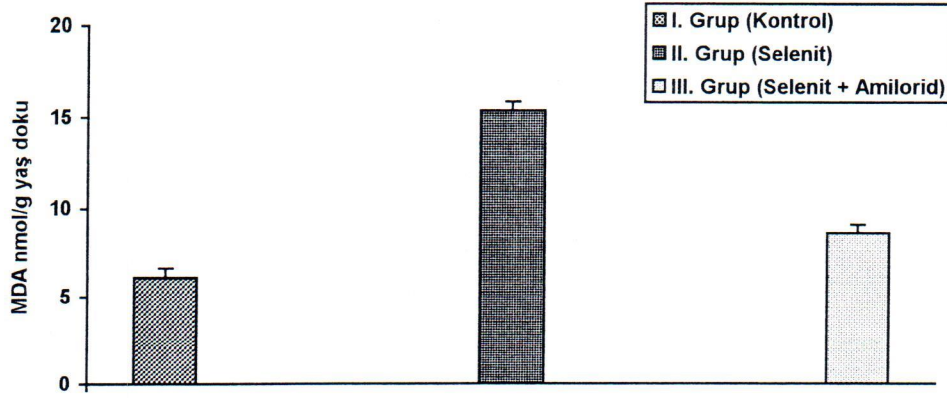
I. Grup-II. Grup	$t = 8.66$	$p < 0.001$
II. Grup-III. Grup	$t = -2.55$	$p < 0.05$
I. Grup-III. Grup	$t = 4.3$	$p < 0.001$

Lens GSH düzeylerinde ; kontrol grubuna göre Na-selenit kataraktı oluşturulan grupta istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ($p < 0.001$), yine Na-selenit grubuna göre Na-selenit + amilorid tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme ($p < 0.05$) gözlenmiştir. Kontrol grubu ile Na-selenit + amilorid tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.001$) (Tablo-IV).

Çalışma gruplarında malondialdehit (MDA) düzeyleri Tablo-V'de ve Şekil-10'da, istatistiksel değerlendirmesi Tablo-VI'da gösterilmiştir.

Tablo-V : Kontrol grubu, Na-selenit grubu ve Na-selenit + amilorid grubu rat lenslerinde MDA düzeyleri (nmol/g yaş doku).

	I. GRUP Kontrol	II. GRUP Na-selenit	III. GRUP Na-selenit + amilorid
1	6.31	21.40	7.82
2	6.35	17.64	12.37
3	6.82	13.47	11.30
4	6.25	17.41	8.12
5	5.60	10.16	9.07
6	6.16	14.26	5.94
7	5.94	11.77	7.79
8	5.39	16.89	6.99
9			8.21
n	8	8	9
Ort ± SH	6.1025 ± 0.1598	15.3750 ± 1.2882	8.6233 ± 0.6773



Şekil-10 : Kontrol grubu, Na-selenit grubu ve Na-selenit + amilorid grubu rat lenslerinde MDA düzeylerinin karşılaştırılması.

Tablo-VI : Lens MDA düzeylerinin istatistiksel değerlendirilmesi.

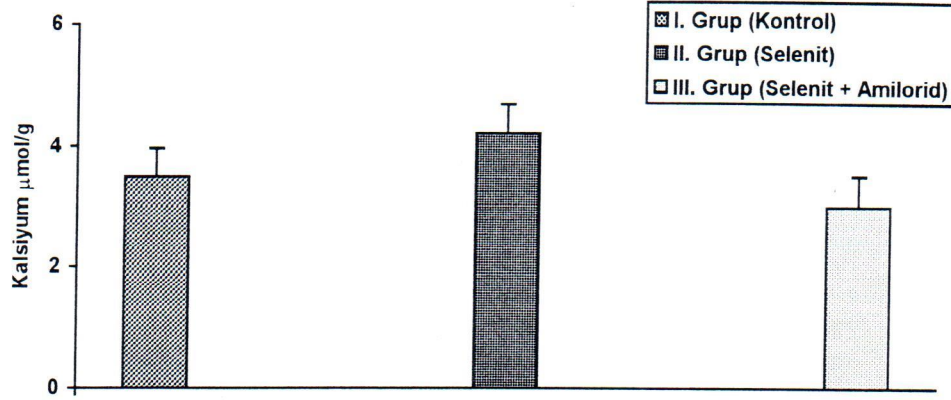
I. Grup-II. Grup	t = -7.14	p < 0.001
II. Grup-III. Grup	t = 4.7948	p < 0.001
I. Grup-III. Grup	t = -3.42	p < 0.005

Lens MDA düzeylerinde ; kontrol grubuna göre Na-selenit kataraktı oluşturulan grupta istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme (p < 0.001), yine Na-selenit grubuna göre Na-selenit + amilorid grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma (p < 0.001) izlendi. Kontrol grubu ile Na-selenit + amilorid grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (p < 0.005) (Tablo-VI).

Çalışma gruplarında lens Ca⁺² düzeyleri Tablo-VII'de ve Şekil-11'de, istatistiksel değerlendirmesi Tablo-VIII'de gösterilmiştir.

Tablo-VII : Kontrol grubu, Na-selenit grubu ve Na-selenit + amilorid grubu rat lenslerinde Ca⁺² düzeyleri (µmol/g yaş doku).

	I. GRUP Kontrol	II. GRUP Na-selenit	III. GRUP Na-selenit + amilorid
1	3.60	4.20	2.28
2	3.70	3.42	3.01
3	2.65	3.00	3.50
4	5.50	3.39	3.36
5	4.20	4.32	2.67
6	1.76	5.37	2.67
7	3.80	4.60	3.13
8	2.60	5.45	2.43
9			3.40
10			3.68
n	8	8	10
Ort ± SH	3.4763 ± 0.4050	4.2188 ± 0.3220	3.0130 ± 0.1520



Şekil-11 : Kontrol grubu, Na-selenit grubu ve Na-selenit + amilorid grubu rat lenslerinde Ca^{+2} düzeylerinin karşılaştırılması.

Tablo-VIII : Lens Ca^{+2} düzeylerinin istatistiksel analizleri.

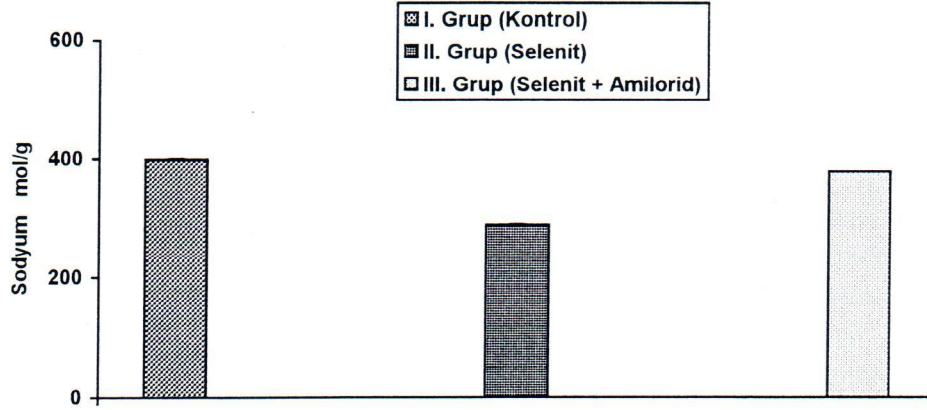
I. Grup-II. Grup	t = -1.44	p > 0.05
II. Grup-III. Grup	t = 3.62	p < 0.005
I. Grup-III. Grup	t = 1.17	p > 0.05

Lens Ca^{+2} düzeylerinde ; kontrol grubuna göre Na-selenit grubunda istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamazken, Na-selenit grubu ile Na-selenit + amilorid grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir (p < 0.005) (Tablo-VIII).

Çalışma gruplarında lens Na^{+} düzeyleri Tablo-IX'da ve Şekil-12'de gösterilmiştir.

Tablo-IX : Kontrol grubu, Na-selenit grubu ve Na-selenit + amilorid grubu rat lenslerinde Na⁺ düzeyleri (µmol/g yaş doku).

	I. GRUP Kontrol	II. GRUP Na-selenit	III. GRUP Na-selenit + amilorid
1	420	235	210
2	422	148	344
3	530	280	273
4	296	354	378
5	380	380	268
6	395	307	475
7	331	230	509
8	421	381	375
9			492
10			466
n	8	8	10
Ort ± SH	399.3750 ± 24.7213	289.3750 ± 29.1706	379.0000 ± 33.3023



Şekil-12 : Kontrol grubu, Na-selenit grubu ve Na-selenit + amilorid grubu rat lenslerinde Na⁺ düzeylerinin karşılaştırılması.

Tablo-X : Lens Na⁺ düzeylerinin istatistiksel analizleri.

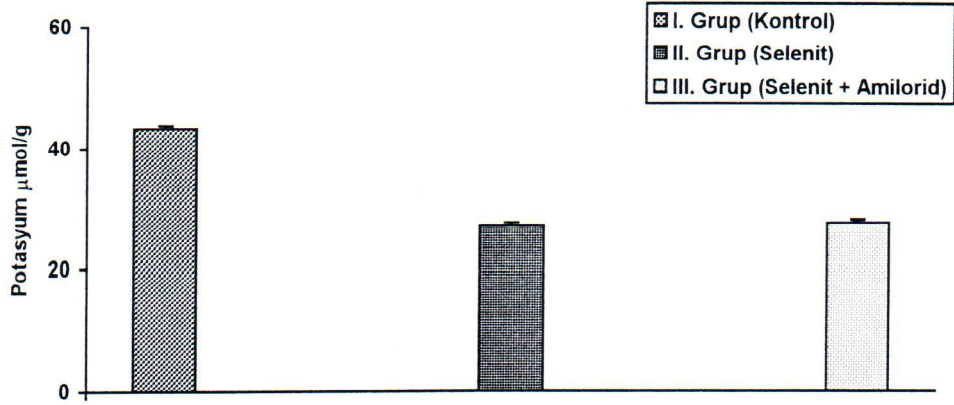
I. Grup-II. Grup	t = 2.88	p < 0.05
II. Grup-III. Grup	t = 1.968	p > 0.05
I. Grup-III. Grup	t = 0.469	p > 0.05

Lens Na⁺ düzeylerinde ; kontrol grubuna göre Na-selenit grubunda istatistiksel açıdan anlamlı (p < 0.05) bir azalma gözlenirken, Na-selenit grubu ile Na-selenit + amilorid grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo-X).

Çalışma gruplarında lens K⁺ düzeyleri Tablo-XI ve Şekil-13'de, istatistiksel değerlendirmesi Tablo-XII'de gösterilmiştir.

Tablo-XI : Kontrol grubu, Na-selenit grubu ve Na-selenit + amilorid grubu rat lenslerinde K⁺ düzeyleri (µmol/g yaş doku).

	I. GRUP Kontrol	II. GRUP Na-selenit	III. GRUP Na-selenit + amilorid
1	54.0	13.7	22.8
2	63.3	19.3	30.1
3	37.6	22.0	19.5
4	24.0	34.0	21.0
5	40.0	32.8	16.7
6	37.3	23.0	17.8
7	35.9	29.4	24.4
8	55.2	42.2	39.4
9			37.7
10			44.6
n	8	8	10
Ort ± SH	43.4125 ± 4.5564	27.0500 ± 3.2640	27.4000 ± 3.1507



Şekil-13 : Kontrol grubu, Na-selenit grubu ve Na-selenit + amilorid grubu rat lenslerinde K^+ düzeylerinin karşılaştırılması.

Tablo-XII : Lens K^+ düzeylerinin istatistiksel analizleri.

I. Grup-II. Grup	$t = 2.92$	$p < 0.01$
II. Grup-III. Grup	$t = 0.077$	$p > 0.05$
I. Grup-III. Grup	$t = 2.98$	$p < 0.01$

Lens K^+ düzeylerinde ; kontrol grubuna göre hem Na-selenit grubunda, hem de Na-selenit + amilorid grubunda istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p < 0.01$ ve $p < 0.01$) (Tablo-XII).

V. TARTIŞMA

Çevresel ve fotokimyasal nedenlerle primer olarak humor aközde oluşan serbest oksijen radikallerinin katarakt etiolojisinde önemli bir risk faktörü olduğu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir^{5, 7, 9, 16}. Lens yapılarında oksidatif hasar, öncelikle süperoksit radikali, H₂O₂, hidroksil radikali ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen türlerinin etkisiyle oluşur. Sürekli maruz kalınan ultraviyole ışık ile serbest radikallerin oluşumunun indüklenmesi sonrası meydana gelen peroksidasyon lensde opaklaşmaya neden olur^{3, 6}. Senil katarakt patogenezinde de fotooksidatif hasarın rol oynadığı gösterilmiştir¹³.

Selenitin kataraktojenik potansiyeli ilk kez 1978'de Ostadolova tarafından gösterilmiştir^{5, 7, 17, 18, 19}. Bu çalışmada 10 günlük ratlara 20-30 µmol/kg vücut ağırlığı dozunda Na-selenit enjekte edildiğinde 3-4 gün içerisinde bilateral nükleer opasite gelişmiştir¹⁹. Düşük miktarlarda selenyum glutatyon peroksidaz enzim yapısına katılarak antioksidan sistemde esansiyel rol oynarken, toksik miktarlarda oksidan etkili olduğu kanıtlanmıştır. Yüksek doz selenit uygulamasının humor aközde H₂O₂ oluşumunu, lens lipidlerinin peroksidasyonunu artırdığı tespit edilmiştir⁷. Yine redükte glutatyona selenoglutasyon (GS-Se-SG) şeklinde kovalan olarak bağlanarak, glutatyonun oksitlenmesine neden olduğu gösterilmiştir. Bunce ve Hess¹⁸ selenyum kataraktı modelinin biyokimyasal parametreleri üzerinde çalışmışlar ve enjeksiyondan 24 saat sonra lens glutatyon düzeylerinin 5 µmol/g'dan 2 µmol/g'a düştüğünü bulmuşlardır.

Selenitle indüklenmiş katarakta ve diğer katarakt türlerinde lens epitel hücreleri ve fibrilleri membranlarının permeabilitesinde ve membran transport sistemlerinde

değişiklikler olduğu gösterilmiştir^{18, 23}. Rasi ve arkadaşlarının²³ kataraktlı insan lensleri ile yaptıkları çalışmalarda lens K^+ düzeylerinde azalma ve Ca^{+2} düzeylerinde artış tespit etmişlerdir. Bunun sonucunda kataraktogenezisin mekanizmasına bu iki iyonun katıldığı ileri sürülmüştür.

David ve Shearer⁵⁵ yaptıkları çalışmalarda selenit enjeksiyonu sonrası nükleer kataraktın Ca^{+2} 'a bağımlı bir proteaz olan Calpain II aktivasyonu sonucu oluştuğunu göstermişlerdir. Calpain II aktivasyonu lens nükleusunda proteolizise ve irreversibl hasara neden olmuştur. Hem Calpain II aktivasyonu, hem de protein agregasyonu lens Ca^{+2} konsantrasyonunun artışına bağlıdır^{17, 55}. Selenyum kataraktı modeli üzerinde yapılan çalışmalar, Na-selenit enjeksiyonu sonrası 48. saatte en yüksek düzeyde olmak üzere lens Ca^{+2} konsantrasyonunun 3-5 katına çıktığını göstermiştir. Ca^{+2} 'un lens epiteli gibi eksitabl olmayan hücrelere girişi temel olarak nonspesifik katyon kanalları yoluyla ve hücre içi ile dışı arasındaki konsantrasyon gradientine bağlıdır. Bu gradientin sürdürülmesi plazma membranında gösterilmiş olan düşük kapasiteli ve yüksek afiniteli Ca^{+2} -ATPaz pompası ile düşük afiniteli fakat yüksek kapasiteli olan Na^+ - Ca^{+2} antiport sistemi tarafından hücre içi Ca^{+2} 'unun hücre dışına pompalanması ile sağlanır¹⁷.

Yapılan çalışmalar selenitle indüklenmiş kataraktlı lenslerde Ca^{+2} birikiminin hem hücre içine Ca^{+2} akışının artışı, hem de hücre dışına Ca^{+2} akışının azalması ile meydana geldiğini destekleyici sonuçlar vermiştir¹⁷. Na-selenit enjeksiyonundan 36 saat sonra lens membranının Ca^{+2} 'a geçirgenliğinin iki kattan fazla arttığı gösterilmiştir. Enjeksiyondan 48 saat sonra Na^+ - Ca^{+2} değişiminin belirgin şekilde azaldığı, Ca^{+2} -ATPaz aktivitesinin % 50-75 azaldığı gösterilmiştir. Enjeksiyondan 72 saat sonrasında bu olayların geri döndüğü, ancak bu arada lens Ca^{+2} 'unun 3-5 kat artarak özellikle nükleusta birikimin

meydana geldiği ileri sürülmüştür^{17, 19}. Ca^{+2} -ATPaz enziminin oksidatif strese proteinler ve lipid membranlara göre daha hassas olduğu ve daha erken dönemde aktivitesini kaybederek Ca^{+2} birikimine neden olduğu tespit edilmiştir¹⁸.

Selenit uygulaması sonrası lenste erken dönemde meydana gelen nükleer Ca^{+2} birikimi, selenyumun direkt oksidan etkisi yanında Calpain II'yi aktive ederek proteolizis sonucu katarakt oluşumuna neden olmaktadır^{17, 19}.

Çalışmamızda, Na-selenit grubunda bulunan 10 günlük ratlara 30 $\mu\text{mol/kg}$ vücut ağırlığı dozunda Na-selenit verildiğinde bütün ratlarda 3. günde nükleer katarakt gelişmiştir. 21 günlük deney protokolü sonrasında çıkartılan lenslerin dar ışıklı lamba ile görsel muayenesinde de hepsinde + ile 4+ arasında değişen derecelerde nükleer katarakt tespit edilmiştir. Cerrahi prosedür sonrası, aynı gün yapılan biyokimyasal analizlerinde aynı yaştaki kontrol grubu ratların lenslerine göre redükte glutatyon düzeylerinde anlamlı oranda düşme ($p < 0.001$) ve lipid peroksidasyonu göstergesi olan malondialdehit düzeylerinde anlamlı düzeyde yükselme ($p < 0.001$) olduğu tespit edilmiştir. Lens iyon analizlerinde ise yine Na-selenit grubunda Ca^{+2} düzeyleri (ortalama 4.2188 $\mu\text{mol/g}$), kontrol grubu Ca^{+2} düzeylerine (ortalama 3.4763 $\mu\text{mol/g}$) göre yüksek bulunmuştur. Fakat bu istatistiksel olarak anlamlı değildir. Buna karşılık Na-selenit grubunun hem Na^{+} düzeyleri ($p < 0.05$), hem de K^{+} düzeyleri ($p < 0.01$) kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Bu sonuçlara göre selenitin kataraktojenik etkisi oksidatif hasarın bir sonucu olarak ortaya çıkıyor gibi görünmektedir. Ayrıca lens K^{+} düzeylerinin düşük olması membranlarda peroksidatif hasara bağlı olarak iyon transportunun bozulduğunu göstermektedir. Na^{+} düzeylerinin düşük olması muhtemelen Na^{+} - Ca^{+2} antiport sisteminin inhibe olmasına ve hücre içi Na^{+} 'un tersine işleyen mekanizma ile kaybedilmesine bağlı

olabilir. Buna göre $\text{Na}^+-\text{Ca}^{+2}$ değişiminin inhibisyonu sonucu Ca^{+2} hücre içine girerken, Na^+ hücreden çıkmaktadır.

Selenit kataraktı modelinde birçok antioksidan etkili maddelerle tedaviler denenmiş ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Devamanoharon ve arkadaşları⁷ oksidatif stres hipotezine uygun olarak, ratlarda selenitle indüklenmiş katarakt modelinde askorbik asit ile katarakt gelişiminin önlediğini göstermişlerdir. Gupta ve Joshi⁵, selenyum kataraktı oluşturulmuş ratlarda naproksen-Na tedavisinin etkilerini araştırmışlar ve olumlu sonuçlar elde etmişlerdir. Yine 1992'de Wang ve arkadaşları¹⁶, selenyum kataraktında, bir demir şelatörü olan desferoksaminin katarakt oluşumunu önlediğini göstermişlerdir.

Bu çalışmamızda ayrıca selenit kataraktı modeli kullanarak amiloridin olası antikatarakt etkisini incelemeyi amaçladık. Amilorid, eksitabl olmayan hücrelerde $\text{Na}^+-\text{Ca}^{+2}$ antiportunu inhibe eden bir maddedir. Tedavi grubumuz olan üçüncü grup ratlara 30 $\mu\text{mol/kg}$ vücut ağırlığı dozunda Na-selenitle birlikte 1 $\mu\text{mol/kg}$ dozunda amilorid subkutan olarak yapılmıştır. Üç haftalık süre sonunda lenslerin görsel muayenesinde Na-selenit grubuna göre çok daha az oranda kataraktlı lensler tespit edilmiştir. Ratların çoğunda katarakt oluşumu önlenmiştir. Biyokimyasal incelemede lens redükte glutatyon düzeylerinde, kontrol grubuna göre daha düşük kalmakla birlikte, Na-selenit grubuna göre anlamlı bir artış ($p < 0.05$) ve malondialdehit düzeylerinde ise, yine kontrol grubuna göre daha yüksek olmakla birlikte, anlamlı bir azalma ($p < 0.001$) tespit edilmiştir. GSH ve MDA düzeylerindeki değişiklikler, amiloridin lensdeki peroksidatif hasarı olumlu yönde azalttığını göstermektedir.

Na-selenit + amilorid grubunda, Na-selenit grubuna göre K^+ düzeylerinde değişiklik olmamıştır. Bu sonuçlar amiloridin lensde K^+ düzeylerine bir etkisinin

olmadığını göstermektedir. Na-selenit + amilorid grubunda lens Na^+ 'u (ortalama 379 $\mu\text{mol/g}$), Na-selenit grubuna göre (ortalama 289.375 $\mu\text{mol/g}$) daha yüksek bulunmuştur. Fakat bu istatistiksel açıdan anlamlı değildir. Na-selenit + amilorid grubunda Ca^{+2} düzeyleri Na-selenit grubuna göre anlamlı olarak ($p < 0.005$) düşük bulunmuştur. Amilorid tedavi grubunda elde edilen Na^+ ve Ca^{+2} düzeyleri amiloridin lens Ca^{+2} 'unu azaltıcı yönde etki ettiğini ve kataraktı muhtemelen bu şekilde önlediğini göstermektedir. Amilorid, selenyumun etkisiyle inhibe olarak tersine çalışan $\text{Na}^+-\text{Ca}^{+2}$ antiport sistemini bloke ederek, hücre içinden Ca^{+2} 'un atılımını ve hücre içine Na^+ 'un girişini sağlayıp, bu şekilde Ca^{+2} 'un kataraktojenik etkisini önleyebilir.

Lenslerin muayene bulguları ve biyokimyasal değişiklikler selenyum kataraktının önlenmesinde amiloridin olumlu etkileri olduğunu göstermiştir. Ancak amiloridin etki mekanizmasının açıklanmasında daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Ayrıca çalışmalarımız, katarakt patogenezinde Ca^{+2} dengesinin ve oksidasyonun rolünün açıklanmasında daha ileri çalışmalar için Na-selenit katarakt modelinin uygun olduğunu göstermiştir. Çünkü yüksek doz selenitle katarakt indüksiyonu 3-5 gün gibi kısa bir sürede meydana gelmekte ve akut stres altında kısa sürede deneyin tamamlanmasına izin vermektedir.

VI. ÖZET

Çevresel nedenlerle ve fotokimyasal olarak humor aközde serbest oksijen radikallerinin oluşumu, katarakt patogeneğinde en önemli risk faktörüdür. Lenste ve diğer oküler dokularda bulunan antioksidan savunma sistemleri lensi serbest oksijen radikallerinin toksik etkilerine karşı koruyarak bir denge oluştururlar. Çeşitli sebeplerle bu denge bozulduğunda lenste peroksidatif hasar başlar ve katarakt oluşumuna neden olur.

Yüksek doz Na-selenit, yavru ratlarda toksik etki göstererek 3-4 gün gibi kısa bir süre içinde nükleer katarakt gelişimine neden olur. Kataraktın, yüksek doz selenyumun oksidan etkisine bağlı olarak hücre membranlarında Na^+-Ca^{+2} değişiminin ve Ca^{+2} -ATPaz pompasının inhibe olması sonucu 3-4 kat artan Ca^{+2} 'un proteolitik enzimleri aktive etmesiyle oluştuğu gösterilmiştir. Na-selenit katarakt modeli kullanılarak birçok antioksidan maddenin kataraktı önleyici etkisi araştırılmıştır.

Bu çalışmada Na-selenit kataraktı oluşturulan ratlarda bir Na^+-Ca^{+2} değişimi blokeri olan amiloridin, kataraktı önleyici etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla kontrol, Na-selenit, Na-selenit + amilorid gruplarının lenslerinde antioksidan sistemin göstergesi olarak redükte glutatyon, lipid peroksidasyonunun son ürünü olarak malondialdehit, Ca^{+2} , Na^+ ve K^+ düzeyleri incelenmiştir.

Na-selenit grubu ile karşılaştırıldığında amilorid tedavisi sonrası rat lenslerinde redükte glutatyon düzeyleri anlamlı olarak yüksek ($p < 0.05$), malondialdehit düzeyleri anlamlı olarak düşük ($p < 0.001$) ve yine Ca^{+2} düzeyleri anlamlı olarak düşük ($p < 0.005$) bulunmuştur.

Bu olumlu bulgular sonucunda kataraktın önlenmesinde amilorid tedavisinin faydalı olabileceği, ancak amiloridin etki mekanizmasının açıklanmasında yeni çalışmaların gerekli olduğu kanısına varılmıştır.

VII. SUMMARY

A common risk factor in the etiology of cataract is the generation of oxygen free radicals in aqueous humor with the result of ambient and photochemical events. Lenses and the other ocular tissues are capable of inactivating toxic oxygen radicals with their own antioxidant systems. Any reasons that cause metabolic imbalance in these antioxidant systems produce the peroxidative damage in the lens leading to cataract pathogenesis. It has been shown that high doses of Na-selenite causes nuclear cataract in rat pups. It has been proposed that cataract was produced by the oxidant stress caused by high doses of selenium. The inhibition of the Ca^{+2} -ATPase with the peroxidative stress alters the balance of intra and extracellular Na^{+} - Ca^{+2} and intracellular Ca^{+2} increases as three or four fold where it activated the cellular proteolytic enzymes. With Na-selenite cataract model many antioxidants were investigated in view of their protective effects.

We investigated the cataract preventive effect of amiloride, a Na^{+} - Ca^{+2} change blocker, in rats with experimental cataract induced by Na-selenite. Na^{+} , Ca^{+2} and K^{+} levels were measured in order to investigate the changes in electrolyte balance. Reduced glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) were measured as a natural antioxidant and as a product of lipid peroxidation respectively.

After amiloride treatment GSH levels were significantly high ($p < 0.05$), MDA and Ca^{+2} levels were significantly low ($p < 0.001$, $p < 0.005$) compared with the untreated group.

It has been concluded that amyloride treatment could aid in the prevention of cataract provided that further studies should be done in order to highlight the mechanism of action of this agent.

VIII. KAYNAKLAR

1. Elstner E.F. : Oxygen Radicals-Biochemical Basis for Their Efficacy. *Klin. Wochenschr.*, 1991 ; 69(21-23) : 949-956.
2. Bingöl F., Aydın S., Açıkgöz Ş. : Serbest Radikaller, *Ankara Hastanesi Tıp Dergisi*, 1993 ; 28(1) Suppl. 1.
3. Mittag T. : Role of Oxygen Radicals in Ocular Inflammation and Cellular Damage. *Exp. Eye Res.*, 1984 ; 39 : 759-69.
4. Knekt P., Heliövaara M., Rissanen A., Aromaa A., Aaran R.K. : Serum Antioxidant Vitamins and Risk of Cataract. *BMJ*, 1992 ; 305(5) : 1392-1394.
5. Gupta S.K., Joshi S. : Role of Naproxen as Anti-Oxidant in Selenite Cataract. *Ophthalmic Res.*, 1994 ; 26 : 226-231.
6. Bhat K.S., John A., Reddy P.R. : Effect of Pigmentation on Glutathione Redox Cycle Antioxidant Defense in Whole as Well as Different Regions of Human Cataractous Lens. *Exp. Eye Res.*, 1991 ; 52 : 715-721.
7. Devamanoharan P.S., Henein M., Morris S., Ramachandran S., Richards R.D., Varma S.D. : Prevention of Selenite Cataract by Vitamin C. *Exp. Eye Res.*, 1991 ; 52 : 563-568.
8. Fecondo J.V. and Augusteyn R.C. : Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase in the Human Cataractous Lens. *Exp. Eye Res.*, 1983 ; 36 : 15-23.
9. Babizhayev M.A. : Lens Opacity Induced by Lipid Peroxidation Products as a Model of Cataract Associated with Retinal Disease. *Bioch. Biophys. Acta*, 1989 ; 1004 : 124-133.
10. Reddy V.N. : Glutathion and Its Function in the Lens, An Overview. *Exp. Eye Res.*, 1990 ; 51 : 771-78.
11. Cotlier E. : The Lens. In : *Adler's Physiology of the Eye Clinical Application*, Moses A.R. (Eds.), The C.V. Mosby Comp., St. Louis, 1987 ; 269-288.
12. David A., Rabb M.F. : Lens and Pathophysiology of Intraocular Lenses. In : *Ocular Pathophysiology*. Mosby-Year Book, St. Louis, 1991 ; 112-116.
13. Nutritional Aspect of Ambulatory Care, Oxygen Radicals and Disease-No : 2, Cataracts. *Ophthalmology*, 1992 ; 99(2) : 17A-18A.
14. Pau H., Graf P., Sies H. : Glutathione Levels In Human Lens : Regional Distribution in Different Forms of Cataract. *Exp. Eye Res.*, 1990 ; 50 : 17-20.

15. Epstein D.L., Kater A.W., Lou M., Patel J. : Influences of Glutathione and Sulfhydryl Containing on Aqueous Humor Outflow Function. *Exp. Eye Res.*, 1990 ; 50 : 785-793.
16. Wang Z., Hess J.L., Bunce G.E. : Deferoxamine Effect on Selenite-Induced Cataract Formation in Rats. *Investigative Ophthalmology*, 1992 ; 33(8) : 2511-2519.
17. Wang Z., Hess J.L., Bunce G.E. : Calcium Efflux in Rat Lens : Na/Ca Exchange Related to Cataract Induced by Selenite. *Curr. Eye Res.*, 1992 ; 11(7) : 625-632.
18. Bunce G.E., Hess J.L., Batra R. : Lens Calcium and Selenite-Induced Cataract. *Curr. Eye Res.*, 1984 ; 3(2) : 316-320.
19. Wang Z., Bunce G.E., Hess J.L. : Selenite and Ca^{+2} Homeostasis in the Rat Lens : Effect on Ca-ATPase and Passive Ca^{+2} Transport. *Curr. Eye Res.*, 1993 ; 12(3) : 213-218.
20. Tomlinson J., Bannister S.C., Croghan P.C., Duncan G. : Analysis of Rat Lens $^{45}Ca^{+2}$ Fluxes : Evidence for Na^{+} - Ca^{+2} Exchange. *Exp. Eye Res.* 1991 ; 52(5):619-27.
21. Mibu H., Nagata M., Hikida M. : A Study on Lipid Peroxide-Induced Lens Damage In Vitro. *Exp. Eye Res.*, 1994 ; 58 : 85-90.
22. Highrower K.B., Mc Creaddy J.P. : Effect of Selenium on Ion Homeostasis and Transparency in Cultured Lenses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1989 ; 30 : 171-175.
23. Rasi V., Costantini S., Moramarco A., Giordano R., Giustolisi R., Balacco C.G. : Inorganic Element Concentrations in Cataractous Human Lenses. *Ann. Ophthalmol.*, 1992 ; 24 : 459-464.
24. Huang L.L., Zhang C.Y., Hess J.L., Bunce G.E. : Biochemical Changes and Cataract Formation in Lenses from Rats Receiving Multiple, Low Doses of Sodium Selenite. *Exp. Eye Res.*, 1992 ; 55(5) : 671-678.
25. Basaga H.S. : Biochemical Aspects of Free Radicals. *Biochem. Cell. Biol.*, 1990 ; 68 : 989-998.
26. Hinder R.A., Stein H.J. : Oxygen-Derived Free Radicals. *Arch. Surg.*, 1981 ; 126 : 104-105.
27. Uygur T. : Organik Kimya-1, Temel Kavramlar, AITIA Basımevi, 1981, 6-9.
28. Mc Cord J.M. : The Superoxide Free Radicals : Its Biochemistry and Pathophysiology. *Surgery*, 1983 ; 94 : 412-414.
29. Saran M., Bors W. : Direct and Indirect Measurement of Oxygen Radicals. *Klin. Wochenschr.*, 1991 ; 69 : 957-964.
30. Dormandy T.L. : An Approach to Free Radicals. *The Lancet*, October 29 : 1983, 1010-1014.

31. Sinclair A.J., Barnett A.H., Lunec J. : Free Radicals and Antioxidant Systems in Health and Disease. *British Journal of Hospital Medicine*, 1990 ; 43 : 334-344.
32. Gutteridge J.M.C. : Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clin. Chem.*, 1995 ; 41(42) : 1819-1828.
33. Southorn P.A., Powis G. : Free Radicals in Medicine. II. Involvement in Human Disease. *Mayo Clin. Proc.*, 1988 ; 63 : 390-408.
34. Sies H. : Role of Reactive Oxygen Species in Biological Processes. *Klin. Wochenschr.*, 1991 ; 69 : 965-968.
35. Ondrus P., Alberty R., Vassanyiova Z. : Importance of Lipid Peroxidation, Protective Enzymes and Trace Elements in Chronic Leg Ischemia. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1996 ; 34 : 471-475.
36. Gutteridge J.M.C., Halliwell B. : The Measurement and Mechanism of Lipid Peroxidation in Biological Systems. *TIBS*, 15, April 1990, 129-134.
37. Uchiyama M., Mihara M. : Determination of Malondialdehyde Precursor in Tissues by Thiobarbituric Acid Test. *Analytical Biochemistry*, 1978 ; 86 : 271-278.
38. Jentzsch A.M., Bachmann H., Fürst P., Biesalski H.K. : Improved Analysis of Malondialdehyde in Human Body Fluids. *Free Radical Biology and Medicine*, 1996 ; 20(2) : 251-256.
39. Murray R.K., Mayes P.A., Granner D.K., Rodwell V.W. : *Harper's Biochemistry*, Appleton and Lange, 22nd Ed., 1990, 181-183, 143, 144, 814, 455-459.
40. Rao N.A. : Oxygen Free Radicals and Retinopathy of Prematurity. *British Journal of Ophthalmology*, 1996 ; 80 : 387.
41. Augustin M.S., Sekundo W., Koch F., Lutz J., Meiler D., Grus F.H., Wegener A. : Effect of Allopurinol and Steroids Inflammation and Oxidative Tissue Damage in Experimental Lens Induced Uveitis : a Biochemical and Morphological Study. *British Journal of Ophthalmology*, 1996 ; 80 : 451-457.
42. Dormandy T.L. : Free Radical Oxidation and Antioxidants. *The Lancet*, March 25, 1978 ; 647-650.
43. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. : The Antioxidant of Human Extracellular Fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1990 ; 280 : 1-8.
44. Hoffman D.J., Heinz G.H., Krynitsky A.J. : Hepatic Glutathione Metabolism and Lipid Peroxidation in Response to Excess Dietary Selenomethionine and Mallard Ducklings. *Journal Of Toxic. and Env. Health*, 1985 ; 27 : 263-271.
45. Bhagavan N. : *Medical Biochemistry*, Jones and Bartlett Pub., Boston, 1992, 260-283, 323-324, 350-351.

46. Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M. : Principles of Biochemistry, Worth Pub. Inc., New York, 2nd Ed., 1993 ; 712-724.
47. Zubay G. : Biochemistry, Wm. C. Brown Pub., Dubuque, 3rd Ed., 1993, 540-543, 931-959.
48. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. : Molecular Biology of the Cell, 3rd ed., Garland Publishing, New York, 1993, 508-547.
49. Rawn J.D. : Biochemistry, Int. Ed., Neil Patterson Publishers, North Carolina, 1989 ; 1025-1048.
50. Reeves J.P. : Molecular Aspects of Sodium-Calcium Exchange, Archives of Biochemistry and Biophysics, 1992 ; 292(2) : 329-334.
51. Hardman J.G., Limbird L.E. : Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Int Ed., Mc Graw-Hill Comp., Dallas, 1996, 704-706.
52. Ellman G.L. : Tissue Sulfhydryl Groups. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1959 ; 82 : 70-77.
53. Sedlak J., Lindsay H. : Estimation of Total, Protein-Bound and Nonprotein Sulfhydryl Group in Tissue with Ellman's Reagent. Analytical Biochemistry, 1968 ; 25 : 192-205.
54. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. : Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. Analytical Biochemistry, 1979 ; 95 : 351-358.
55. David L.L., Shearer T.R. : Calcium-Activated Proteolysis in the Lens Nucleus During Selenite Cataractogenesis. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1984 ; 25 : 1275-1283.