

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

137956

İNTAKT VE ADRENALEKTOMİLİ SIÇANLARIN ERİTROSİT VE
MİDE DOKULARINDA OKSİDAN VE ANTİOKSİDAN
PARAMETRELERİN ARAŞTIRILMASI

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
BOKÜMANTASYON MERKEZİ

Dr. Abdülkadir YILDIRIM

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Yaşar Nuri ŞAHİN

Uzmanlık Tezi

ERZURUM 2003

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Adrenal Gland (Böbreküstü Bezi)	3
2.1.1. Adrenal Korteks Hormonları	4
2.1.1.1. Glikokortikoidler	5
2.1.1.1.1. Biyosentezi	5
2.1.1.1.2. Metabolizması	6
2.1.1.1.3. Etkileri	7
2.1.1.2. Mineralokortikoidler	8
2.1.1.2.1. Biyosentezi	8
2.1.1.2.2. Metabolizması	8
2.1.1.2.3. Etkileri	9
2.1.1.3. Adrenal androjenler	9
2.1.1.3.1. Biyosentezi	9
2.1.1.3.2. Metabolizması	10
2.1.1.3.3. Etkileri	10
2.1.2. Adrenal Medulla Hormonları	11
2.1.2.1. Biyosentezleri	11
2.1.2.2. Metabolizmaları	11
2.1.2.3. Etkileri	12
2.2. Serbest Radikaller	13
2.2.1. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri	14
2.2.1.1. Superoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)	15
2.2.1.2. Nitrik Oksit ($NO^{\cdot}$)	15
2.2.1.3. Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot}$)	15
2.2.1.4. Singlet Oksijen (1O_2)	16
2.2.1.5. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	16
2.2.1.6. Diğer Radikaller	16

2.2.2. Serbest Radikallerin Kaynakları	16
2.2.3. Serbest Radikallerin Organizmadaki Etkileri	19
2.2.3.1. Membran Lipidlerine Etkileri	19
2.2.3.2. Proteinlere Etkileri	20
2.2.3.3. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri	20
2.2.3.4. Karbonhidratlara Etkileri	21
2.2.3.5. Hücre dışı Etkileri	21
2.2.4. Serbest Radikallerin Rol Oynadığı Patolojik Durumlar	21
2.2.5. Antioksidan Savunma Sistemleri	22
2.2.5.1. Superoksid Dismutaz	22
2.2.5.2. Glutasyon Peroksidaz	24
2.2.5.3. Glutasyon	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1 Gereç	27
3.1.1. Cerrahi Prosedür	27
3.1.2. Numunelerin Hazırlanması	26
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	28
3.2. Yöntemler	29
3.2.1. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesinin Tayini	29
3.2.2. Superoksid Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini	30
3.2.3. Glutasyon Tayini	32
3.2.4. Malondialdehid (MDA) Tayini	33
3.2.5. Hemoglobin Tayini	35
3.2.6. Bradford Metodu ile Protein Tayini	35
3.3. İstatistiksel Analizler	37
4. BULGULAR	38
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	51
7. KAYNAKLAR	52

ONAY

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Kurulu'nun 10.12.2001 tarihli toplantısında; "İntakt ve Adrenalektomili Sıçanların Eritrosit ve Mide Dokularında Oksidan ve Antioksidan Parametrelerin Araştırılması" başlıklı konunun Dr. Abdülkadir YILDIRIM'a uzmanlık tezi olarak verilmesine ve tez yönetiminin Prof. Dr. Yaşar Nuri ŞAHİN tarafından yürütülmesine karar verildi. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 02.05.2002/9 tarih ve sayılı kararıyla ilgili tezin etik kurul onayı alındı ve Temel Tıp Bilimleri Bölümü'nün 25.03.2003/6 tarih ve sayılı kararıyla tez konusu olarak kabul edilmesine karar verildi.



TEŞEKKÜR

Hoşgörü, emek ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, tezimin hazırlanmasında bilgi ve deneyimleri ile bana büyük katkıda bulunan tez hocam Sayın Prof. Dr. Yaşar Nuri ŞAHİN'e, ayrıca ihtisasım süresince değerli bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım hocalarım; Sayın Prof. Dr. Ebubekir BAKAN, Prof. Dr. Nuri BAKAN, Prof. Dr. Fatih AKÇAY, Prof. Dr. Leyla YILDIZ, Doç. Dr. Sevinç KUŞKAY, Doç. Dr. Ahmet KIZILTUNÇ, Doç. Dr. Zuhai UMUDUM, Doç. Dr. Hülya AKSOY, Yrd. Doç. Dr. Sait KELEŞ'e, deney aşamasında yardımlarını esirgemeyen Fizyoloji AB Dalı öğretim üyelerinden Sayın Yrd. Doç. Dr. Kenan GÜMÜŞTEKİN'e, Anabilim Dalımızdan Sayın Arş. Gör. Dr. Ramazan MEMİŞOĞULLARI, Arş. Gör. Dr. Gülnaz ÇELİK ve diğer tüm mesai arkadaşlarıma, ayrıca tezimin oluşmasındaki katkılarından dolayı Farmakoloji AB Dalı öğretim üyelerinden Sayın Yrd. Doç. Dr. Halis SÜLEYMAN ve deney esnasındaki yardımlarından dolayı Sayın Arş. Gör. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'na, hoşgörü ve desteği ile daima yanımda olan eşim Dr. Serap YILDIRIM'a sonsuz teşekkürlerimle.

Dr. Abdülkadir YILDIRIM

ÖZET

Normal metabolik reaksiyonların işleyişi esnasında sürekli olarak az miktarda oluşan serbest radikaller, hücre içi ve dışı çeşitli antioksidan moleküllerle belli bir optimal düzeyde tutulurlar. Serbest radikallerin aşırı artışı ve / veya antioksidan sistemlerdeki bir yetersizliğin ve stres hormonlarının, gastrik hastalıklar dahil (ülser, kanser vs.) bir çok hastalığın etyopatogenezinde rol aldığı kabul edilmektedir. Bu çalışmada normal bir adrenal bezin eritrosit ve mide dokusundaki oksidan (MDA) ve antioksidan enzimler (GPx, SOD ve GSH) üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

230 ± 20 gr ağırlığında 33 adet albino Wistar cinsi dişi sıçan; kontrol (grup I), yalancı operasyon (grup II) ve adrenalektomili grup (grup III) olmak üzere rasgele üç gruba bölündü. Grup II ve III'e uygulanan operasyonun 8. günü bütün gruplardaki hayvanlardan intrakardiyak kan alındıktan sonra, hayvanlar dekapitasyonla öldürüldü ve hemen biyokimyasal analizler için mide dokuları alındı.

Mide dokusunda ölçülen GPx ve SOD aktiviteleri ($p < 0.05$, her ikisi için) ve MDA düzeyi yalancı operasyon grubu ile karşılaştırıldığında adrenalektomili grupta anlamlı derecede düşük ($p < 0.01$), GSH düzeyleri ise yüksek bulundu ($p < 0.05$). Eritrositlerde ölçülen GSH düzeyi grup II ile karşılaştırıldığında grup III'de anlamlı derecede yüksek ($p < 0.05$), MDA düzeyi ise düşük bulundu ($p < 0.05$). Grup III'de ölçülen eritrosit ve mide dokusundaki GPx, SOD, GSH ve MDA düzeyleri grup I ile karşılaştırıldığında, gruplar arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı değildi.

Adrenalektomi, adrenal kaynaklı bir veya birden çok faktörün etkisi ile, eritrosit ve mide dokusundaki strese karşı normal antioksidan cevabı zayıflatmaktadır. Adrenal kaynaklı hormonlar farklı dokularda metabolizmayı çok yönlü etkileyebileceğinden, stres oluşumu mekanizmasını açıklayabilmek için adrenal kaynaklı faktörlerle oksidan-antioksidan moleküller arasındaki ilişkiyi daha net ortaya koyabilmek için spesifik fakat kapsamlı deney protokolleri gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: adrenalektomi, oksidatif stres, antioksidanlar, gastrik ülser

ABSTRACT

During normal metabolic reactions in body, free radicals produced little and continuously are in optimal levels with extracellular and intracellular antioxidant molecules. It has been believed that overproducing of free radicals and/or deficiency of antioxidant systems, and stress hormones play a role in etiopathogenesis of many diseases such as ulcer and cancer. In this study, it was aimed that effect of a normal adrenal gland on oxidant and antioxidant enzymes was investigated in gastric tissue and erythrocyte.

A total of 33 Wistar albino female rats, weighing 230 ± 20 gr were used in this study. Animals were grouped as control (group I), sham operation (group II), adrenalectomized group (group III). Eight days after operation on group II and III, intracardiac blood was withdrawn from each animal in all groups. Animals were killed by decapitation and stomachs were removed for biochemical analyzes.

GPx, SOD activities ($p < 0.05$) and MDA levels were compared with sham operation group in a gastric tissue. It was seen that these levels were significantly low ($p < 0.01$) and GSH levels were high ($p < 0.05$). GSH levels in erythrocyte were compared with group II, and it was significantly high ($p < 0.05$) in group III, while MDA levels were low ($p < 0.05$). In group III, GPx, SOD, GSH and MDA levels of gastric tissue and erythrocyte were compared with group I. There was no statistically significant difference among groups.

Adrenalectomy reduces normal antioxidant response to stress in gastric tissue and erythrocyte via much factor resulting from adrenal gland. Adrenal hormones affect metabolism versatility. For this reason specific and comprehensive studies are needed to elucidate exactly mechanism of stress formation and relation between adrenal factors and oxidant-antioxidant molecules.

Key words: adrenalectomy, oxidative stress, antioxidants, gastric ulcer

KISALTMALAR

CBG: Kortizol Bağlayıcı Globulin

DHEA: Dehidroepiandrosteron

ER: Endoplazmik retikulum

GPx: Glutasyon peroksidaz

GSH: Redükte glutasyon

H₂O₂: Hidrojen peroksit

MDA: Malondialdehid

MT: Mitokondri

NO[•]: Nitrik oksit

O₂^{•-}: Superoksit radikali

OH[•]: Hidroksil radikali

¹O₂: Singlet oksijen

PUFA: Poliansatüre yağ asidi

ROT: Reaktif oksijen türleri

SOR: Serbest oksijen radikalleri

SOD: Superoksid dismutaz

XO: Ksantin oksidaz

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Serbest radikaller bir veya daha fazla paylaşılmamış elektron içeren, oldukça reaktif atom veya moleküllerdir (1). Biyolojik sistemlerdeki en önemli radikaller, hem fizyolojik hem de fizyolojik olmayan şartlarda çeşitli biyokimyasal reaksiyonlar esnasında oluşan serbest oksijen radikalleri (SOR) dir (2). Normal koşullarda SOR, intrasellüler ve ekstrasellüler ortamda bulunan superoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzimler ile ve/veya glutatyon, albumin, serüloplazmin, ferritin, vitamin A, C ve E gibi enzim olmayan antioksidan özelliğe sahip maddelerle belli bir optimal düzeyde tutulmaktadır (3-5).

SOR'nin aşırı artışı veya antioksidan sisteminde yetersizliğin kanser (6), ateroskleroz (7), kardiyο-serebrovasküler hastalıklar (8, 9), gastrik ülser (10) gibi bir çok hastalığın etyopatogenezinde rol aldığı kabul edilmektedir. Bununla birlikte SOR'nin sebep olduğu gastrik mukozal hasarın mekanizması tam olarak bilinmiyor.

Herhangi bir nedenle artmış SOR, poliansatüre yağ asitleri, sülfür içeren amino asitli proteinler ve nükleik asitlerle kolayca reaksiyona girerler (11). Bu durum biyolojik membranların yapısını bozarak epitel ve endotelin bariyer özelliğini olumsuz yönde etkileyebilir. Buna ilaveten artmış SOR, antioksidan enzimlerin inaktivasyonuona yol açarak da bu sürecin hızlanmasını sağlayabilir. Ayrıca SOR, arasıdonik asit metabolizmasının ürünleri ile etkileşerek tromboksan oluşumunu stimüle eder ve oluşan tromboksan mukozal ve submukozal damarları kontrakte ederek kan akımını engelleyen sekonder bir mekanizmayla gastrik hasar oluşumunu kolaylaştırabilir (12).

Endojen antioksidan moleküllerin, akut gastrik mukozal hasarın oluşumuna karşı önemli koruyucu özellik gösterdiği ifade edilmektedir. Endojen bir antioksidan olan redükte glutatyon (GSH), özellikle insan ve sıçanların gastrik mukozasında yüksek konsantrasyonlarda bulunur (13-15). GSH, proteinlerin – SH gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı koruyarak mukozal bütünlüğün sağlanmasında önemli rol oynar (16, 17). Endojen sülfidril konsantrasyonunun azaldığı durumlarda gastrik mukus hücrelerinin serbest oksijen radikallerine ve gastrik asit salgısına karşı hassasiyetlerinin arttığı değişik çalışmalarda ifade edilmiştir (15, 17, 18).

İnsan gastrik mukozasında, superoksit radikallerini hidrojen peroksit (H₂O₂) dönüştüren, hem mitokondrial Mn-SOD hem de sitozolik Cu,Zn-SOD enzimleri ve oluşan H₂O₂'leri metabolize eden GPx ve KAT enzimleri bulunur (19). Yapılan bir klinik çalışmada, gastrik ülserli dokuda, GPx ve SOD aktiviteleri ve GSH düzeyinin azaldığı, buna karşılık lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak ölçülen tiobarbutirik asit

reaktif substansları (TBARS)'nın kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı ifade edilmiştir (20).

Endokrin sistemdeki uygun işlerliğin ve karşılıklı etkileşimin sağlanması, homeostatik dengenin korunmasında en önemli faktörlerden biridir. Adrenal bez, metabolizmada son derece önemli fonksiyonları olan kortizol, aldosteron, adrenalın, noradrenalin ve dopamin gibi moleküllerin sentez edildiği hayati öneme sahip bir organdır. Bilindiği gibi fiziksel ve emosyonel travma, ağır infeksiyonlar, sepsis ve cerrahi girişimler gibi, stres oluşturan bir çok durumda özellikle adrenal korteks salgıları büyük rol oynamaktadır (21-23). Stres durumlarında sempatik sinir sisteminin uyarılmasıyla adrenal medulla salgılarının artması sonucu plazma katekolamin düzeyleri yükselir. Katekolaminlerin oksidasyonu ise serbest radikal kaynağıdır (24, 25).

Glukokortikoidlerin, kortikosteroid reseptörleri bulunduran periferel dokularda antioksidan enzimler için düzenleyici bir faktör olduğu çeşitli çalışmalarda ifade edilmektedir (26-29). Yapılan bir çalışmada, adrenomedülektomili sıçanların peritoneal makrofaj hücrelerinde, SOD ve GPx aktiviteleri ve H₂O₂ üretiminin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde düştüğü, bu düşüşün deksametazon verilen grupta daha az olduğu ifade edilmiş ve bu hücrelerde glukokortikoidler ve adrenalinin, antioksidan enzim aktivitelerini fizyolojik olarak regüle edebileceği ifade edilmiştir (30). Adrenalektomili sıçanlar üzerinde yapılan bir başka çalışmada, subkutan glukokortikoid enjeksiyonunun (10 mg/kg), beyin dokusunda antioksidan defans sistemini zayıflattığı, karaciğer dokusunda ise SOD aktivitesini artırırken, GPx aktivitelerini azalttığı belirtilmiştir (31).

Endojen stres hormonlarını uzaklaştırmak amacıyla adrenalektomi yapılan veya intakt deney hayvanlarına çeşitli ülser oluşturunu modeller (etanol ya da indometasin verilmesi, soğukta tutma vs.) uygulanarak, stresle ilgili gastrik lezyonların gelişimi sürecinde adrenal hormonların rolü ve keza gastrik ülser oluşumu üzerine serbest radikaller ve antioksidan moleküllerin etkileri incelenmiş olmakla beraber (10, 32-34), yaptığımız literatür taramalarında adrenal bezin mide dokusundaki antioksidan savunma sistemleri üzerine olan etkilerini araştıran literatüre rastlanmamıştır. Bu çalışmada eritrosit ve mide dokusunda, oksidan ve antioksidan sistemler üzerine normal bir adrenal bezin fizyolojik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Adrenal Gland (Böbreküstü Bezi)

Böbreküstü bezi, sağ ve sol böbrek üzerinde, karın arka duvarına yaslanmış olarak duran, retroperitoneal yerleşimli bir çift iç salgı organıdır. Embriyolojik gelişim ve fonksiyonları bakımından birbirinden tamamen farklı korteks ve medulla kısımlarından oluşur (Şekil 2. 1). Adrenal korteks, fetal hayatın 4-6. haftalarında çölemik epitelden (mezodermden) gelişirken, medulla kısmı embriyolojik oluşumun 7. haftasında nöral krest'ten (nöroektodernden) gelişir. Adrenal medullayı oluşturmak üzere kortekse doğru göç eden bu hücreler feokromablastlara ve sempatoblastlara farklılaşırlar. Feokromablastlardan katekolaminleri (adrenalin, noradrenalin ve dopamin) sentezleyen medullanın kromaffin hücreleri, sempatoblastlardan ise sempatik ganglion hücreleri gelişir (35).

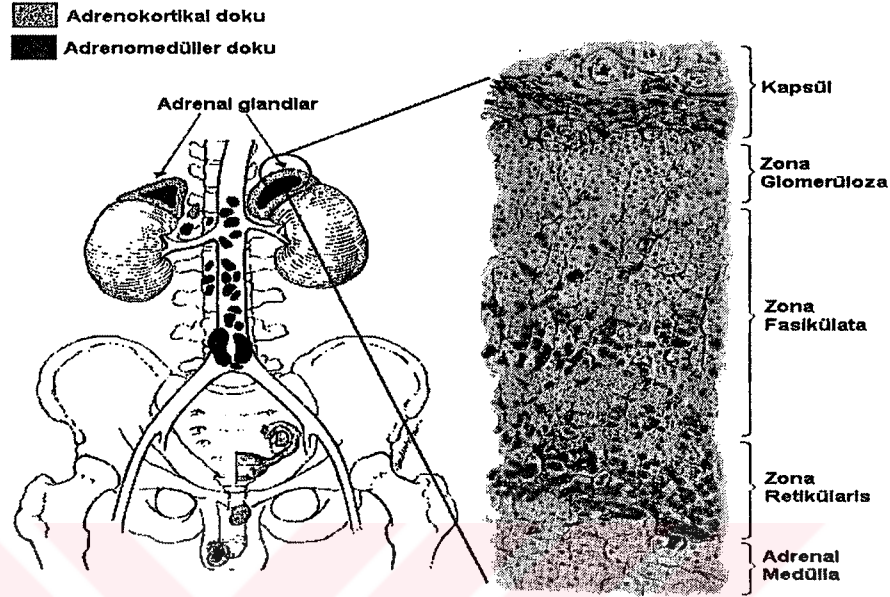
Çoğu memelilerde böbreküstü bezinin dörtte üçünü oluşturan adrenal korteks, sahip olduğu hücre kümelerine göre üç tabakaya ayrılır (Bkz. Şekil 2. 1):

1. **Zona Glomeruloza (ZG):** Bu tabaka kapsülün hemen altında yer alır ve aldosteron salgılayan hücreler ihtiva eder. Bu hücrelerin sekresyonları ekstrasellüler sıvıdaki anjiyotensin II ve potasyum konsantrasyonları tarafından kontrol edilir.
2. **Zona Fasikülata (ZF):** Korteksin yaklaşık % 75'ini oluşturur. Bu tabakadan glukokortikoidlerin (kortizol, kortikosteron v.s.) yanı sıra az miktarda adrenal androjenler ve östrojenler salgılanır. Bu hücrelerin sekresyonları adrenokortikotropik hormon (ACTH) aracılığıyla hipotalamus-hipofiz aksı tarafından kontrol edilir.
3. **Zona Retikülaris (ZR):** Korteksin en derin tabakasıdır. Buradaki hücrelerden adrenal androjenler ve az miktarda da östrojenler ve bazı glukokortikoidler salgılanır. Bu hücrelerin sekresyonları da ACTH tarafından kontrol edilir (35, 36).

Adrenal medulla, iki tip kromaffin hücre içerir. Bunlardan biri iri granüllü (yeşil floresans veren) noradrenalin salgılayan hücreler, diğeri daha ince granüllü (floresans göstermez) adrenalin salgılayan hücrelerdir. Medullada tek tek veya gruplar halinde bol miktarda sempatik ganglion hücreleri bulunur (37).

Böbreküstü bezi; aorta, a. phrenica inferior ve renal arterden menşeyini alan çok sayıda küçük arter tarafından beslenir. Her bir bezden tek bir ven çıkar (v. suprarenalis) ve venöz kanı solda renal vene, sağda vena cava inferiora taşır. Medulla venalarının duvarlarında düz kas demetleri vardır ve gerekli durumlarda, kasılarak adrenalin içeren kanın genel dolaşıma geçmesine engel olabilir. Ayrıca lenfatik

dolaşıma sahip olan böbreküstü bezinin sinirsel innervasyonu nervus vagus ve splanchnicus tarafından sağlanır (plexus suprarenalis) (37).

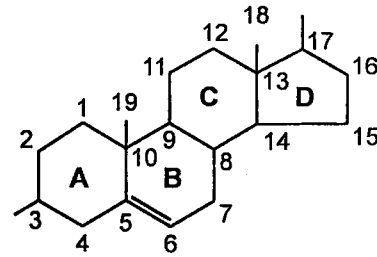


Şekil 2. 1. Adrenal Bezin Lokalizasyonu ve Histolojik Kesiti.

2.1.1. Adrenal Korteks Hormonları

Adrenal korteks hormonlarının ana kaynağı kolesteroldür. Kolesterol ise başlıca üç farklı kaynaktan sağlanır: (1) plazma lipoproteinleri (LDL, HDL); (2) adrenal hücrelerde bulunan kolesterol esterleri; (3) asetattan endojen sentez (38). Adrenal kortekste farklı yapılarda çok sayıda steroid sentez edilmesine rağmen, yaşamsal öneme sahip ve hormonal aktivite gösteren steroidler glukokortikoid, mineralokortikoid ve cinsiyet hormonları olmak üzere üç grupta incelenir.

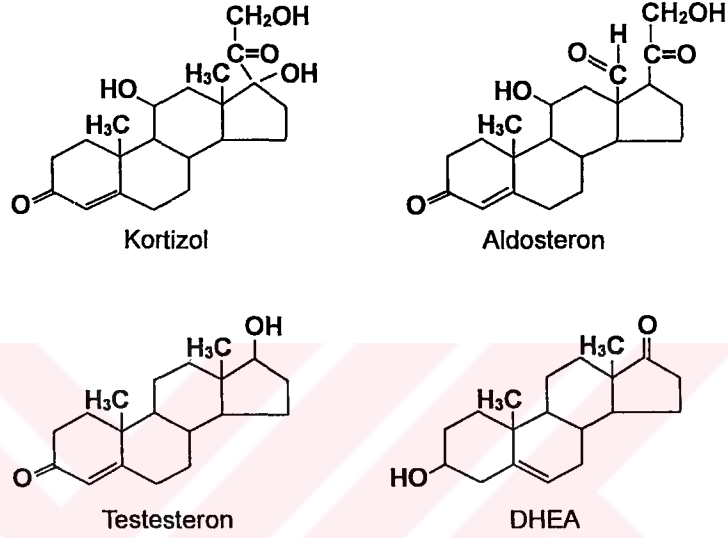
Steroidlerin temel yapısında üç tane 6 karbonlu sikloheksan halkasının oluşturduğu fenantren halkası ile birlikte bir tane 5 karbonlu siklopentan halkasının yer aldığı siklopentanoperhidrofenantren halka sistemi bulunmaktadır (Şekil 2. 2).



Şekil 2. 2. Siklopentanoperhidrofenantren Halkası.

Adrenokortikal steroidlerin 19 C' lu ve 21 C' lu olmak üzere iki yapısal tipi vardır. 21 C' lu steroidler hem glukokortikoid hem de mineralokortikoid aktiviteye sahipken, 19 C' lu steroidler androjenik aktiviteye sahiptir. Steroid hormonları 3. C atomuna bağlı bir keton veya hidroksil grubu taşır. Bir çok steroidin 10. ve 13. karbonlarına bir metil grubu ve bazılarının 17. karbon atomuna hidroksil veya keton grubu bağlanmıştır (Şekil 2. 3)

(35, 39). Adrenal steroid hormonların reseptörleri intrasellüler yerleşim gösterir. Steroid hormonları, reseptörleri ile kompleks oluşturduktan sonra, DNA yapısındaki özel "hormona yanıt elemanlarına" bağlanarak gen ifadesini düzenlemektedirler. Tüm memelilerde steroid hormonları mitokondri ve düz endoplazmik retikulumda geçen bir seri reaksiyon ile oluşur. Steroid sentezinde anahtar rol oynayan enzim sistemi sitokrom P-450 yan zinciri koparıcı enzim (P-450_{sc}) mitokondride lokalizedir (39, 40).



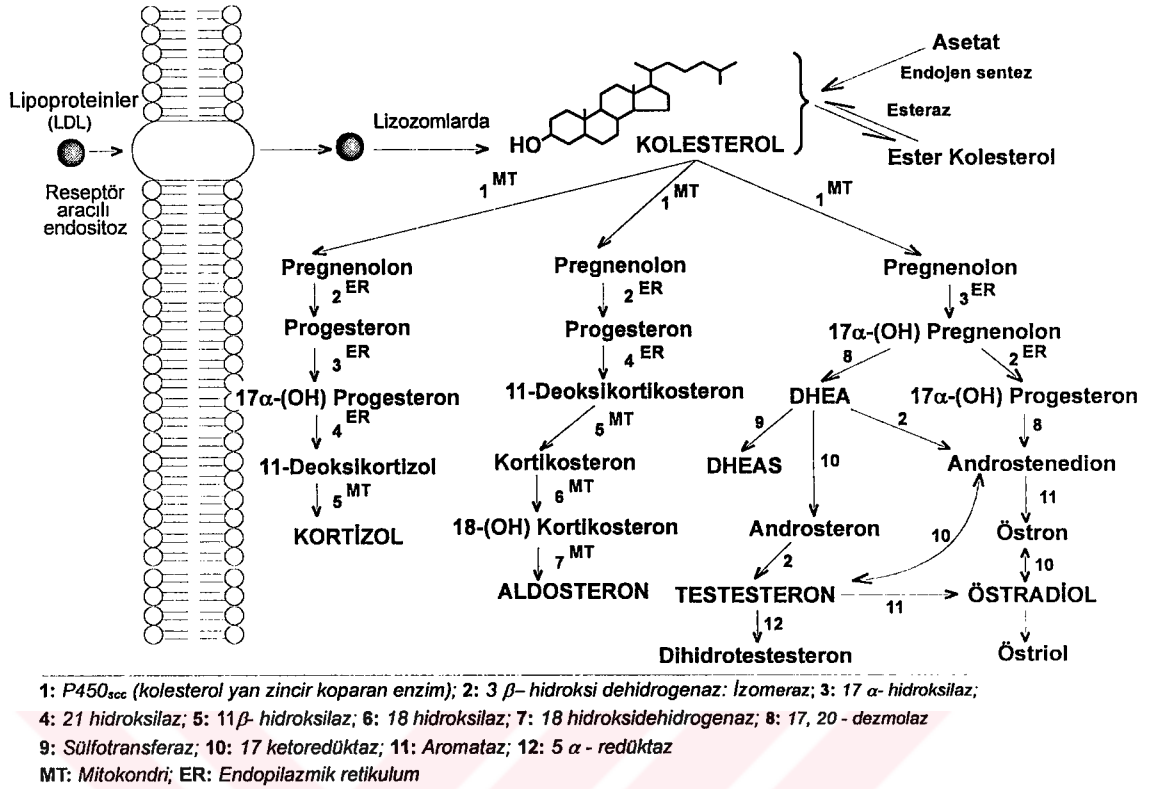
Şekil 2.3. Bazı Adrenal Hormonların Kimyasal Yapıları.

2.1.1.1. Glukokortikoidler

En potent glukokortikoid olan kortizol ZF ve az miktarda da ZR'de sentez edilir. Kortizol ve kortikosteron en önemli glukokortikoidlerdir ve kortizol glukokortikoid aktivitenin yaklaşık % 95'inden, kortikosteron ise % 4'ünden sorumludur (36, 39).

2.1.1.1.1. Biyosentezi

Kortizol sentezi için pregnenolondan önce 17α -hidroksilasyon ve daha sonra çift bağın izomerizasyonu gerçekleşir. Bu reaksiyonda 3β -hidroksisteroid dehidrogenaz: izomeraz kompleksi görev alır. Kortizol, endoplazmik retikulumda (ER) 21 -hidroksilaz ve mitokondride 11β -hidroksilazın etkileri ile 17α -hidroksiprogesterondan sentezlenir (Şekil 2. 4) (41). Kortizol sentezi, hipotalamustan salınan kortikotropin salıverici faktör (CRF) etkisiyle ACTH tarafından düzenlenir. Sentezlenen kortizol, negatif feed-back mekanizmayla bu hormonların salıverilişini inhibe eder. ACTH, hücre yüzeyindeki reseptörü aracılığıyla hücre içi cAMP'yi artırarak, kortekste steroid sentezini, kolesterolün kortikal hücre içerisine alınışını, kolesterol esterlerinin hidrolizini ve kolesterolden pregnenolon oluşumunu hızlandırarak etki eder (39, 40, 42).



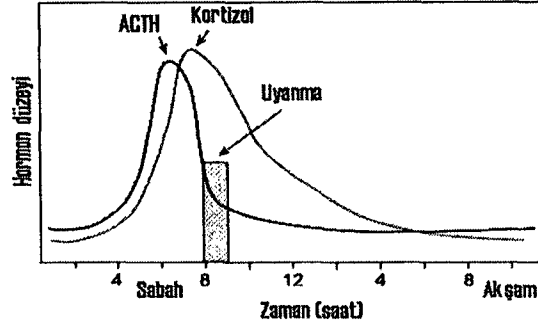
Şekil 2.4. Adrenal Bezde Steroidlerin Sentezi.

Ciddi enfeksiyon, travma, yanık, veya cerrahi operasyonlarda, norepinefrin ve serotonerjik-kolinerjik nöronların aktivasyonu ile hipotalamustan CRF salgılanması hipofizden ACTH salgılanmasını, dolayısıyla uyarının şiddeti ile orantılı olarak kortizol üretimini artırır (43, 44). Stres esnasında, dolaşımdaki artmış sitokin düzeyi, hipotalamo-hipofizer-drenal aks'ın uyarılmasına neden olur (45). Ciddi hastalık durumlarında, CBG miktarının hızlı bir şekilde azalması, dolaşımdaki serbest kortizol düzeyinde artışa yol açar (46). Nötrofil elastazlar tarafından CBG'in parçalanmasından dolayı, kortizol serbest hale gelir ve inflamasyon bölgesinde serbest kortizol düzeyi artabilir (47). Sistemik etkilerine ilaveten, sitokinler periferik kortizol metabolizmasını değiştirerek doku kortizol düzeyini (48) ve glukokortikoid reseptörlerinin kortizole duyarlılığını artırabilir (49).

2.1.1.1.2. Metabolizması

Serum kortizol düzeyi diurnal varyasyon gösterir ve günlük kortizolün büyük bir kısmı sabah uyanmadan önceki bir kaç saatte yapılır. Kortizolün plazma yarılanma ömrü 70-90 dakikadır. Kortizol eliminasyonunda primer mekanizma, karaciğerde metabolize edildikten sonra metabolitlerinin (17-hidroksikortikosteroid gibi) idrarla atılmasıdır (50). Karaciğerde kortizolün A halkası indirgenmekte ve 3. karbon

atomundaki -OH grubu glukronik asit ve az miktarda sülfat ile konjugasyonla inaktive edilmektedir.



Şekil 2. 5. Kortizol Salınımı Diurnal Varyasyon Gösterir.

2.1.1.1.3. Etkileri

Kortizol, sentezlendikten sonra adrenal korteksten plazmaya geçer ve % 75'i transkortin veya kortizol bağlayıcı globulin (CBG) adı verilen spesifik plazma proteinlerine, % 15'lik kısmı albumine bağlanır. Kortizolun aktif olan serbest formu % 10'dan azdır (42) (51). Kortizol hedef hücreye diffüzyonla girerek sitoplazmik veya nükleer reseptörlerini (tip II reseptörler veya glukokortikoid reseptörleri) aktive ettikten sonra, çekirdekte DNA yapısındaki "hormona yanıt elemanı" adı verilen özgün bir bölgeye bağlanarak gen transkripsiyonunu ve RNA sentezini uyarır (52).

- Kortizol, insülin salıverilmesini baskılayarak, hücrelere insülin aracılı glukoz ve amino asit girişini engeller ve karaciğerde glukoneogenezi uyararak kan glukozunun artışına yol açar. Kortizol hipersekresyonu kas, bağ dokusu, kemik ve diğer periferik dokularda protein katabolizmasını artırıp, protein sentezini baskılayarak, karaciğerde protein sentezini artırır. Kortizol, kas dokusunda endojen amino asit sentezini uyarır ve kastan amino asit çıkışını artırır. Kan kortizol düzeyindeki aşırı artma sonuçta hiperaminoasidemiye yol açar (53). Kortizolun etkisiyle kaslardan metabolize olan glukojenik amino asitler karaciğerde aminotransferazların etkisiyle glukoneogenik yolla glukozla dönüşür. Glukokortikoidlerin neden olduğu hiperaminoasidemi, glukagon salıverilmesini uyararak glukoneogenezi hızlandırır (39).

- Glukokortikoidler hücreli lipaz aktivasyonu sağlayarak plazma serbest yağ asiti miktarını artırır. Kortizolun aşırı miktarı ekstremelerde lipolizi uyarırken, yüz (aydede yüz), sırt (bafalo horgücü) ve gövde bölgesinde (sentripedal obesite) lipogeneze neden olur.

- Glukokortikoidler antiinflamatuvar etkiye sahiptirler. Bu etkileri muhtemelen lizozomal membran stabilizasyonu, kapiller geçirgenliğin azalması, lökositlerin

inflamasyon alanına göçünün azalması, hasarlı hücrelerin fagositozunun azalması, özellikle T lenfosit yapımının azalması ve lökositlerden IL-1'in salınımının azalmasına bağlıdır.

- Glukokortikoidler, travma, enfeksiyon, aşırı sıcak-soğuk ve cerrahi girişim gibi stres oluşturan her türlü durumda, enerji metabolizmasını ayarlayarak strese adaptasyonu sağlarlar.

- Kortizol, çok sayıda proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinleri etkiler (TNF- α , IL-1 $_{\alpha, \beta}$, IL-2, IL-3, IL-6 vs.) ve immün homeostaziste anahtar rol oynar (54, 55).

- Kortizol, uyarılabilir NO sentaz, siklooksijenaz ve fosfolipaz A₂ nin sentezini baskılar (43).

- Faklı çalışmalarda glukokortikoidlerin, hücrede oluşan reaktif oksijen türlerinin bazal seviyelerini artırdığı (56, 57) ve serbest radikal üretimini hızlandırdığı ifade edilmiştir (56, 58, 59). Bununla birlikte başka çalışmalarda glukokortikoidlerin, enerjiden bağımsız yollarla periferel dokularda GPx ve SOD aktivitelerini regüle ettiği belirtilmiştir (26, 27).

- Bir başka çalışmada, indometasinin neden olduğu gastrik mukozal hasarın oluşumu ve iyileşmesinde glukokortikoidlerin rolü araştırılmış ve sonuçta glukokortikoidlerin, fizyolojik bir gastroprotektif etki gösterdiği ifade edilmiştir (60).

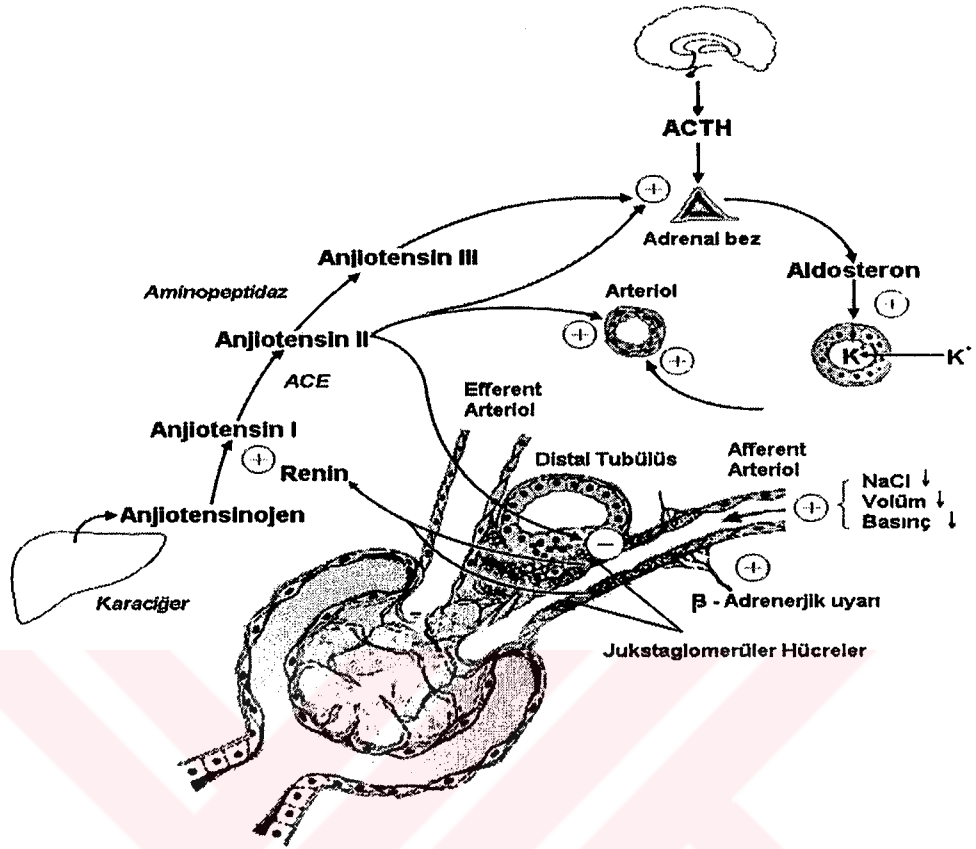
2.1.1.2. Mineralokortikoidler

2.1.1.2.1. Biyosentezi

ZG tabakasında sentez edilirler ve en önemli mineralokortikoid aldosterondur. Sentezin ilk aşamasında mitokondride oluşan pregnenolon düz ER'da 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz-izomeraz enzimleriyle progesterona dönüşür. 21 α -hidroksilaz ile progesteron, 11-deoksikortikosteron (DOC)'a çevrilir. DOC, mitokondrilerde, 11 β -hidroksilaz ile kortikosterona (güçlü glukokortikoid ve zayıf mineralokortikoid aktiviteye sahip) ve 18-hidroksilaz ve 18-hidroksidehidrogenaz enzimleriyle aldosterona çevrilir (41) (Bkz. Şekil 2. 4). Aldosteron salgılanması fizyolojik koşullarda, ekstrasellüler sıvıdaki K⁺ konsantrasyonu ve renin-anjiyotensin sistemi tarafından düzenlenir. Na⁺ ve ACTH'da nöronal mekanizmalarla aldosteron sentezinde etkili olmaktadır (39) (Şekil 2. 6).

2.1.1.2.2. Metabolizması

Aldosteronun spesifik taşıyıcı proteini yoktur, % 50 kadarı albumine, % 10'u transkordine bağlı olarak ve % 40 kadarı da serbest halde bulunur. Karaciğerde aldosteronun A halkası indirgenerek ve 3. karbondaki (-OH) grubu glukuronik asit ile konjuge edilerek inaktif metabolitlerine (tetrahidroaldosteron-3-glukuronid) dönüşür.



Şekil 2. 6. Renin – Anjiotensin Sistemi ve Etkileri.

2.1.1.2.3. Etkileri

Aldosteron hormon-reseptör kompleksi DNA'daki özgün bölgeye bağlandıktan sonra Na^+ , K^+ ve suyun membran geçişinde etkili olan spesifik proteinlerin (Na^+/K^+ ATPaz gibi) sentezini uyarır. Aldosteron, distal kıvrımlı tubüllerde ve toplayıcı kanallarda Na^+ geri emilimini artırırken, su, Na^+ ile birlikte pasif olarak emilir. Aldosteron, tükürük kanalları, ter bezleri ve gastrointestinal sistemde de Na^+ geri emilimini uyarır. Yüksek konsantrasyonda aldosteron kortikal toplayıcı tubülüs hücrelerinden Na^+ ile değişmeli olarak H^+ iyonlarının sekresyonunu artırır ve hafif derecede alkalozu yol açar (39).

2.1.1.3. Adrenal Androjenler

2.1.1.3.1. Biyosentezi

ZR tabakasında sentez edilirler. Adrenal androjenlerin öncül bileşiği olan dehidroepiandrosteronun (DHEA), androjenik etkisi zayıftır ve 3β -hidroksisteroid dehidrogenaz-izomeraz ile daha güçlü bir androjen olan androstenediona çevrilir. 17,20- dezmolazın etkisiyle 17α -hidroksiprogesterondan az miktarda sentez edilen

androstenedion 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz-izomeraz ve 17-ketoredüktaz ile adrenal bezin en güçlü androjeni olan testesterona çevrilir. Adrenal kortekste çok az miktarda östrojen sentezlenir (Bkz. Şekil 2. 4). Zayıf adrenal androjenler periferik dokularda, özellikle yağ dokusunda östrojenlere çevrilirler.

2.1.1.3.2. Metabolizması

Dolaşımdaki androjenlerin büyük bir kısmı seks hormonu bağlayıcı globulin (SHBG) ve albumine bağlı olarak bulunur. DHEA, idrar ile atılan 17- ketosteroidlerin temel öncül bileşiğidir. Bir 17- keto bileşiği olmayan testesteronun yaklaşık % 50 kadarı karaciğerde, 17-keto bileşiği olan androsterona çevrilir. Erkeklerde idrar 17-ketosteroidlerinin $\frac{2}{3}$ kadarını adrenal metabolitleri, $\frac{1}{3}$ kadarını testiküler androjenler oluşturmaktadır. Kadınlarda 17-ketosteroidlerin tamamına yakını adrenal kaynaklıdır (39).

DHEA, adrenal bez ve karaciğerde sülfat (-SO₄) grubunun eklenmesi ile inaktive edilir. Androjenler, karaciğerde konjuge edildikten sonra idrarla glukronidler ve sülfatlar halinde atılırlar (61).

2.1.1.3.3. Etkileri

Normal koşullarda insanlarda adrenal androjenlerin etkileri zayıftır. Androjenler, erkeklerde ikincil cinsiyet karakterlerinin (kılınma, ses kalınlaşması vs.) gelişmesine, kadınlarda ise virilizme neden olur. Androjenik etkileri periferik dokularda testesterona dönüştürülmelerine bağlıdır. Androstenedion, yumurtalıklarda ve yağ dokusunda östrona dönüştürülür. Kadınlarda aşırı kılınma ve amenore gibi hiperandrojenik sendromlardan sorumludur (51).

Floresans özellik gösteren bir protein olan fikoeritrinin bu özelliğinden yararlanılarak oldukça sensitif bir şekilde serbest radikal hasarı ölçümü yapılmaktadır (62, 63). Yapılan bir in vitro çalışmada, serbest radikallerin fikoeritrin üzerine oluşturdıkları oksidatif hasarın östrojenlerle önleendiği, özellikle de östriol, 17 α -östradiol ve 17 β -östradiolun önemli antioksidan özellik gösterdiği, oysa testesteronun böyle bir özelliğe sahip olmadığı belirtilmiştir (63). Bir başka çalışmada, testesteronun aksine 17 β -östradiolun, CuSO₄' ın neden olduğu düşük dansiteli lipoprotein partiküllerinin peroksidasyonunu önleyebileceği ifade edilmiştir (64). Östradiol, NADPH 'a bağımlı bir sitokrom P-450 monooksijenaz sistemi ile hızlı bir şekilde 2-ve 4-hidroksiöstradiole dönüştürülür (65). 2-hidroksiöstradiolun, östradiolden daha güçlü bir şekilde mikrozomal lipid peroksidasyonunu önlediği ifade edilmiştir (66). Alzheimer hastalığı, ateroskleroz gibi farklı hastalık süreçlerinde koruyucu etkilerine (67, 68) ilave olarak

son yayınlarda, DHEA'nın bazı antioksidan özelliklere sahip olduğu ifade edilmektedir (69, 70).

2.1.2. Adrenal Medulla Hormonları

Splanik sinire ait preganglionik lifler medullada sonlandıklarından, adrenal medulla otonom sinir sisteminin sempatik bölümünün bir uzantısı olarak kabul edilir. Katekolaminler olarak adlandırılan adrenalin (epinefrin), noradrenalin (norepinefrin) ve dopamin medullanın kromaffin hücrelerinde sentezlenir ve gerektiğinde salınmak üzere depolanır.

2.1.2.1. Biyosentezleri

Adrenal medulla hormonları tirozin aminoasitinden sentez edilir ve tirozin hidroksilazın ilk tepkimeyi katalizlediği reaksiyonda 3, 4-dihidroksifenilalanin (Dopa) oluşur. Bu reaksiyonda tetrahidropiteridin kofaktör olarak görev alır. Dopa, dopa dekarboksilazla (piridoksal fosfat kofaktörüdür) 3, 4-hidroksifenil etilamine (dopamin) dönüşür. Dopamin, dopamin β -hidroksilazla noradrenaline dönüşür. Katekolaminlerin sentezinde en son aşama feniletanolamin-n-metiltransferaz etkisiyle noradrenalinin amino grubunun, s-adenozil metiyonin kullanılarak, metilasyonu ile adrenalin oluşumudur (Şekil 2. 7). Sentez edilen katokolaminler ATP'ye bağımlı bir taşıma sistemi ile kromaffin hücrelerde depolanırlar. Granüllerde bir molekül ATP, dört molekül katekolamin bağlar. Katekolaminler, kolinerjik ve β -adrenerjik uyarı sonucu Ca^{+2} 'a bağımlı ekzositoz ile granüllerden ekstrasellüler ortama salgılanır. α - Adrenerjik uyarı katekolamin salgılanmasını baskılar.

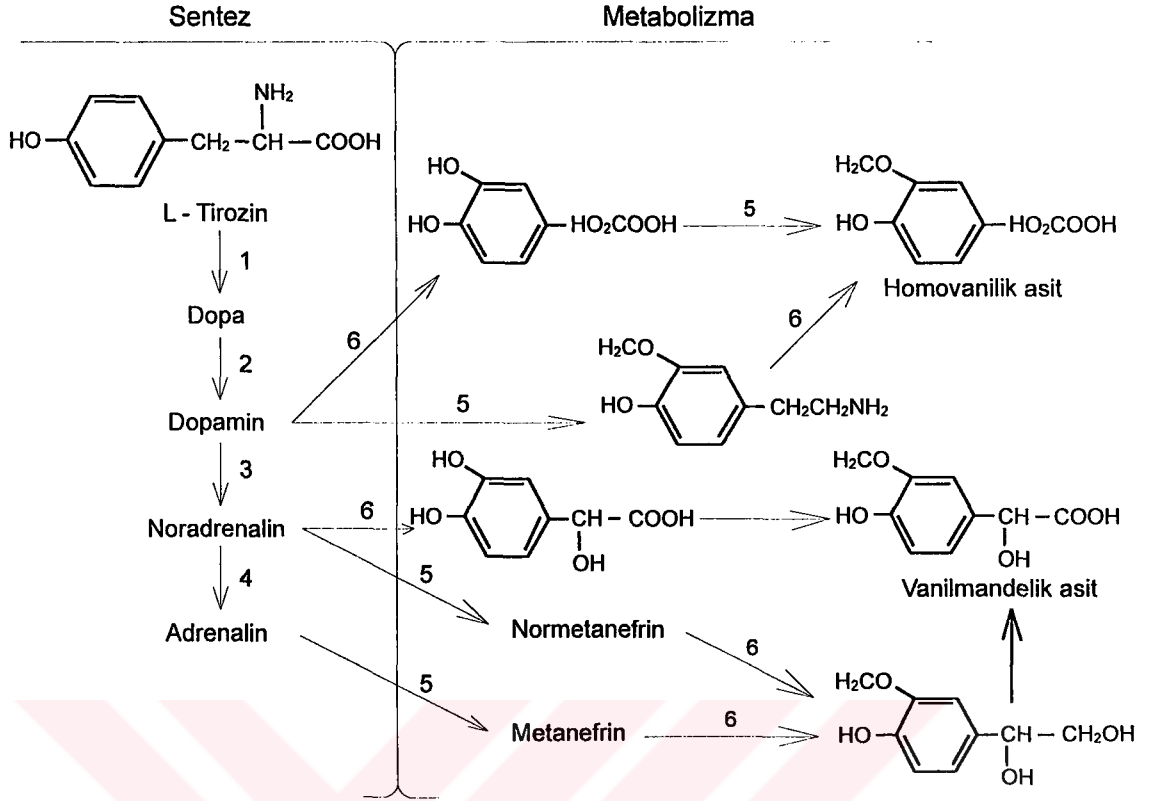
2.1.2.2. Metabolizmaları

Adrenalin ve noradrenalin, o-metilasyon, oksidatif deaminasyon ve konjugasyonla karaciğerde inaktive edilir. Noradrenalinin sinir uçları tarafından alınması majör eliminasyon yoludur. Katekolaminlerin biyotransformasyonunda temel yol sitoplazmada Mg^{+2} 'a bağımlı bir katekol-o-metil transferaz enziminin katalizlediği o-metilasyon reaksiyonudur. Katekolaminlerin oksidatif deaminasyonunda Cu^{+2} içeren bir flavoprotein olan monoaminooksidaz (MAO) enzimi görev alır. MAO-A, sinir dokusunda yaygın şekilde bulunur ve adrenalin, noradrenalin ve serotonin deaminasyonundan sorumludur. MAO-B, sinir dokusu dışında bulunur ve 2-feniletilamin ve benzilamin üzerinde etkilidir. Klinik açıdan en önemli katekolamin metabolitleri vanilmandelik asit (VMA) ve metanefrinlerdir. VMA, adrenalin ve noradrenalinin o-metillenmesi ve ardından deamine olmasıyla meydana gelir. Metanefrinler, adrenalin ve noradrenalinin metoksi türevleridir (39).

2.1.2.3. Etkileri

Katekolaminler genellikle sinir sisteminden gelen kuvvetli uyarılardan sonra salgılanırlar. Plazma proteinlerine bağlanmadan hedef hücrelerine ulaşır ve hücre zarındaki reseptörlerine bağlanır (51). Katekolaminlerin etkileri, bağlandıkları α -adrenerjik, β -adrenerjik ve dopaminerjik gibi özgün reseptör tipine göre değişir. Noradrenalin esas olarak α -reseptörleri üzerinden etki gösterirken, adrenalin hem α hem de β reseptörlerini kullanır.

Katekolaminler, fiziksel ve emosyonel stres durumlarında vücudun normal dışı koşullara uyumunu sağlamada önemli rol oynar. Glukojen ve trigliserid yıkımını uyarır ve enerji kaynağı olarak glukoz ve serbest yağ asitlerinin kana geçişini artırır. Adrenalin β_2 -adrenerjik reseptörler üzerinden karaciğerde glukojenoliz ve glukoneogenezi uyarır. Kas dokusunda adrenalin glukojenolizi uyarır ve laktik asit oluşumunu artırır. Katekolaminler, insülin salınımını baskılayarak, insüline bağımlı olarak dokulara glukoz girişini engellerken, sinir sisteminin daha fazla glukoz kullanımını sağlar. Karbonhidrat metabolizması üzerine olan bu etkileri oksijen tüketimini % 20-40 artırır. Noradrenalinin karbonhidrat metabolizması üzerine olan etkileri çok daha azdır. Adrenalin, α_1 -reseptörleri üzerinden, sindirim sistemi ve böbrek kan damarlarında vazokonstriksiyon, β_2 -reseptörleri üzerinden koroner ve serebral damarlarda vazodilatasyona neden olur. Noradrenalin ise α -adrenerjik reseptörler üzerinden vazokonstriktör etki gösterir.



1: Tirozin hidroksilaz; 2: Aromatik L-amino asit dekarboksilaz; 3: Dopamin- β -monooksijenaz
 4: Feniletanolamin-n-metiltransferaz; 5: Katekol-o-metiltransferaz; 6: Monoamino oksidaz

Şekil 2. 7. Katekolamin Sentez ve Metabolizması.

2.2. SERBEST RADİKALLER

Atom, pozitif yüklü bir çekirdek ve etrafında, çekirdeğin yüküne eşit sayıda, elektronlardan meydana gelir. Elektronlar atom çekirdeği etrafında orbital olarak adlandırılan enerji seviyelerine dağılmışlardır. Her bir orbitalde, birbirine zıt yönde hareket eden, maksimum iki elektron bulunabilir. Serbest radikaller ise bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron bulunduran atom veya moleküllerdir (71). Bu tip maddeler ortaklanmamış elektronlarından dolayı stabil değildir ve oldukça reaktiftirler (2). Serbest radikaller (+) veya (-) yüklü veya elektriksel olarak nötral, organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler. Bir serbest radikal paylaşılmamış elektronunu radikal olmayan bir moleküle verebilir veya diğer bir molekülden elektron alabilir yada radikal olmayan bir moleküle bağlanabilir. Bu reaksiyonlardan hangisi olursa olsun, radikal olmayan bir molekül sonuçta radikale dönüşür. Bir radikalın diğer moleküllerle etkileşmesi, antioksidan bir sistem araya girene kadar, zincirleme reaksiyon şeklinde devam eder (2, 72). Normal koşullarda, aerobik hücre metabolizması sırasında % 1-2

oranında serbest radikaller oluşmaktadır (73). Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en çok elektron transferi sonucu meydana gelir. Ultraviyole ışık, radyasyon, enfeksiyon, enflamasyon, ilaçlar ve daha bir çok etken ile oluşabilen serbest radikaller antioksidan savunma sistemi kapasitesini aştığı zaman yada antioksidan savunma sisteminde bir bozulma meydana geldiğinde hücreyi ve organizmayı etkileyen patolojik bir süreç başlar. Çoğu serbest radikalin yarılanma ömürleri 10^{-6} saniye gibi çok kısa olmasına rağmen (3), amino asitler, proteinler, lipidler ve nükleik asitler gibi tüm hücre bileşenleri ile etkileşmesi sonucu, hücre yapı ve fonksiyonlarında önemli değişikliklere neden olmaktadır. Homeostatik dengenin korunabilmesi, antioksidan kapasitede sürekli yenilenmeyi gerektirmektedir ve bu koşullar sağlanamadığında oksidatif hasar artarak önemli patolojik sonuçlar oluşmaktadır (2, 72, 74).

Serbest radikaller 3 yolla meydana gelir (2):

- 1- Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortaklanmamış elektron kalacak şekilde homolitik bölünmesi ($X:Y \longrightarrow X\cdot + Y\cdot$).
- 2- Normal bir molekülün tek bir elektronunu kaybetmesi veya heterolitik bölünmesi. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomların birinde kalır. Böylece serbest radikal değil, iyonlar meydana gelir: ($X:Y \longrightarrow X:\cdot + Y^+$).
- 3- Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ($A + e^- \longrightarrow A^{\cdot -}$).

2.2.1. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri

Serbest radikaller, oksijen merkezli ve oksijen merkezli olmayan serbest radikaller olarak sınıflandırmak mümkündür. Oksijenin iki eşleşmemiş elektron bulundurması, onun serbest radikallerle, radikal olmayan diğer maddelere göre daha kolay reaksiyona girmesini sağlar. Bu nedenle biyolojik sistemlerde en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Moleküler O_2 en son H_2O 'a indirgenir ve bu reaksiyonlar esnasında kısmi redüksiyonla çok sayıda reaktif ürünler oluşabilir.

2.2.1.1. Superoksid Radikali ($O_2^{\cdot -}$)

Moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelir. $O_2^{\cdot -}$, serbest radikal olmakla birlikte asıl önemi H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş matalları iyonlarını indirgemesidir (75). $O_2^{\cdot -}$, SOD enzimi ile H_2O_2 ve O_2 'e dönüştürülerek hızla elimine edilir (76). $O_2^{\cdot -}$, $OH^{\cdot}$ radikalinden daha az reaktiftir fakat ortaya çıktığı hücre bölümünden daha uzak yerlere kolaylıkla geçerek başka radikallerin oluşmasına ve doku hasarına neden olur (2, 74, 77). $O_2^{\cdot -}$, hem oksitleyici hem de redükleyici özelliğe sahiptir. Ferrisitokrom C ve nitrobluetetrazolium'u indirgerken, kendisi O_2 'e yükseltgenir. Sitokrom C'yi indirgemesi SOD tarafından inhibe edilir. $O_2^{\cdot -}$, adrenalin,

dopamin, askorbat ve hidroksilamini okside eder (2). İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu ile da $O_2^{\cdot-}$ meydana gelebilir. Geçiş metal iyonlarının O_2 ile reaksiyonları geri dönüşümlü redoks reaksiyonlarıdır ve serbest radikal reaksiyonlarının hızlanmasında çok büyük öneme sahiptirler (78).

2.2.1.2. Nitrik oksit ($NO^{\cdot}$)

$NO^{\cdot}$, vasküler endotelde, fagositlerde ve beyin dokusunda üretilen "relaxing factor" olarak bilinen, önemli fizyolojik fonksiyonları olan bir serbest radikaldir. Fakat $NO^{\cdot}$ 'in fazlası toksik etkiye sahiptir. $O_2^{\cdot-}$, $NO^{\cdot}$ ile birleşerek reaktif oksijen türevi peroksinitritler ($ONOO^{\cdot}$) meydana gelir. Bu durumda $NO^{\cdot}$ 'in normal fizyolojik etkisi inhibe olurken, $ONOO^{\cdot}$ proteinler üzerine zararlı etkiler oluşturur ve azot dioksit ($NO_2^{\cdot}$), $^{\cdot}OH$ radikali ve nitronyum iyonu (NO_2^{+}) gibi başka toksik ürünlere dönüşür (2).

2.2.1.3. Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot}$)

$OH^{\cdot}$, yüksek reaktiviteye ve küçük miktarlarda bile aşırı hasar oluşturma özelliğine sahiptir (79). $OH^{\cdot}$, demir iyonu katalizörlüğünde Fenton reaksiyonu ile veya demir veya bakır iyonları katalizörlüğünde Haber-Weiss reaksiyonu ile oluşur. Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oksijen-hidrojen kovalent bağının parçalanması ile de $OH^{\cdot}$ radikali oluşur (2). $OH^{\cdot}$, tioller ve yağ asitleri gibi pek çok biyolojik molekülden $H^{\cdot}$ atomlarını kopararak çeşitli yeni radikallerin (sülfür radikalleri, $RS^{\cdot}$) oluşmasına sebep olur. Oluşan $RS^{\cdot}$, O_2 ile birleşerek $RSO^{\cdot}$ ve $RSO_2^{\cdot}$ gibi oksisülfür radikallerini oluşturur. Sonuçta hücre membranında peroksidasyona ve protein hasarına neden olur (71). $OH^{\cdot}$, membran fosfolipidlerindeki poliansatüre yağ asitlerinin yan zinciri ile reaksiyona girerek, zincirdeki C atomundan $H^{\cdot}$ 'i ayırıp H_2O ile birleştirir ve bu olay membran yapı ve bütünlüğünü bozacak olan tepkimeler zincirini (lipid peroksidasyonunu) başlatır (71). İn vitro çalışmalar, $OH^{\cdot}$ radikalının doku hasarından primer sorumlu oksijen türevi olduğu belirtilmektedir (2, 77). $OH^{\cdot}$, istenmeyen etkilerine rağmen fagositoz için gereklidir (80).

2.2.1.4. Singlet Oksijen (1O_2)

Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesi ile oluşur. Singlet oksijen ortaklaşmamış elektron bulundurmadiğinden serbest radikal değildir fakat serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına sebep olduğu için önemlidir. Singlet oksijenin DNA hasarı oluşturduğu ve mutajenik etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir (81).

2.2.1.5. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Moleküler oksijenin iki elektron alması veya $O_2^{\cdot-}$ 'in bir elektron alması sonucu peroksitler oluşur. Peroksit molekülünün iki $H^{\cdot}$ atomu ile birleşmesi sonucu H_2O_2

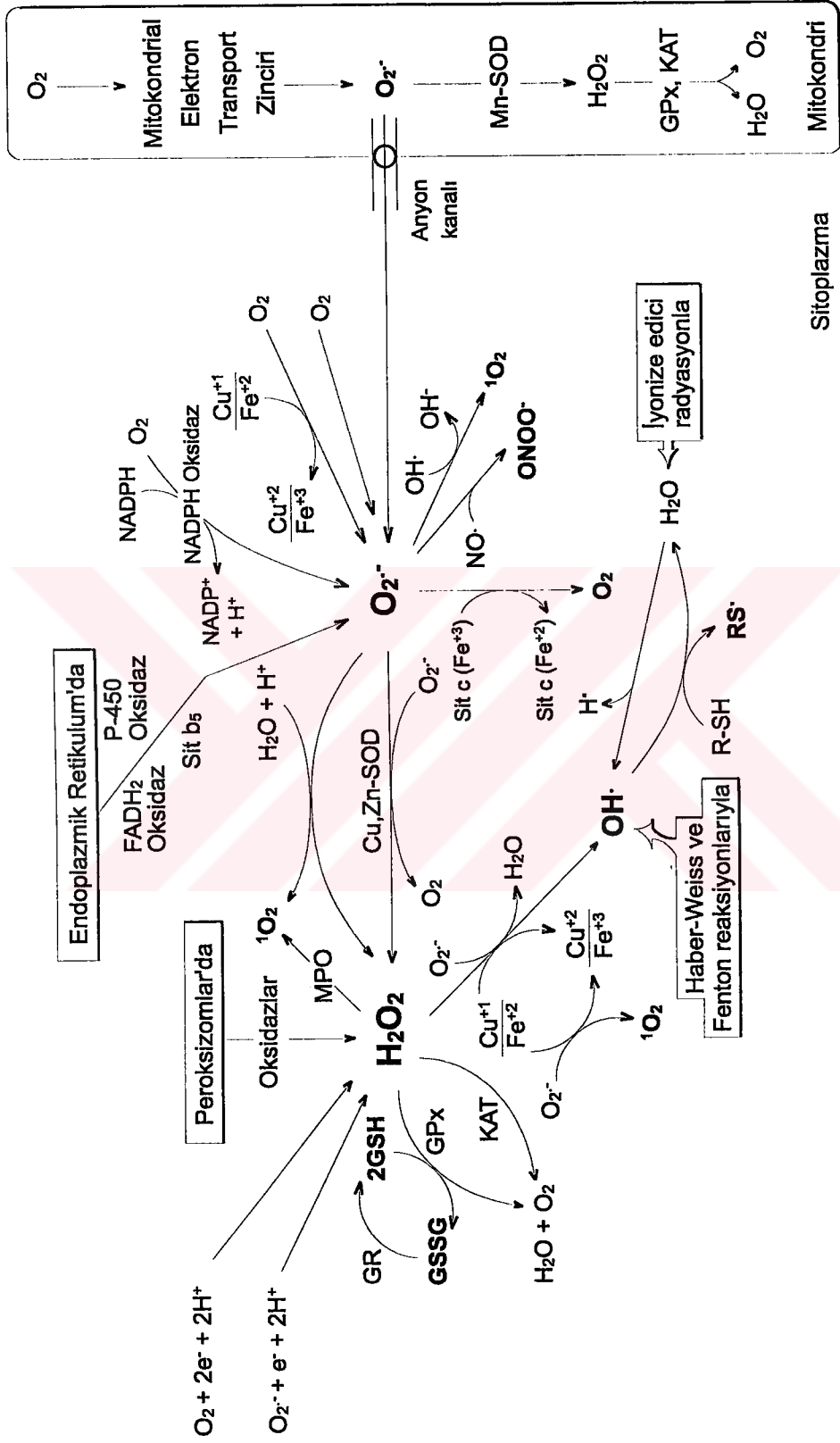
oluşur. Ancak biyolojik sistemlerde H_2O_2 'nin asıl üretimi $O_2^{\cdot-}$ 'in dismutasyonu ile oluşur. $O_2^{\cdot-}$ 'in dismutasyonu ya spontandır ya da SOD tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyon pH 4.8'de en hızlıdır. Nötral ya da alkali pH'da enzimatik dismutasyon daha belirgindir. H_2O_2 , serbest radikal değil fakat geçiş metal iyonları varlığında (Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonlarıyla) en reaktif ve toksik serbest oksijen radikali olan $OH^{\cdot}$ 'in kaynağını oluşturması açısından önemlidir (2).

2.2.1.6. Diğer Radikaller

Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu karbon merkezli radikaller ($R^{\cdot}$), peroksil radikalleri ($ROO^{\cdot}$), alkoksil radikalleri ($RO^{\cdot}$), sülfür (thil) radikalleri ($RS^{\cdot}$) gibi önemli serbest radikaller meydana gelir. Bunlardan özellikle polansatüre yağ asitlerinden meydana gelen peroksil radikali yarı ömrü uzun olan bir radikaldir. Sülfür radikalleri oksijenle tekrar reaksiyona girip sülfenil ($RSO^{\cdot}$) veya sülfür (thil) peroksil ($RSO_2^{\cdot}$) gibi radikalleri meydana getirirler.

2.2.2. Serbest Radikallerin Kaynakları

- Aktive olmuş fagositler: Nötrofil, monosit, makrofaj ve eozinofiller fagositoz esnasında çok miktarda $O_2^{\cdot-}$ oluştururlar (79).
- Elektromanyetik radyasyon: X ve δ ışınları, $OH^{\cdot}$ ve $H^{\cdot}$ gibi çeşitli radikallerin ortaya çıkmasına yol açarlar. Enerjilerini su gibi hücre sel bileşenlere transfer ederek radikal üretirler (82).
- Çevresel ajanlar: Hava kirliliği yapan kimyasal maddeler, sigara dumanı, pestisitler, solventler, anestezi maddeleri ve aromatik hidrokarbonlar serbest radikal oluşumuna yol açarlar (2).
- Stres: Enfeksiyon, cerrahi operasyonlar ve travma gibi stres oluşturan çeşitli durumlarda plazma katekolamin düzeyleri artar. Katekolaminlerin oksidasyonu ise serbest radikal kaynağıdır. Bu durum stresin hastalıkların patogeneziindeki rolünün serbest radikal üretimi ile ilgili olabileceğini göstermesi bakımından önemlidir (2).
- Antineoplastik ajanlar: Antineoplastik ajanlar (adriamisin, donorubisin, doksorubisin vs.) ve antibiyotikler yapılarındaki quinoid grupları ve bağlı metalleriyle oksijen radikalleri oluşturacak aktiviteye sahiptirler. Kemoterapötiklerin etkileri ve sitotoksik yan etkileri bu ilaçların moleküler oksijeni $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 ve $OH^{\cdot}$ radikallerine indirgemesine bağlıdır (11).
- Küçük moleküllerin otooksidasyonu: Tioller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidropiterinler ve antibiyotikler çeşitli reaksiyonlarla $O_2^{\cdot-}$ oluşturabilirler. Tioller ve askorbat, Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirger. İndirgenmiş Fe^{+2} de otooksidasyona uğrarken $O_2^{\cdot-}$ radikali oluşur (11).



Şekil 2. 8. Serbest Radikal Oluşumu ve Radikal Hasarına Karşı Savunma Mekanizmaları.

GPx: Glutasyon peroksidaz; **GR:** Glutasyon redüktaz; **H₂O₂:** Hidrojen peroksit; **KAT:** Katalaz; **MPO:** Miyeloperoksidaz; **¹O₂:** Singlet oksijen **O₂^{•-}:** Super oksid; **ONOO[•]:** Peroksinitrit; **RS[•]:** Sülfür radikali; **XO:** Ksantin oksidaz

- **Enzimler ve Proteinler:** Normal metabolik işleyiş sürecinde bir çok enzimatik kademede serbest radikaller açığa çıkar. En çok araştırılan serbest radikal oluşturan enzimlerden biri ksantin oksidaz (XO)'dır. Ksantin, XO ile ürik asite dönüşürken O_2^- radikalleri oluşur. Keza NADPH oksidaz sistemi de önemli bir serbest radikal kaynağıdır. Benzer şekilde aldehid oksidaz, dihidrofolat dehidrogenaz, flavoprotein dehidrogenaz, amino asit oksidaz ve triptofan dioksijenaz gibi enzimler de serbest radikal oluşumuna neden olur.

- **Mitokondrial Elektron Transportu:** Elektron transport zinciri (ETZ)'den elektron sızıntısı normal şartlarda hücrelerdeki en önemli serbest radikal kaynağıdır. ETZ'deki oksidatif fosforilasyon bileşenleri indirgendığı zaman O_2^- üretimi artar. ETZ'de O_2^- üretiminin yapıldığı başlıca yer ubiqlinon sitokrom b bölgesidir. O_2^- ve H_2O_2 üretimi mitokondrial O_2 tüketiminin % 1-2'si kadardır. H_2O_2 mitokondriden sitoplazmaya salındığı halde, O_2^- mitokondrial SOD ile H_2O_2 'e dönüştürülür. Ancak bir kısım O_2^- mitokondrial SOD 'nin etkisinden kaçarak sitoplazmaya geçer.

- **ER ve Nükleer Membran (NM) Elektron Transport Sistemi:** ER ve NM'da serbest radikal üretimi membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır. ER ve nükleusun iç membranları sitokrom P-450 ve b_5 yönünden zengindir. Bu bileşikler doymamış yağ asitlerinin, ksenobiyotiklerin, redükte dioksijenin ve diğer bazı substratların oksidasyonundan sorumludur. Akciğer küçük hava yollarında bulunan Clara hücrelerinde olduğu gibi bazı hücre tiplerinde sit. P-450 ve b_5 miktarı fazladır. Bu nedenle akciğerler serbest radikal üretimi için önemli bir kaynaktır (2, 11).

- **Peroksizomlar:** Başlıca hücre içi H_2O_2 kaynağıdır. Peroksizomlarda bulunan çeşitli oksidazlar (D-amino asit oksidaz, L-hidroksil asit oksidaz ve yağ asidi açıl-CoA oksidaz gibi) bol miktarda H_2O_2 üretirler (2).

- **Plazma Membranı:** Serbest radikaller plazma mebranını geçerken membrandaki toksik reaksiyonları başlatırlar. Biyolojik membran lipidlerinde doymamış yağ asitleri ve proteinlerinde ise okside olabilen amino asitler bulunmaktadır. Bu yüzden plazma membranı serbest radikal hasarına oldukça duyarlıdır. Membranda gerçekleşen lipid peroksidasyonu veya yapısal proteinlerin oksidasyonu membran permeabilitesini değiştirerek transmembran iyon gradiyentinin bozulmasına, sekretuar fonsiyonların kaybına ve sellüler metabolik olayların inhibisyonuna sebep olur (11, 77). Fagositik hücrelerin plazma membranında, NADPH oksidaz sistemi O_2^- radikallerinin önemli bir biyolojik kaynağıdır (75). Fagozomda bulunan ve lizozomal bir enzim olan myeloperoksidaz enzimi varlığında H_2O_2 ve Cl^- iyonları bakteriyi öldüren hipokloröz aside (HOCl) dönüştürülür (2, 83). NADPH oksidaz'ın doğumsal eksikliğinde

tekrarlayan kronik piyogenik enfeksiyonlarla karakterize bir hastalık olan Kronik Granulomatozis oluşur (83).

- Polianyonik hücre yüzeyi çözünmüş H^+ 'den oluşan, çevre doku sıvısına göre 2-3 birim daha düşük pH değerine sahip bir mikro çevre ile sarıdır. Bu mikro çevre O_2^- 'in H^+ ile reaksiyonu sonucu perhidroksil radikalleri (HO_2^-) nin oluşumunu sağlar. HO_2^- , O_2^- 'den daha güçlü bir oksidandır (11).

- Araşidonik asidin enzimatik oksidasyonu ile bioaktif ürünlere dönüşü esnasında, doku hasarı oluşturan oksijen, karbon ve hemoprotein merkezli çeşitli serbest radikal ara ürünleri meydana gelir (2).

2.2.3. Serbest Radikallerin Organizmadaki Etkileri

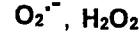
Normal bir biyolojik sistemde oluşan serbest radikaller antioksidan savunma mekanizmaları ile dengede tutulur. Bu dengenin serbest radikaller lehine bozulması durumu "oksidatif stres" olarak ifade edilir. Oksidatif stres durumlarında ya antioksidan savunma sistemi zayıflamıştır veya serbest radikal üretimi artmıştır, ya da her iki etki bir arada görülür. Oksidatif stres durumlarında serbest radikaller lipid, protein, nükleik asit, karbonhidrat ve enzim gibi hücrenin tüm önemli bileşenlerine etki eder (81, 84).

2.2.3.1. Membran Lipidlerine Etkileri

Serbest radikal hasarından en çok etkilenen membran lipid bileşenleridir. Membranda bulunan kolesterol ve poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyona uğrar ve kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonları şeklinde ilerlerler. Bu şekilde oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Lipid peroksidasyonu, serbest radikal kaynaklarının hepsiyle stimüle edilebilir ve metal iyonlarının varlığında artar. Başlama (initiation), yayılma (propagation) ve sonlanma (termination) olmak üzere üç basamaktan oluşan lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin etkisi ile poliansatüre yağ asidi zincirinden bir protonun uzaklaştırılması ile başlar ve bunun sonucu yağ asidi zinciri bir lipid radikali niteliği kazanır. Yağ asitlerinde çift bağın bulunması, komşu C atomundaki C-H bağını zayıflatarak molekülden protonun uzaklaştırılmasını kolaylaştırır. Oluşan lipid radikali dayanıksızdır ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesi ile daha kararlı konjuge dienler ve konjuge dienlerin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksil radikalleri meydana gelir. Peroksil radikallerinin oluşması diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşmasına yol açarken, kendileri de komşu yağ asidi zincirinden protonları alarak lipid hidroperoksitleri oluşturur. Bu reaksiyonlar zincirleme bir şekilde devam eder (2)

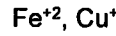
Endojen Kaynaklar

- Mitokondrial sızıntı
- Solunumsal patlama
- Enzimatik reaksiyonlar
- Otoksidasyon reaksiyonları

SERBEST RADİKALLER**Eksojen Kaynaklar**

- Sigara içme
- UV ışık
- İyonize radyasyon
- Ksenobiotikler

Geçiş metalleri



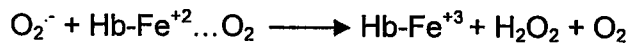
Lipid peroksidasyonu

DNA hasarı

Protein hasarı

DOKU HASARI**Şekil 2.8.** Serbest Radikallerin Önemli Kaynakları ve Nihai Etkileri.**2.2.3.2. Proteinlere Etkileri**

Proteinler serbest radikallerin etkilerine PUFA'dan daha az duyarlıdır. Proteinlerin serbest radikal hasarından etkilenme derecesi amino asit içeriklerine, duyarlı amino asitlerin protein yapısındaki kompozisyonuna ve oluşan hasarın onarılabiliğine bağlıdır. Sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolayca etkilenirler. Sonuçta sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller oluşur. Bu reaksiyonlar sonucu IgG ve albumin gibi çok sayıda disülfür bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur ve normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Hemo proteinler de serbest radikallerden önemli oranda zarar görür. Özellikle oksihemoglobinin $O_2^{\cdot-}$ veya H_2O_2 ile reaksiyonu methemoglobin oluşumuna sebep olur (2).

**2.2.3.3. Nükleik Asitler ve DNA 'ya Etkileri**

Serbest radikaller, DNA'da tek veya çift bağ kırıklarına yol açarak hücrede mutasyona ve hücre ölümüne neden olurlar. DNA'da hasarın oluşması için serbest

radikallerin spesifik bölgelere yüksek konsantrasyonda bağlanarak, zincir kırılmalarına yol açmaları veya replikasyon olmadan önce DNA tamir sistemlerini etkisiz hale getirerek mutasyonlara yol açmaları gerekir (11). İn vitro şartlarda DNA'da oluşturulan hasarın çoğundan diffüzyonla geçen OH[•] radikali sorumludur (85). OH[•] radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek DNA'da değişikliklere yol açar (2). DNA zincirindeki kırılmaların, daha çok radikallerin şeker-fosfat çatısı ile reaksiyonu neticesi veya DNA'nın δ ışını, O₂⁻, H₂O₂ ve enzim kaynaklı oksijen radikallerine maruz kalması sonucudur (11).

2.2.3.4. Karbonhidratlara Etkileri

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu H₂O₂, peroksidler ve okzoaldehidler meydana gelir. Bunların diyabet, kanser ve sigara içimi ile birlikte olan kronik hastalıkların patogeneğinde rol oynadığı düşünülmektedir. Okzoaldehidler DNA, RNA ve proteinlere bağlanırlar ve aralarında çapraz bağlar oluşturarak kanser gelişimi ve yaşlanma sürecinde rol oynarlar. Poliansatüre yağ asidi ve karbonhidrat oksidasyonunun bir ürünü olan glyoxalin hücre bölünmesini inhibe ettiği belirtilmiştir (2).

2.2.3.5. Hücre dışı Etkileri

Hyalüronik asit, sinoviyal sıvıda bol miktarda bulunan önemli bir mukopolisakkarittir. İnflamatuar eklem hastalıklarında sinoviyal sıvıya bolca geçen polimorfnüveli lökositler, immün komplekslerle aktivasyonları sonucu sinoviyal sıvıya çok miktarda O₂⁻ ve H₂O₂ salgırlar. Bu reaktif oksijen türlerinin hyalüronik asidi parçaladıkları in vitro olarak gösterilmiştir. Hyalüronik asidin parçalanması inflammatuar eklem hastalıklarında sinovial sıvının karakteristik bir özelliğidir. Vitreus humor bol miktarda hyalüronik asit içerir ve bunun oksidatif hasarı da katarakt oluşumuna yol açar. Ekstrasellüler sıvının çok düşük seviyede SOD ve KAT aktivitesine sahip olması nedeni ile reaktif oksijen türlerinin düşük miktarları bu kompartmanlarda yaygın hasara sebep olabilir (2, 11).

2.2.4. Serbest Radikallerin Rol Oynadığı Patolojik Durumlar

Serbest radikaller, canlı organizmada gerçekleşen bir çok fizyolojik süreçte görev alırlar. Örneğin, oksijen radikalleri hücrede gerçekleşen sinyal iletimi, gen transkripsiyonu ve guanilat siklaz aktivitesinin düzenlenmesi gibi çeşitli olaylarda kritik rol oynarlar (86, 87). Keza, NO, en çok bilinen sinyal ileten moleküllerden biridir ve vücutta hemen hemen her hücre ve organ fonksiyonunda görev alır. Endotel hücreleri tarafından üretilen NO' in fizyolojik düzeyleri vasküler tonus, angiogenez, trombosit agregasyonu, lökosit adezyonu, vasküler düz kas hücrelerinin çoğalması ve gevşeme fonksiyonlarının düzenlenmesi için gereklidir (88). İlave olarak, nöronlar tarafından

üretilen NO, nörotransmitter olarak fonksiyon görürken, aktive olmuş makrofajların oluşturduğu NO, immun cevabın oluşmasında önemli bir mediatördür (89). Bununla birlikte serbest radikaller, demir-sülfür merkezli enzimlerin inhibitörleri ve okside edici ajanlar gibi davranarak biomoleküllerin (protein, amino asit, lipid, DNA vs.) oksidasyonuna ve dolayısıyla da hücre hasarı ve ölümüne neden olurlar (86, 89). Serbest radikallerin sitotoksik etkileri memeli hücreleri için zararlıdır ve ateroskleroz, diyabet, romatoid artrit, parkinson, katarakt ve yaşlanma gibi bir çok süreçte karşımıza çıkar. Bu nedenle, fizyolojik düzeylerde sinyal iletilici ve regülatuar moleküller olarak görev alırlarken, patolojik düzeylerde oldukça sitotoksik ve zararlı oksidanlar olarak fonksiyon görmeleri itibari ile biyolojik sistemlerde serbest radikallerin iki zıt yönü vardır.

2.2.5. Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest radikallerin oluşumu ve bunların meydana getirdiği hasarı sınırlandırmak için biyolojik sistemlerde çeşitli antioksidan savunma mekanizmaları gelişmiştir. Antioksidanlar, endojen kaynaklı ve eksojen kaynaklı olanlar şeklinde sınıflandırılabilir gibi enzim olan ve enzim olmayan antioksidanlar olarak da sınıflandırılabilir (Tablo 2. 1 ve 2).

Antioksidan etki dört farklı şekilde olabilir. Oluşmuş serbest radikalleri tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine "toplayıcı etki", serbest radikallerle etkileşip onlara bir H^+ aktararak etkilerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme işlemine "baskılayıcı etki", radikalleri kendilerine bağlayarak reaksiyon zincirini kıran etkiye "zincir kırıcı etki" ve diğer bir antioksidan savunma sistemi olan tamir işlemine de "onarıcı etki" denir (2).

2.2.5.1 Superoksid Dismutaz (SOD, E.C.1.15.1.1.)

İlk defa 1969'da McCord ve Fridovich tarafından sıgır eritrositlerinden izole edilen ve aerobik hücrelerde yaygın şekilde bulunan bu enzim, fizyolojik pH'da $O_2^{\cdot-}$ 'in H_2O_2 ve O_2 ye dönüşümünü spontan dismutasyondan 10.000 kez daha hızlı şekilde katalizler. (2, 90). SOD'ın memeli dokusunda, farklı doku dağılımlı ve spesifik subsellüler yerleşimli üç tipi bulunur. Bunlar; sitoplazmik SOD (Cu, Zn-SOD), mitokondrial SOD (Mn-SOD) ve ekstrasellüler SOD (EC-SOD) dır (3). Enzimin fizyolojik fonksiyonu, oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksid serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktadır (2).

Cu,Zn-SOD, tüm memeli hücre organelleri ve sitoplazmalarında en bol bulunan izoenzimidir (2). Her biri bir Cu^{+2} ve bir Zn^{+2} atomu içeren iki alt birimden oluşur. Ayrıca, Cu^{2+} ve Zn^{2+} içeren ancak yukarıda ifade edilen Cu,Zn-SOD'den farklı olarak 1982'de Marklund tarafından EC-SOD tariflenmiştir (91). EC-SOD, endotelial hücreler ve

fibroblast gibi sadece birkaç hücre tipinde sentezlenir ve hücre yüzeyinde, heparan sülfatlara bağlı şekilde bulunur. Endotel kaynaklı relakse edici faktör (NO yada ilişkili bileşikler) plazmada O_2^- radikalleri tarafından nötralize edildiği için, ekstrasellüler ortamda tesbit edilebilen major SOD izoenzimi olan EC-SOD vasküler tonusun düzenlenmesinde önemli rol oynayabilir.

Tablo 2. 1. Endojen antioksidanlar

Enzimatik Antioksidanlar	Etki mekanizması
• Superoksid dismutaz	O_2^- anyonlarının detoksifikasyonu
• Glutasyon peroksidaz	H_2O_2 detoksifikasyonu
• Glutasyon-S-transferaz	H_2O_2 detoksifikasyonu
• Katalaz	H_2O_2 detoksifikasyonu
• Sitokrom oksidaz sistemi	Moleküler oksijenin % 95-99'unun detoksifikasyonu
Enzimatik olmayan Antioksidanlar	
♦ Lipid fazda bulunanlar	
• α - Tokoferol	O_2^- ve $OH^\cdot$ toplayıcı etki
• β - Karoten	O_2^- ve $OH^\cdot$ toplayıcı etki
♦ Sıvı fazda bulunanlar	
• Vitamin C (askorbik asit)	LOOH ve HOCl toplayıcı etki
• Albumin	LOOH ve HOCl toplayıcı etki
• Bilirubin	O_2^- ve $OH^\cdot$ toplayıcı etki
• Sistein	SOD benzeri aktivite
• Serüloplazmin	Ferooksidaz aktivitesi, Fe^{+2} yi Fe^{+3} e yükseltgeyerek
• Transferin ve Laktoferrin	Dolaşımdaki serbest demirin bağlanması
• Ferritin	Doku demirinin bağlanması
• Glutasyon	GPx için substrat, O_2^- ve $OH^\cdot$ toplayıcı etki
• Melatonin	SOD ve GPx aktivitesini artırarak
• Ürat	O_2^- ve $OH^\cdot$ toplayıcı etki

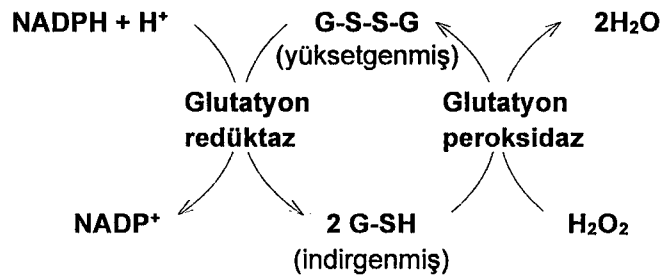
Mn-SOD, tüm hücre mitokondrilerinde bulunan, her biri bir manganez atomu içeren dört alt üniteden oluşur (92). SOD'ın O_2^- radikalleri üzerine olan etkisi şu şekilde özetlenebilir: O_2^- anyonu, Cu^{2+} ve bir arjinin rezidüsünün guanido grubuna bağlanır. Bu bağlanma sonucunda bir elektron O_2^- 'den Cu^{2+} ye transfer olurken Cu^{1+} ve O_2 oluşur. İkinci bir O_2^- anyonu Cu^{1+} den bir elektron, bağlanma bölgesinden iki proton alarak H_2O_2 oluştururken, enzim tekrar Cu^{2+} formuna dönüşmüş olur (2). SOD antioksidan özellikte bir enzim olmasına rağmen, bazı durumlarda lipid peroksidasyonunu artırabilir. Bu zıt etki, serbest demir ve katalaz enziminin lokal konsantrasyonu ile ilgili gözükmetedir. Serbest demirin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu hallerde, SOD aktivitesi ile oluşan H_2O_2 , Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonlarıyla en reaktif ve toksik serbest oksijen radikali olan $OH^\cdot$ radikallerine dönüşebilir. H_2O_2 'i metabolize edecek olan katalaz enziminin düşük konsantrasyonlarda bulunduğu veya olmadığı dokularda, SOD oksidan doku hasarını artırabilmektedir. Bundan dolayı SOD, katalaz ve GPx in,

serbest radikal aracılı hücre toksisitesini azaltmak üzere bir araya gelmiş olan tamamlayıcı bir enzim sistemi olduğu düşünülmektedir (93).

2.2.5.2 Glutasyon Peroksidaz (GPx, E.C.1.11.1.9)

GPx, aktif bölgesinde selenosistein amino asiti ihtiva eden, H_2O_2 , steroid ve lipid hidroperoksidler üzerine etkili bir antioksidan enzimdir. GPx, tetramerik 4 selenyum atomu ihtiva eder ve ciddi selenyum eksikliği durumlarında GPx eksikliği ortaya çıkabilir (94). Fosfolipid Hidroperoksit Glutasyon Peroksidaz (PLGPx) da monomerik, selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir ve membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger. Membrana bağlı en önemli antioksidan olan vitamin E yetersizliği durumlarında PLGPx membranı peroksidasyona karşı korur (2). Ayrı glutasyon peroksidazlar farklı genlerle kodlanırlar. GPx hemen hemen tüm dokulara yaygın bir şekilde dağılmış olmasına rağmen hücre içerisinde en yüksek konsantrasyonda karaciğerde bulunur. GPx, sitozol ve mitokondrial yerleşimli bir enzimdir. Eritrositlerde de GPx oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır (2).

GPx' in H_2O_2 ve diğer hidroperoksitleri indirgemesi, glutasyonun okside formunun indirgenmesinden sorumlu olan glutasyon redüktaz aktivitesine ve bu reaksiyon için gerekli olan NADPH mevcudiyetine bağlıdır. GPx, düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında etkili olup, lipid hidroperoksitlerini uzaklaştırmada katalazdan daha önemli bir rol oynamaktadır ve oksijen toksisitesine karşı katalazdan daha fazla koruyucudur. Katalaz yüksek H_2O_2 konsantrasyonlarında etkilidir. Bunun nedeni GPx'in H_2O_2 için katalazdan daha düşük bir K_m değerine sahip olmasıdır (3, 11, 95).



Şekil 2. 9. Hidrojen Peroksidin Glutasyon Aracılığıyla İndirgenmesi.

Sağlıklı normal hücrelerde GSH / GSSG oranı, glutasyon redüktaz enziminin aktivitesinin bir sonucu olarak, oldukça yüksektir (100:1). İnsan eritrositlerinin yaşlanması sürecinde, H_2O_2 anlık konsantrasyonları çok yüksek bulunabilir. GPx aktivitesinin yaşlılarda, hipertansiyonlu hastalarda ve Down Sendromunda yüksek, prematürlerde düşük olduğu bulunmuştur (2).

2.2.5.3 Glutasyon (GSH, γ -glutamilsisteinilglisin)

Genetik bilgiye ihtiyaç olmadan, glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden 2 kademede enzimatik olarak sentezlenen bir tripeptittir. İlk kademede ATP ile aktive olan glutamatın γ -karboksil grubu ile sisteinin amino grubu bir amid oluşturur. İkinci kademede dipeptidin sisteinil rezidüsünün karboksil grubu benzer bir aktivasyonla (ATP kullanımlı) glisinle birleşerek glutasyon oluşur. GSH, moleküllerdeki -SH gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı muhafaza eder. Böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GPx, PLGPx, glutasyon redüktaz, glioksilaz, insülin transhidrogenaz, maleilasetoasetat izomeraz ve PGE₂ sentaz GSH'a bağımlı bazı enzimlerdir. GSH, GPx aktivitesi ile GSSG'e dönüşürken, aynı reaksiyonda H₂O₂ H₂O'ya dönüşür. GSSG, NADPH'ın kullanıldığı glutasyon redüktaz reaksiyonu ile tekrar GSH'a dönüşür (Bkz. Şekil 2. 9). GSH, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek, eritrosit, lökosit ve göz lensi hücrelerini oksidatif strese karşı korur. Eritrosit membranını H₂O₂'den, lökositleri fagositozda kullanılan oksidan maddelerden ve lens proteinlerini oksidatif hasardan korur.

Yukarda bahsedilen antioksidanlara ilave olarak Glutasyon Redüktaz, Glutasyon-S-Transferaz, vitamin A, E ve C, β -karoten, melatonin ve selenyum gibi farklı şekillerde antioksidan etki gösterebilen bir çok değişik molekül bulunmaktadır (Bkz. Tablo 2. 1 ve Tablo 2. 2).

Tablo 2. 2. Eksojen antioksidanlar

XO inhibitörleri	Etki mekanizması
• Allopurinol • Oksipurino • Folik asit • Piterin aldehyd • Tungsten	XO ile $O_2^{\cdot -}$ üretiminin inhibisyonu
NADPH oksidaz inhibitörleri	
• Adenozin • Lokal anestezikler • Kalsiyum kanal blokerleri • Non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar • NADPH oksidaz monoklonal antikor	Nötrofil ve makrofajlarda NADPH ile $O_2^{\cdot -}$ üretiminin inhibisyonu
Superoksit dismutaz	
• Nativ SOD • IgA'ya bağlı SOD • Polietilen glukol SOD • Lipozom kapsüllü SOD	$O_2^{\cdot -} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$ reaksiyonun katalizlenmesi
Katalaz	
• Nativ katalaz • Polietilen glukol katalaz • Lipozom kapsüllü katalaz	$2H_2O_2 \longrightarrow H_2O + O_2$ reaksiyonun katalizlenmesi
Nonenzimatik Serbest Radikal Toplayıcılar	
• Mannitol • DMSO (Dimetil Sülfoksit) • DMTU (Dimetil-tiyüre) • 17- Aminosteroidler (Lazoroidler)	OH $^{\cdot}$ toplayıcı etki OH $^{\cdot}$ toplayıcı etki OH $^{\cdot}$, HOCl, H_2O_2 toplayıcı etki LOOH ve O_2 toplayıcı etki
Demir Redoks Döngüsü İnhibitörleri	
• Desferroksamin • Seruloplazmin	Serbest demiri bağlama SOD'a benzer mekanizma ile etki
GPx aktivitesini artıranlar	
• Glutatyon • Melatonin • N-Asetil sistein	GPx aktivitesini artırarak $O_2^{\cdot -}$ ve OH $^{\cdot}$ toplayıcı etki

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Gereç

Bu tez çalışmasına, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun onayı alındıktan sonra (02.05.2002 tarih ve 9 sayılı kararı) başlandı ve çalışmada ortalama 230 ± 20 gr ağırlığında 33 adet Albino Wistar cinsi dişi sıçan kullanıldı. Deney hayvanları Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edildi. Bütün hayvanlar bir hafta süreyle aynı yem içeriği ile beslendi ve deney öncesinde herhangi ek bir uygulamaya tabi tutulmadı. Daha sonra kontrol grubu (grup I, n=11), yalancı operasyon grubu (grup II, n=11) ve adrenaletomili grup (grup III, n=11) olmak üzere rast gele 3 gruba bölündü.

3.1.1 Cerrahi Prosedür

Grup I deney hayvanlarına her hangi bir cerrahi işlem uygulanmadı. Grup II ve grup III sıçanlar tek tek tiyopental sodyum (25 mg/kg, ip) ile uyutulduktan sonra lumbal bölgeleri tıraş edildi. Isıtıcı lamba altında, povidone iode ile temizlendikten sonra, yaklaşık 2-3 cm' lik bir orta hat kesisi ile cilt açıldı. Lumbal vertebraların her iki yanından cilt altı dokusu yaklaşık 2 cm' lik bir kesi ile açılarak böbreklere ulaşıldı ve adrenal bezler bulundu. Grup II sıçanların adrenal bezleri yerinde bırakılırken, grup III sıçanların adrenal bezleri (bilateral), makas yardımıyla kesilip çıkartıldı. Cilt ve cilt altı dokusu dikilerek kesi yerleri kapatıldı ve povidone iode ile silindi. Her bir deney prosedürü sonunda hayvanlar kafeslerine kondu. Operasyon sonrası grup I ve grup II sıçanlar normal laboratuvar diyeti ve musluk suyu ile, grup III sıçanlar normal laboratuvar diyetine ilave % 1' lik NaCl solusyonu ile beslendi. Operasyondan bir hafta sonra, sabah saat 08.⁰⁰–11.⁰⁰ arası intrakardiyak bölgeden kanları alındıktan sonra hayvanlar öldürülerek, hemen mide dokuları çıkartıldı ve küçük naylon poşetler içerisinde buzlu ortama kondu.

3.1.2 Numunelerin Hazırlanması

EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri (2 ml), 4 °C de, 2500 g de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, plazma kısmı ve lökositte yoğun üst tabaka otomatik pipet yardımıyla alındı. Dipte kalan eritrosit çöküntüsü $\frac{1}{5}$ oranında buz soğukluğunda serum fizyolojik (0.15 M NaCl) ile üç kez yıkanarak santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldıktan sonra dipte çöken eritrosit süspansiyonundan 0.2 ml alınıp temiz bir tüpe aktarıldı ve üzerine 1.8 ml buz soğukluğunda bidistile su katılarak hemolizat oluşturuldu. Tüpler -80 °C'de derin dondurucuya kondu ve analiz edileceği güne kadar burada saklandı.

Çıkartılan mide dokusu buz soğukluğunda serum fizyolojik ile iyice yıkanarak temizlendi ve kurutma kağıdı ile ıslaklığı giderildi. Yaş mide dokusundan yaklaşık 150 -

200 mg kadar hassas terazide tartılıp (Sartorius AG Gottingen, Tip No:BA 3105, Germany) alındı. GPx ve SOD analizleri için her gram yaş doku başına 9 ml 0.15 M NaCl; T-GSH analizi için 9 ml 1.5 N perklorik asitle; MDA analizi için 9 ml %1.15 KCl çözeltisi içinde buzda homojenize edildi. Doku homojenatları 18000 g de, 4 °C'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantları alınarak, analiz edilinceye kadar -80 °C'de derin dondurucuda saklandı.

3.1.3 Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Bütün fotometrik ölçümler DU 530 spektrofotometre (Beckman Instruments, Fullerton, CA) kullanılarak, quartz küvette yapıldı. Çalışma sırasında kullanılan araç ve cihazlara ait diğer bilgiler Tablo 3. 1'de verilmiştir. Deney aşamalarında kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Sigma (USA), Merck ve Fisher (Germany) firmalarından temin edildi (Tablo 3. 2).

Tablo 3. 1. Çalışmada Kullanılan Araç ve Cihazlara ait Bilgiler.

Cihazlar	Ait olduğu Firma
Santrifuj (soğumalı)	Heraeus 4600, Germany
Mikro santrifüj	MSE, Micro Centaur, Sanyo, UK
Homojenizatör	OMNI International
Hassas Terazi	Sartorius AG Gottingen Tip No: BA 3105, Germany
Distile Su Cihazı	Easypure RF compact ultrapure water system, USA
Magnetik karıştırıcı	Labincol 32, Netherlands
Karıştırıcı	Vortex-Genie, Model K550-GE Massachusetts, USA
Su Banyosu	Nüve BM 101, Nüve Malz. San. Lm ve Tic. Aş, Ankara
pH Metre	Jenway 3010 pH Meter, UK
Derin Dondurucu	Sanyo Ultra Low, Sanyo Electric Co Ltd., Japan
Otomatik pipet	Finpipette Labsystems, Finland
Spektrofotometre	Beckman DU 500, USA

Tablo 3. 2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Temin Edildikleri Firmalar.

Kimyasal Madde	Temin Edilen Firma
Glutasyon, redükte form (GSH, $C_2H_5N_6O_4S_2$)	SIGMA
Glutasyon redüktaz, (GR, EC 1,6,4,2)	SIGMA
Ksantin oksidaz, (XO, EC 1,1,3,22)	SIGMA
Nitroblue tetrazolium ($C_{40}H_{30}N_{10}O_6$)	SIGMA
NADPH, tetrasodyum salt, redükte form ($C_{21}H_{26}N_7O_{17}P_3Na_4$)	SIGMA
Ksantin ($C_5H_4NaO_2$)	SIGMA
Bovin serum albumin	SIGMA
Etilendiamintetraasetikasit, di sodyum tuzu (Na_2 EDTA)	MERCK
Hidroklorik asid (HCl)	MERCK
Trikloro asetik asid (TCA, CCl_3COOH)	MERCK
Sodyum hidroksit (NaOH)	MERCK
Sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$)	MERCK
Tiyobarbütirik asid (TBA, $C_4MH_4O_2N_2S$)	MERCK
Sodyum karbonat (Na_2CO_3)	MERCK
Hidrojen Peroksit (% 30, H_2O_2)	MERCK
Trishidroxymethyl-aminomethan ($C_4M_{11}NO_3$)	MERCK
Potasyum klorür (KCl)	MERCK
Potasyum fosfat monobazik (KH_2PO_4)	FISHER
Potasyum fosfat dibazik (K_2HPO_4)	FISHER
Potasyum siyanür (KCN)	FISHER
Potasyum ferri siyanid ($K_3Fe(CN)_6$)	FISHER

3.2 Yöntemler

3.2.1 Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesinin Tayini

Prensip: GPx, H_2O_2 varlığında redükte glutasyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG) yükseltgenmesini katalizler. GPx reaksiyonu ile oluşan GSSG, NADPH'ın indirgeyici substrat olarak kullanıldığı glutasyon redüktaz (GR) reaksiyonuyla tekrar GSH'a dönüşür. Bu reaksiyonlar esnasında NADPH'ın NADP'ye yükseltgenmesi ile oluşan absorbans azalışı 340 nm de spektrofotometrik olarak ölçülerek GPx aktivitesi hesaplanır (96).

Kullanılan Reaktifler:

- Fosfat tamponu (50 mM, pH 7, 5 mM EDTA'lı)
- GSH: 150 mM
- Glutasyon redüktaz
- NADPH: 8.4 mM
- NaN_3 : 1.125 M
- H_2O_2 : 2.2 mM
- Drabkin çözeltisi (1.2 mM $K_3Fe(CN)_6$, 1.6 mM KCN ve 23.8 mM $NaHCO_3$)

Deneyin Yapılışı:

GSH - Px aktivitesi, Paglia ve Valentine'nin tariflediği metoda göre ölçüldü (96). -80 °C den alınan numuneler (hemolizatlar ve doku süpernatantları) önce -20 °C, daha sonra 4 °C'de bir müddet bekletilerek iyice çözünmeleri sağlandı. Daha sonra 6000 g de 10 dakika (4 °C'de) santrifüj edilerek berrak süpernatant elde edildi. NADPH'ın nonenzimatik dönüşümünü engelleyerek daha doğru bir ölçüm yapabilmek amacıyla ortamdaki tüm hemoglobinleri siyanomethemoglobine çevirmek için süpernatantın bir kısmı eşit miktarda Drabkin çözeltisi ile karıştırıldı ve bu karışım numune olarak kullanıldı (Tablo 4.3) (96).

Tablo 3.3. Gpx Ölçüm Prosedürü.

	Deney Tüpü
Fosfat tamponu	2.650 ml
GSH	0.100 ml
NADPH	0.100 ml
NaN_3	0.010 ml
Glutasyon redüktaz	0.010 ml
Numune *	0.020 ml
Karıştırıldı ve 37 °C de 30 dakika su banyosunda inkübe edildi	
H_2O_2	0.100 ml

* Hemolizat veya doku süpernatantı

Spektrofotometre, 37 °C de 340 nm dalga boyunda, 3 dakikalık kinetik okutma programına ayarlandı. İnkübasyon sonrası her tüpe 0.100 ml H₂O₂ ilave edilerek reaksiyon başlatıldı ve 3 dakika süreyle numunelerdeki absorbans azalışı kaydedildi.

Hesaplamalar:

$$\text{Enzim aktivitesi (U/L)} = \frac{\Delta A/t \times 10^6}{\epsilon} \times SK$$

$\Delta A/t$: Dakikadaki absorbans değişimi

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

SK: Seyreltme katsayısı

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

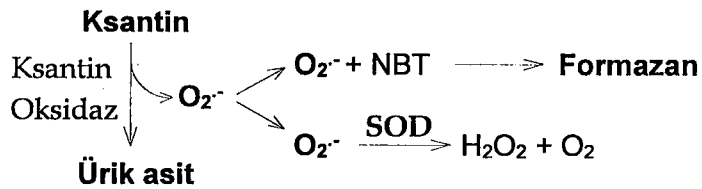
Spesifik aktivite;

$$\text{Eritrosit için} \Rightarrow \text{GSH-Px (U/gr Hb)} = \frac{\text{GPx (U/L)}}{\text{Hemoglobin (gr/L)}}$$

$$\text{Doku için} \Rightarrow \text{GSH-Px (U/gr protein)} = \frac{\text{GPx (U/L)}}{\text{Doku proteini (gr/L)}}$$

3.2.2 Superoksid Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini

Prensip: Enzimatik reaksiyonla üretilen O₂^{•-} radikallerinin reaksiyon ortamında bulunan nitroblue tetrazolium'u (NBT) indirgememesinin numunede bulunan SOD enzimi tarafından engellenmesi prensibine dayanır (97). NBT'nin indirgenmesi ile 560 nm dalga boyunda maksimum absorbans veren mor renkli formazan oluşur. SOD aktivitesinin büyüklüğü oluşan formazanın absorbansı ile ters orantılıdır (97).



Şekil 3. 1. Formazan Oluşumu ve SOD ile İnhibisyon.

Kullanılan Reaktifler:

- ⊕ Deney Reaktifi (Ksantin, 0.3 mM; EDTA, 0.6 mM; NBT, 150 µM; Na₂CO₃, 0.4 M; BSA, 1 gr/L)
- ⊕ Ksantin oksidaz, 167 U/L
- ⊕ (NH₄)₂SO₄, 2 M

Deneyin Yapılışı:

-80 °C den alınan numuneler (hemolizatlar ve doku süpernatantları) önce -20 °C, daha sonra 4 °C'de bir müddet bekletilerek iyice çözünmeleri sağlandı. Daha sonra 6000 g de 10 dakika (4 °C'de) santrifüj edilerek berrak süpernatant elde edildi. Eritrositler ve mide dokularından elde edilen bu süpernatantlarda, aşağıda verilen deney şemasına (Tablo 3. 4) göre, Sun ve arkadaşlarının metoduyla SOD aktivitesi tayin edildi (97).

Tablo 3. 4. SOD Ölçüm Prosedürü.

	Numune Tüpü	Kör Tüpü
Deney reaktifi	2.45 ml	2.45 ml
Numune*	0.100 ml	—
Bidistile su	—	0.100 ml
Ksantin oksidaz	0.050 ml	0.050 ml
Karıştırıldı ve 25 °C'de 20 dakika su banyosunda inkübe edildi		

* Hemolizat veya doku süpernatantı

Deney tüpleri birer dakika aralıklarla inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonunda oluşan renkli bileşiğin (formazan) absorbansı 560 nm dalga boyunda okutuldu.

Hesaplamalar:

Inkübasyon esnasında NBT'nin redüksiyon hızındaki % 50'lik inhibisyon 1 SOD ünitesi olarak ifade edildi. Numunede bulunan SOD enziminin meydana getirdiği % inhibisyon ve enzim aktiviteleri aşağıda verilen formüllere göre hesaplandı:

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

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

Spesifik aktivite;

$$\text{Eritrosit için} \Rightarrow \text{SOD (U/gr Hb)} = \frac{\text{SOD (U/mL)}}{\text{Hemoglobin (gr/mL)}}$$

$$\text{Doku için} \Rightarrow \text{SOD (U/gr protein)} = \frac{\text{SOD (U/mL)}}{\text{Doku proteini (gr/mL)}}$$

3.2.3 Glutasyon Tayini

a) Eritrositte (Hemolizat) Glutasyon Tayini

Kullanılan Reaktifler:

- ✦ Çöktürme reaktifi (1.67 gr/dL glasiyel metafosforik asit, 0.2 gr/dL Na₂EDTA ve 30 gr/dl NaCl).
- ✦ Fosfat reaktifi (0.3 M Na₂HPO₄)
- ✦ DTNB: 5.5'dithiobis(2-nitrobenzoik asit) 40 mg/dl , % 1'lik Na sitrat içinde.
- ✦ GSH standardı (29.2 µmol/L redükte glutasyon).

Deneyin Yapılışı:

-80 °C den alınan hemolizatın, önce -20 °C, daha sonar 4 °C'de bir müddet bekletilerek iyice çözünmesi sağlandı. Daha sonra 6000 g de 10 dakika (4 °C'de) santrifüj edilerek berrak süpernatant elde edildi. Eritrositlerden elde edilen bu süpernatantda, aşağıda verilen deney şemasına (Tablo 3. 6) göre, Beutler'in tariflediği metotla GSH tayini yapıldı (98).

Tablo 3. 6. Eritrositte GSH Ölçümü.

	Numune Tüpü	Kör Tüüpü
Numune	2 ml	—
Çöktürme reaktifi	3 ml	3 ml
Distile su	—	2 ml
Vorteksle karıştırıldı, 5 dk oda ısısında bekletildi ve filitre edildi		
Numune filtratı	2 ml	—
Kör filtratı	—	2 ml
Fosfat reaktifi	8 ml	8 ml
DTNB reaktifi	1 ml	1 ml

Tüpler vorteksle iyice karıştırıldı ve oluşan rengin (açık sarı) absorbansı 412 nm dalga boyunda köre karşı okutuldu.

b) Dokuda Glutasyon Tayini

Kullanılan Reaktifler:

- ✦ DTNB reaktifi (0.1 M KH₂PO₄ (pH 7.5), 5 mM Na₂EDTA, 10 mM DTNB ve 625 U/L glutasyon redüktaz).
- ✦ NADPH (1.467 mM β-NADPH ve 0.1 M KH₂PO₄ içerisinde hazırlanır, pH 7.5).
- ✦ GSH standard (29.2 µmol/L redükte glutasyon).

Deneyin Yapılışı:

-80 °C den alınan doku süpernatantı, önce -20 °C, daha sonar 4 °C'de bir müddet bekletilerek iyice çözünmesi sağlandı. Daha sonra 6000 g de 10 dakika (4 °C'de) santrifüj edilerek berrak süpernatant elde edildi. Mide dokusundan elde edilen

bu süpernatantda, aşağıda verilen deney şemasına (Tablo 3. 7) göre, Tietze ve Anderson'un daha önceden tariflediği metodlarla GSH tayini yapıldı (99, 100).

Tablo 3. 7. Mide Dokusunda GSH Ölçümü.

	Numune Küveti	Standart Küveti
DTNB reaktifi	750 µl	750 µl
Numune	100 µl	—
GSH standardı	—	100 µl
Karıştırıldı, 2 dk bekletildi		
NADPH	150 µl	150 µl

NADPH katıldıktan sonra küvet alt-üst edilerek reaksiyon başlatıldı ve oluşan absorbands artışı (5-thio-2-nitrobenzoik asitin oluşum hızı) 2 dk süreyle 412 nm dalga boyunda kaydedildi. Kör absorbandsı, küvete sadece DTNB ve NADPH konularak ölçüldü.

Hesaplamalar:

a) Eritrosit için

$$\bullet \text{ GSH } (\mu\text{mol/L}) = \frac{\text{Absorbans}_{(\text{Numune})}}{\text{Absorbans}_{(\text{Standart})}} \times C \times SK$$

$$\bullet \text{ GSH } (\mu\text{mol/gr Hb}) = \frac{\text{GSH } (\mu\text{mol/L})}{\text{Hemoglobin (gr/L)}}$$

b) Doku için

$$\bullet \text{ GSH } (\mu\text{mol/L}) = \frac{\Delta A/dk_{(\text{Numune})}}{\Delta A/dk_{(\text{Standart})}} \times C \times SK$$

$$\bullet \text{ GSH } (\mu\text{mol/gr protein}) = \frac{\text{GSH } (\mu\text{mol/L})}{\text{Doku proteini (gr/L)}}$$

C: Standart konsantrasyonu (29.2 µmol/L)

SK: Seyreltme katsayısı

ΔA/dk: Dakikadaki absorbands değişimi

3.2.4 Malondialdehid (MDA) Tayini

Prensip: 95 °C'de inkübasyon sonucu, tiyobarbutirik asit (TBA) ile MDA'nın oluşturduğu pembe renkli kompleksin absorbandsının 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır (101).

a) Eritrosit (Hemolizat) MDA Tayini

Kullanılan Reaktifler:

- ⊕ Fosfat Tamponu (8.1 gr/L NaCl, 2.302 gr/L Na₂HPO₄, 0.194 NaH₂PO₄)
- ⊕ Butylated hydroxytoluene (BHT) çözeltisi, % 0.88

- ⊕ TCA çözeltisi, % 30
- ⊕ EDTA, 0.1 M
- ⊕ Tiobarbutirik asit (TBA) çözeltisi, % 1
- ⊕ NaOH, 0.05 N

Deneyin Yapılışı:

-80 °C'den alınan hemolizatın, önce -20 °C, daha sonra + 4 °C'de bir müddet bekletilerek iyice çözünmesi sağlandı. Daha sonra 6000 g de 10 dakika (4 °C'de) santrifüj edilerek berrak süpernatant elde edildi. Eritrositlerden elde edilen bu süpernatantda, aşağıda verilen deney şemasına (Tablo 3. 8) göre, Jain ve arkadaşlarının tariflediği metodla MDA tayini yapıldı (101).

Tablo 3. 8 Eritrositte (hemolizat) MDA Ölçümü.

	Numune Tüpü	Kör Tüpü
Fosfat tamponu	0.8 ml	0.8 ml
Numune	0.2 ml	—
BHT çözeltisi	0.025 ml	0.025 ml
TCA çözeltisi	0.5 ml	0.5 ml
Vorteksle karıştırıldı, 4°C'de 2 saat inkübasyon sonrası 2000 g de 15 dk santrifüj edildi ve kapaklı tüplere:		
Süpernatant	1 ml	1 ml
EDTA çözeltisi	0.075 ml	0.075 ml
TBA çözeltisi	0.25 ml	0.25 ml
95 °C'de 15 dk inkübe edildi		

İnkübasyon sonrası tüpler musluk suyu ile soğutuldu. Absorbanslar iki farklı dalga boyunda (532 ve 600 nm) köre karşı okutuldu ve 600 nm'de okunan değerler 532 nm de okunan değerlerden çıkartılarak sonuçlar hesaplandı.

b) Mide Dokusunda MDA Tayini

Kullanılan Reaktifler:

- ⊕ Sodyum Dodesil Sülfat (SDS), % 8.1
- ⊕ Asetik asit, % 20, pH 3.5 (NaOH ile ayarlandı)
- ⊕ TBA, % 0.8
- ⊕ n-Bütanol/Piridin (15:1, v/v)

Deneyin Yapılışı:

-80 °C'den alınan doku süpernatantı, önce -20 °C, daha sonra 4 °C'de bir müddet bekletilerek iyice çözünmesi sağlandı. Daha sonra 6000 g de 10 dakika (4 °C'de) santrifüj edilerek berrak süpernatant elde edildi. Mide dokusundan elde edilen bu süpernatantda, aşağıda verilen deney şemasına (Tablo 3. 9) göre, Okhawa ve arkadaşlarının tariflediği metodla MDA tayini yapıldı (102).

Tablo 3. 9 Mide Dokusunda MDA Ölçümü.

	Numune Tüpü *	Kör Tüpü *
Numune	0.2 ml	–
SDS çözeltisi	0.2 ml	0.2 ml
Asetik asit çözeltisi	1.5 ml	1.5 ml
TBA çözeltisi	1.5 ml	1.5 ml
Saf su	0.8 ml	0.8 ml
95 °C'de 1 saat inkübe edildi, musluk suyu ile soğutuldu. Yeni tüplere:		
Saf su	1 ml	1 ml
n-Bütanol/Piridin	5 ml	5 ml
Vorteksle karıştırıldı, 4000 g de 10 dk santrifüj edildi		

* Kapaklı tüp

Santrifüj sonrası oluşan organik fazın absorbansı 532 nm dalga boyunda köre karşı okutuldu.

Hesaplamalar:

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

1.52 x 10⁵: Molar absorbtivite katsayısı

SK: Seyreltme Katsayısı

10⁶: Molü, mikromole çevirme katsayısı

Spesifik ifade;

$$\text{Eritrosit için } \Rightarrow \text{MDA } (\mu\text{mol/gr Hb}) = \frac{\text{MDA } (\mu\text{mol/L})}{\text{Hemoglobin (gr/L)}}$$

$$\text{Doku için } \Rightarrow \text{MDA } (\mu\text{mol/gr protein}) = \frac{\text{MDA } (\mu\text{mol/L})}{\text{Doku proteini (gr/L)}}$$

3.2.5 Hemoglobin Tayini

Prensip: Ferrisiyanid tarafından hemoglobindeki Fe⁺²'nin methemoglobindeki Fe⁺³'e yükseltgenmesi ve potasyum siyanür ile methemoglobinin stabil siyanomethemoglobine dönüştürülmesi esasına dayanır. Siyanomethemoglobinin 540 nm dalga boyundaki absorbansı, ortamdaki hemoglobin miktarı ile doğru orantılıdır (103).

Kullanılan Reaktifler:

- ⊕ Drabkin reaktifi (1.2 mM K₃Fe(CN)₆, 1.6 mM KCN ve 23.8 mM NaHCO₃)
- ⊕ Cyanmethemoglobin standardı (80 mg/dL)

Deneyin Yapılışı:

Eritrositler, buz soğukluğunda distile suyla 1:10 oranında (v/v) seyreltilerek hemoliz edildi (0.2 ml eritrosit süspansiyonu + 1.8 ml su) ve aşağıdaki şemaya göre hemoglobin tayini yapıldı.

Tablo 3. 10 Siyanomethemoglobin Metoduyla Hemoglobin Tayini.

	Numune Tüpü	Standart Tüpü	Kör Tüpü
Drabkin reaktifi	5 ml	5 ml	5 ml
Hemolizat	0.02 ml	—	—
Standart	—	0.02 ml	—
Oda sıcaklığında 5 dk inkübasyon			

Inkübasyon sonrası absorbanslar 540 nm dalga boyunda köre karşı okutuldu.

Hesaplamalar:

$$\text{Hemoglobin (gr/dl)} = \frac{\text{Absorbans (Numune)}}{\text{Absorbans (Standart)}} \times C \times SK \times 10^{-3}$$

C: 80 mg/dL

SK: Seyreltme katsayısı

10^{-3} : Standart birimini (mg/dL) gr/dL ye çevirme katsayısı

3.2.6 Bradford Metodu ile Protein Tayini

Prensip: Negatif yüke sahip Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB)'nin, protein üzerindeki pozitif yüklere bağlanmasıyla oluşan mavi renkli kompleksin absorbansının 595 nm dalga boyunda okutulması esasına dayanır (104).

Kullanılan Reaktifler:

⊕ CBB çözeltisi: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml % 95'lik etil alkol içinde çözülür; 100 ml % 85'lik fosforik asit eklenerek hacmi litreye tamamlanır.

⊕ Standart: Bovin serum albumin (BSA), 100 mg/dl

Deneyin Yapılışı:

-80 °C'den alınan doku süpernatantı, önce -20 °C, daha sonra 4 °C'de bir müddet bekletilerek iyice çözünmesi sağlandı. Daha sonra 6000 g de 10 dakika (4 °C'de) santrifüj edilerek berrak süpernatant elde edildi. Mide dokusundan elde edilen bu süpernatantda, aşağıda verilen deney şemasına (Tablo 3.11) göre, Bradford'un tariflediği metodla protein tayini yapıldı (104).

Standartın Hazırlanışı: BSA den 100 mg/dl konsantrasyonunda stok standart hazırlandı. Stok standartdan seyreltme yapılarak değişik konsantrasyonlarda elde edilen BSA çözeltileri standart olarak kullanıldı.

Tablo 3. 11 Bradford Metoduyla Dokuda Protein Tayini.

	Numune Tüpü	Standart Tüpü	Kör Tüpü
Numune*	0.1 ml	–	–
Standart	–	0.1 ml	–
Distile su	–	–	0.1 ml
CBB çözeltisi	5 ml	5 ml	5 ml
Oda sıcaklığında 5 dk inkübasyon			

* Absorbansı yüksek çıkan numuneler $1/10 - 1/50$ oranında seyreltilerek çalışıldı.

595 nm dalga boyunda absorbanslar köre karşı okutuldu ve standart grafik çizilerek sonuçlar hesaplandı.

3.3 İstatistiksel Analizler

Sonuçlar ortalama değer $\pm$ standart sapma ($x \pm SD$) olarak ifade edildi. Grup ortalamaları arasındaki farkın önemlilik derecesi varyans analizi (ANOVA) ile belirlendi. Bu işlemler için "SPSS for Windows,v 11.0" istatistik paket programı kullanıldı ve $p < 0.05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, Gereç ve Yöntemler kısmında belirtildiği gibi; ağırlıkları 230 ± 20 gr olan Albino Wistar cinsi sıçanların, deney protokolünden sonra alınan eritrosit ve mide dokusu örneklerinde GPx ve SOD aktiviteleri ve GSH ve MDA düzeyleri tayin edildi ve adrenaletominin bu parametreler üzerine olan etkileri araştırıldı. Çalışma gruplarına ait ortalama değerler (X) ve standart sapmalar (SD) Tablo 4.1 ve 4.2'de özetlendi.

Tablo 4. 1. Mide Dokusunda Ölçülen Bazı Enzimatik ve Non-Enzimatik Antioksidan ve Oksidan Parametrelere ait Ortalama ve Standart Sapma Değerleri.

	Kontrol	Yalancı operasyon	Adrenaletomi
Parametreler	Grup I	Grup II	Grup III
	n=11, $\bar{x} \pm SD$	n=11, $\bar{x} \pm SD$	n=11, $\bar{x} \pm SD$
GPx (U/gr prt)	22.9 ± 6.9	30.3 ± 10.2	$21.3 \pm 8.3^*$
SOD (U/gr prt)	382.6 ± 57.6	425.8 ± 43.6	$366.0 \pm 51.2^*$
GSH (nmol/gr prt)	1.8 ± 0.4	1.6 ± 0.4	$2.1 \pm 0.6^*$
MDA ($\mu\text{mol/gr prt}$)	107.1 ± 37.4	$153.5 \pm 50.4^*$	$96.3 \pm 29.1^{**}$

* $p < 0.05$ kontrol grubuna karşı

* $p < 0.05$ ve ** $p < 0.01$ yalancı operasyon grubuna karşı

Tablo 4. 2. Eritrosit Dokusunda Ölçülen Bazı Enzimatik ve Non-Enzimatik Antioksidan ve Oksidan Parametrelere ait Ortalama ve Standart Sapma Değerleri.

	Kontrol	Yalancı operasyon	Adrenaletomi
Parametreler	Grup I	Grup II	Grup III
	n=11, $\bar{x} \pm SD$	n=11, $\bar{x} \pm SD$	n=11, $\bar{x} \pm SD$
GPx (U/gr Hb)	6.9 ± 2.6	8.5 ± 3.1	6.1 ± 2.8
SOD (U/gr Hb)	94.8 ± 14.2	101.5 ± 13.9	89.2 ± 12.2
GSH (nmol/gr Hb)	763.3 ± 219.9	640.1 ± 192.9	$932.8 \pm 267.5^*$
MDA ($\mu\text{mol/gr Hb}$)	23.7 ± 7.6	28.11 ± 8.0	$20.2 \pm 5.7^*$

* $p < 0.05$ yalancı operasyon grubuna karşı

4.1 GPx

Adrenalektomili grupta, alınan mide dokusu örneklerinde tayin edilen GPx aktiviteleri, yalancı operasyon grubundaki GPx aktivitelerinden anlamlı derecede düşük olmasına karşın ($p < 0.05$), kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sonuçlar birbirine yakın bulundu (Bkz. Tablo 4.1). Adrenalektomili grupta ölçülen eritrosit GPx aktiviteleri, yalancı operasyon grubu ve kontrol grubu aktivitelerinden istatistiki açıdan farklı değildi ($p > 0.05$) (Bkz. Tablo 4.2).

4.2 SOD

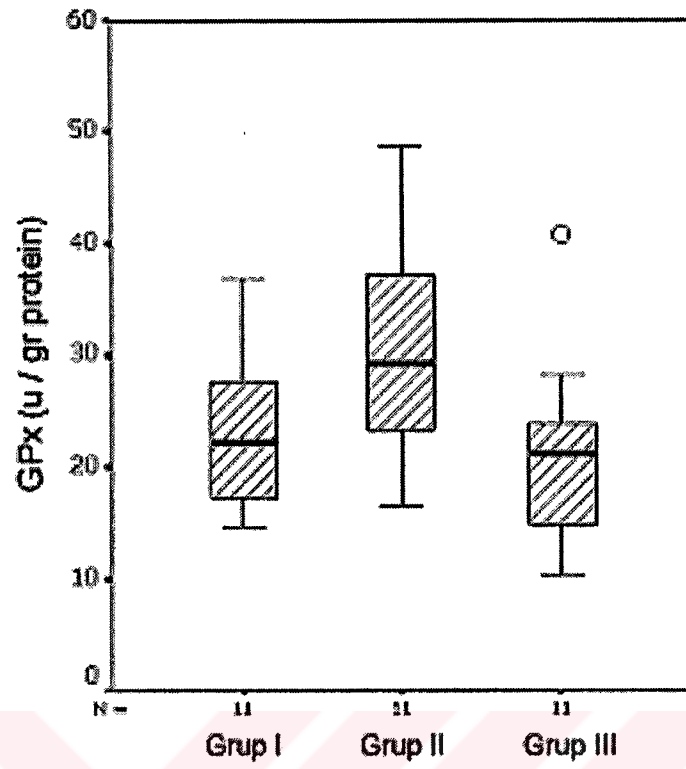
Mide dokusu örneklerinde tayin edilen SOD aktiviteleri, yalancı operasyon grubu ile karşılaştırıldığında, adrenalektomili grupta anlamlı derecede düşük bulundu ($p < 0.05$) (Bkz. Tablo 4.1). Her üç grupta, eritrosit SOD değerleri için yapılan karşılaştırmada gruplar arasında istatistiki bakımdan anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$) (Bkz. Tablo 4.2).

4.3 GSH

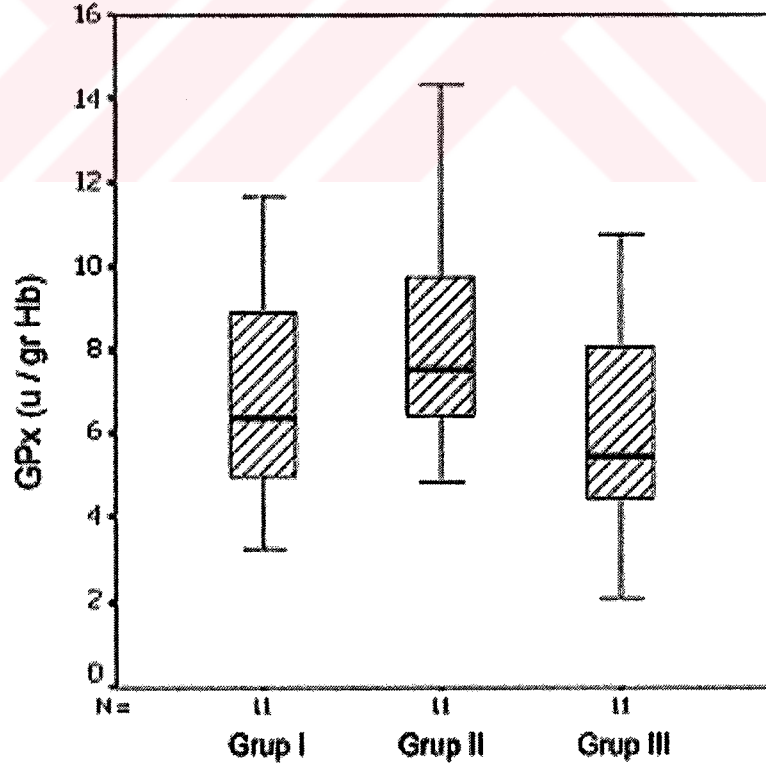
Adrenalektomili grupta, alınan mide dokusu örneklerinde tayin edilen T-GSH düzeyleri ile yalancı operasyon grubundaki T-GSH düzeyleri karşılaştırıldığında, gruplar arasındaki fark anlamlı bulundu ($p < 0.05$) (Bkz. Tablo 4.1). Ortalama eritrosit T-GSH düzeyleri, yalancı operasyon grubu ile karşılaştırıldığında, adrenalektomili grupta anlamlı ölçüde artmış olarak tespit edildi ($p < 0.05$) (Bkz. Tablo 4.2).

4.4 MDA

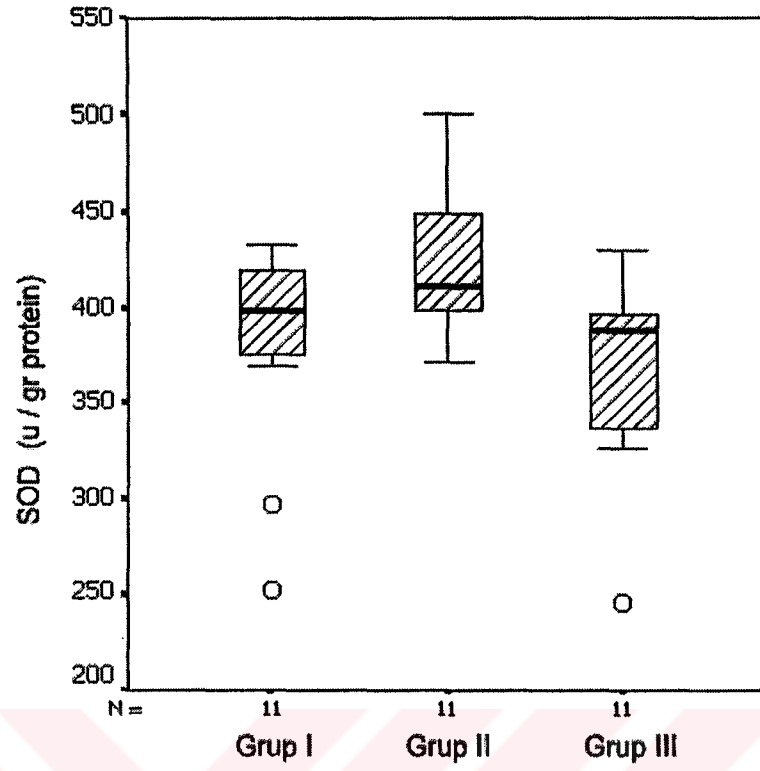
Alınan mide dokusu örneklerinde tayin edilen MDA düzeyleri adrenalektomili grupta, yalancı operasyon grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük bulundu ($p < 0.01$). Yalancı operasyon grubunda MDA düzeylerindeki artış, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, gruplar arasındaki fark istatistiki açıdan anlamlı idi ($p < 0.05$) (Bkz. Tablo 4.1). Adrenalektomili grupta ölçülen eritrosit MDA düzeyleri, yalancı operasyon grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yalancı operasyon grubunda tespit edilen eritrosit MDA düzeylerindeki artış istatistiki açıdan anlamlı değildi ($p > 0.05$) (Bkz. Tablo 4.2).



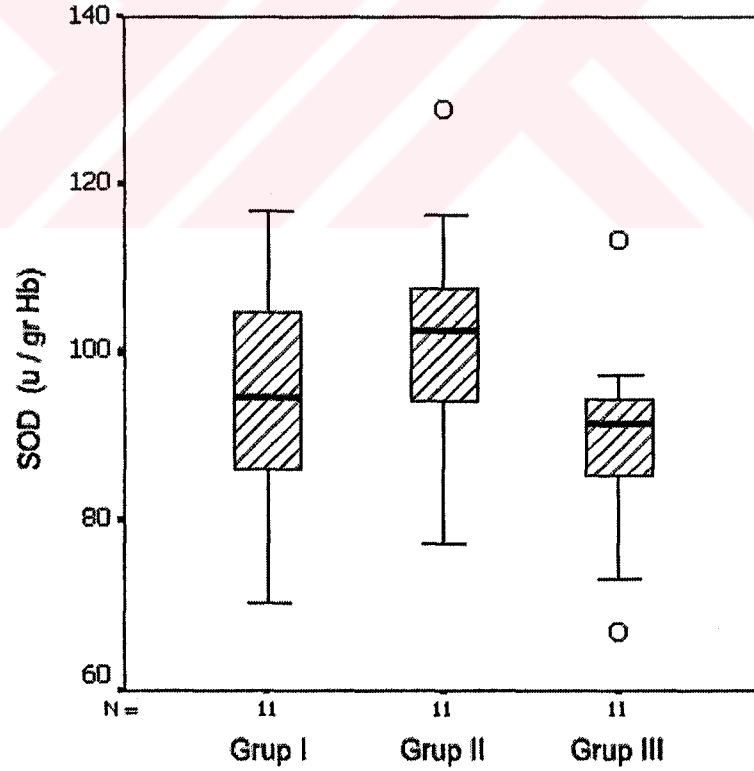
Şekil 4.1a Çalışma Gruplarındaki GPx Dağılımı (mide dokusunda).



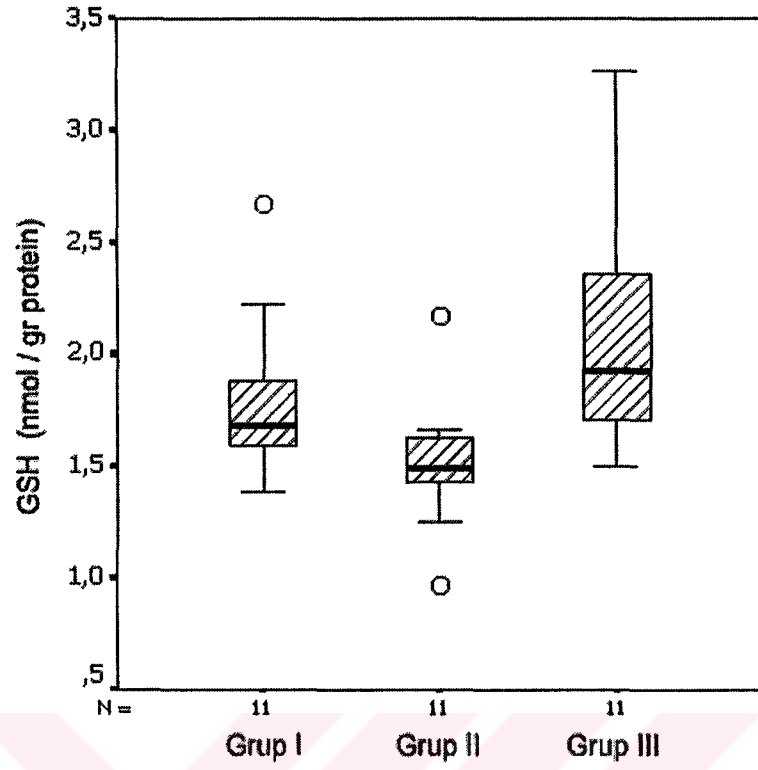
Şekil 4.1b Çalışma Gruplarındaki GPx Dağılımı (eritrositde).



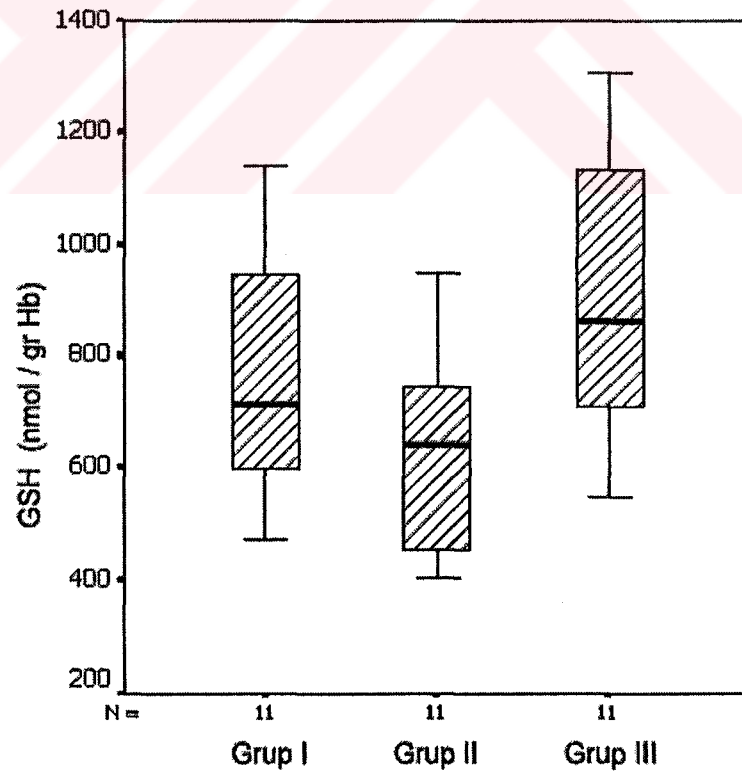
Şekil 4.2a Çalışma Gruplarındaki Superoksit Dismutaz Dağılımı (mide dokusunda).



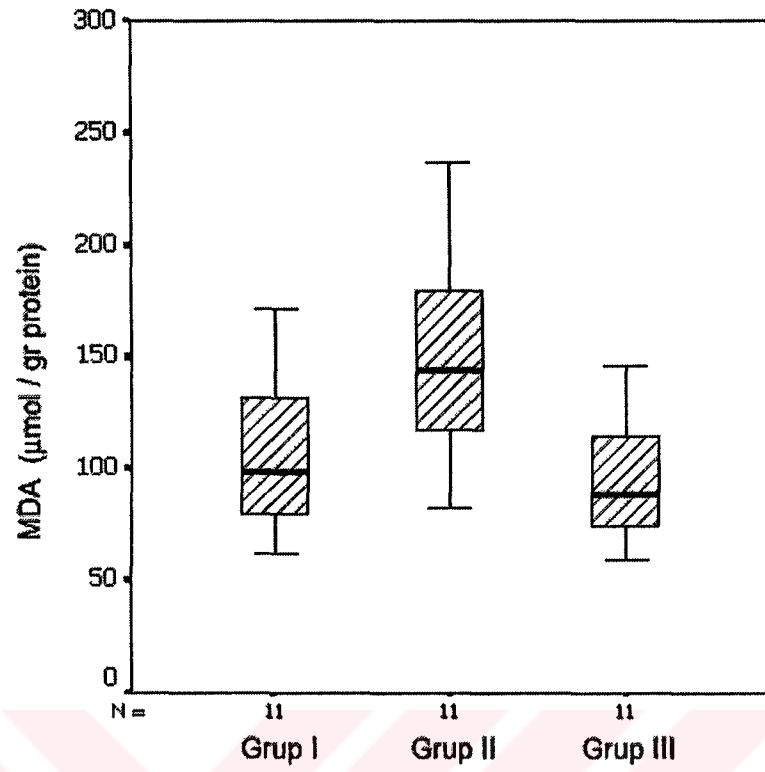
Şekil 4.2b Çalışma Gruplarındaki Superoksit Dismutaz Dağılımı (eritrositde).



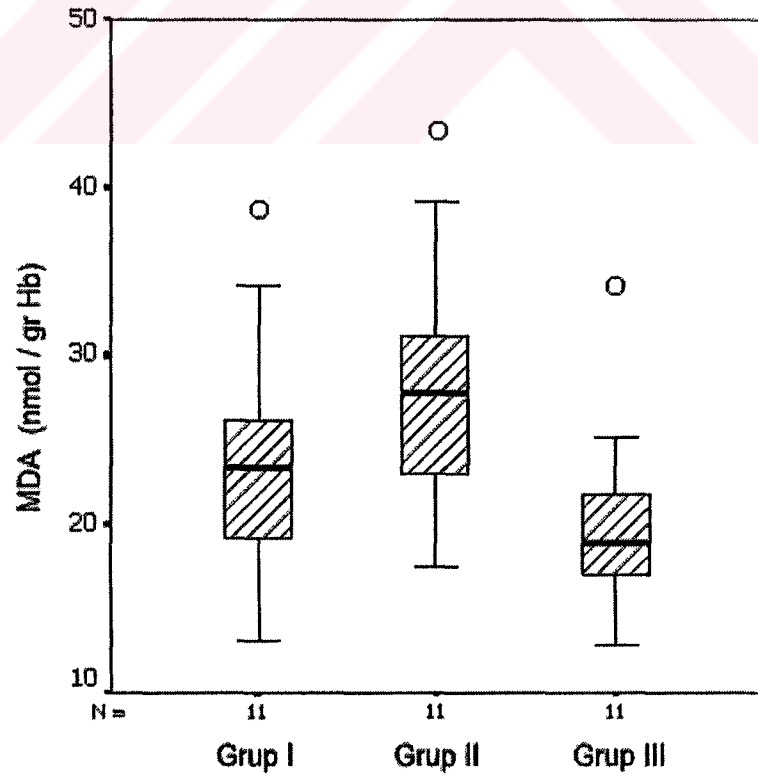
Şekil 4.3a Çalışma Gruplarındaki Glutasyon Dağılımı (mide dokusunda).



Şekil 4.3b Çalışma Gruplarındaki Glutasyon Dağılımı (eritrositde).



Şekil 4.5a Çalışma Gruplarındaki Malondialdehit Dağılımı (mide dokusunda).



Şekil 4.5b Çalışma Gruplarındaki Malondialdehid Dağılımı (mide dokusunda).

5. TARTIŞMA

H_2O_2 , O_2^- ve OH^- radikalleri gibi SOR hem iç hem de dış uyaranların etkisi ile aerobik organizmada sürekli olarak az miktarda oluşmaktadırlar (105, 106). Düşük konsantrasyonlarda SOR, hücre farklılaşması, gelişimi yada büyümenin durması, apoptozis gibi durumlarda hücre içi bir mesajcı olarak ve mikroorganizmalara karşı konakçı savunmasında olduğu gibi, bir çok biyokimyasal süreçte rol oynamaktadırlar (107, 108). SOR'nin ortamdan uzaklaştırılmasında bir yetersizliğin olduğu, oksidatif stres durumlarında olması gerekenden daha yüksek konsantrasyonlardaki SOR, biyolojik makromoleküllerin hasarlanmasına ve ciddi metabolik fonksiyon bozukluklarının ortaya çıkmasına neden olabilirler. Aynı şekilde yükselmiş SOR'nin kanser, iske mi, endokrin ve immün fonksiyonlarda yetmezlik gibi çok sayıda hastalığa ilave olarak gastrik mukozal hasar oluşumunda da rol oynadığı bir çok literatürde ifade edilmiştir (14, 15, 109).

Aşağıdaki tabloda özetlendiği gibi, gastrik mukozal bütünlük; "agresif" (saldırgan) ve "defansif" (savunma) faktörler olarak bilinen bir çok faktör arasındaki dengeye bağlı olarak sürdürülür (110). Gastrik mukozadan sekrete edilen pepsinle birlikte hidroklorik asit, safra, pankreatik enzimler endojen kaynaklı, alkol, sigara içimi, steroid-nonsteroid antiinflatuar ilaçlar ise eksojen kaynaklı önemli saldırıran faktörlerden bazılarıdır (111-114).

Gastrik doku yüzey epiteli hücrelerinden salgılanan mukus, bikarbonat sekresyonu, prostaglandin salınımı yanında, gastrik dokuda bulunan antioksidan enzimler ve serbest radikal toplama özelliğine sahip moleküllerin gastrik mukozal bütünlüğün korunmasında önemli role sahip savunma faktörleri olduğu son yıllarda ifade edilmektedir (17, 115, 116).

Tablo. Gastrik Mukozal Bütünlükle İlişkili Bazı Faktörler.

Saldırgan Faktörler	Savunma Faktörleri
• HCl sekresyonu • Pepsin sekresyonu • Safra • Pankreatik enzimler • Helikobakter Piloni pozitifliği • Sigara içimi • Alkol • Nonsteroid antiinflatuar ilaçlar • Steroidler	• Yüzey epitelinden mukus sekresyonu • Bikarbonat sekresyonu • Mukozal kan akımı • Yüzey epitelinin rejeneratif kapasitesi • Prostaglandin salınımı • Yüzey membran transportu • Antioksidan enzimler ve moleküller • Gastrik mukozal yüzeydeki fosfolipid tabaka • Gastrik motilite ve mikrosirkülasyon

Hernandez ve ark. nın (32) Sprague-Dawley sıçanlar üzerinde yapmış olduğu bir çalışmada, bilateral adrenaletomiden sonra bir grup sıçan stres öncesi subkutan prednizolon uygulandıktan sonra, diğer grup sıçanlar ise herhangi bir ilaç verilmeden soğuk odada (4 °C'de) süpin pozisyonunda alıkonularak 3 saat süreyle strese tabi tutulmuş. Aynı çalışmada, adrenaletomi sonrası herhangi bir stres uygulamasına tabi tutulmayan bir grup sıçan da kontrol grubu olarak değerlendirilmiş. Adrenaletominin stressiz sıçanlarda gastrik ülser oluşturmadığı, strese tabi tutulan sıçanlarda gastrik ülser insidansını önemli ölçüde artırdığı ve adrenaletomili sıçanlara stres öncesi prednizolon uygulaması ile bu artışın belirgin şekilde azaldığı ifade edilmiştir. Koji ve ark. nın (31) Sprague-Dawley sıçanlar üzerinde yapmış olduğu başka bir çalışmada, adrenaletomili hayvanlara değişik dozlarda indometasin uygulaması ile gastrik lezyonlar oluşturulmuş. Gastrik mukozal kan akımı, asit outputu ve motilitedeki değişikliklerle ülser oluşumu arasındaki ilişkinin değerlendirildiği çalışmada, indometasinle oluşturulan mukozal ülserasyonun adrenaletomi ile arttığı ve bunun da muhtemelen adrenaletomiden sonra gözlenen mukozal kan akımındaki azalmadan kısmen kaynaklanmış olabileceği ifade edilmiştir. Avunduk ve ark. nın (33) Lewis sıçanlar üzerinde yapmış olduğu başka bir çalışmada, bir grup sıçan adrenaletomi yapılmadan diğer bir grup sıçan ise adrenaletomi sonrası belli sürelerle (0.5, 2 ve 4 saat) soğuk ortamda (4 °C'de) alıkoyma stresine tabi tutulmuş ve deney sonrası gastrik mukoza örneklerinde ölçülen prostaglandin E_2 ve 6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$ seviyeleri ve ülser indeksi verileri değerlendirilmiş. Adrenaletominin, mukozal prostaglandin seviyelerini etkilemediği fakat, gastrik mukozal hasar oluşumu üzerine stresin kötüleştirici etkisini artırdığı ancak, bunun prostaglandin oluşumu ile ilişkili olmadığı ifade edilmiştir.

Yukarıda bahsedilen çalışmalar ve benzer özellikteki diğer literatürlerde (117, 118) ortak olan nokta, endojen stres hormonlarını uzaklaştırmak için yapılan adrenaletominin, mekanizması tam olarak izah edilemese de deneysel olarak oluşturulan stres ülserini artırıyor olmasıdır. Bu itibarla biz adrenal bezin gastrik dokudaki antioksidan enzim veya moleküller üzerinde bir etkisinin olup olmadığını araştırmak amacıyla, deney hayvanlarını her hangi bir strese tabi tutmadan veya ülser oluşturucu her hangi bir kimyasal ajan vermeden, eritrosit ve mide dokusundaki enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan parametreler üzerine adrenaletominin fizyolojik etkilerini inceledik. Bunun için, enzimatik antioksidanlar olarak GPx ve SOD aktivitelerini, enzimatik olmayan antioksidan olarak GSH düzeyini ve oksidatif stresin bir göstergesi olarak da lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeyini ölçtük.

Yaptığımız bu çalışmada, mide dokusunda ölçülen, adrenalektomili grup ile kontrol grubu GPx, SOD, GSH ve MDA değerleri arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark yoktu. Buna karşılık yalancı operasyon grubunda, kontrol ve adrenalektomili gruba göre GPx, SOD ve MDA değerleri artmış, GSH ise azalmış olarak bulundu (Bkz. Tablo 4. 1). Eritrositde yapılan ölçümlerde ise, yalancı operasyon grubunda; diğer iki gruba karşılaştırıldığında MDA değeri artmış, GSH ise azalmış olarak bulundu. Adrenalektomili gruptaki oksidan ve antioksidan parametreler eritrositlerde de kontrol grubundakilerden istatistiki olarak farklı değildi (Bkz. Tablo 4. 2).

Kontrol grubuna göre yalancı operasyon grubunda gözlenen MDA düzeylerindeki artış muhtemelen uygulanan cerrahi işlem ve buna bağlı devam eden yara iyileşmesi sürecinden kaynaklanmıştır. Yara iyileşmesi, enflamasyon, hücre migrasyonu, anjiyogenez, matriks sentezi, kollajen birikimi ve reepitelizasyonu içeren kompleks bir moleküler ve hücresel olaylar serisidir ve enflamatuvar hücreler, ekstrasellüler matriks molekülleri ve biyokimyasal mediatörler arasında gerçekleşen karmaşık bir süreçten geçer (119). Değişik literatürlerde deneysel yara iyileşmesi modellerinde, iyileşme süreciyle paralel olarak antioksidan profilin (SOD, GPx ve GSH gibi) ve lipid peroksidasyon ürünlerinin (MDA veya TBARS) değiştiği ifade edilmiştir (120-122). Travma, cerrahi müdahaleler, sepsis ve iskemi-reperfüzyon gibi oksidatif stres oluşturan bir çok durumda fazla miktarda reaktif oksijen türü meydana gelebilir ve oluşan serbest radikaller MDA oluşumuna yol açan lipid peroksidasyonunu uyarabilirler (123, 124). Bizim çalışmamızda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yalancı operasyon grubunda gözlenen mide dokusu MDA düzeylerindeki artış (% 43) istatistiki olarak anlamlı iken ($p < 0.05$), eritrosit MDA düzeylerindeki artış (% 19) anlamlı değildi ($P > 0.05$). İstatistiki anlam bakımından bu farklılık, lipid peroksidasyonuna karşı mide dokusunun daha hassas olduğunu veya eritrositlerin strese karşı daha iyi korunduğunu gösterebilir.

Çalışmamızda, hem kontrol hem de yalancı operasyon grubu ile karşılaştırıldığında, adrenalektomili grupta eritrosit ve mide dokusu MDA düzeyleri azalmış olarak bulundu. Adrenalektomili grupta gözlenen bu azalış eritrositte yapılan ölçümler için; kontrol grubuna göre % 15, yalancı operasyon grubuna göre %28 ve mide dokusunda yapılan ölçümler için; kontrol grubuna göre % 10, yalancı operasyon grubuna göre %37 oranındaydı. Bu sonuçlar, adrenal bez kaynaklı adrenalin, noradrenalin ve dopamin gibi katekolaminler veya kortizol, aldosteron ve DHEA gibi steroid hormonların lipid peroksidasyonu oluşumunda metabolizmanın değişik noktalarına olan etkileri üzerinden bir rolünün olabileceğini gösterir. Özellikle nötrofiller

fagositoz esnasında çok miktarda O_2 tüketirler. Bu tüketilen O_2 'in çoğu NADPH oksidaz sistemi tarafından kullanılır. Oksidazlar intrasellüler NADPH'ı kullanarak O_2^- anyonu oluştururlar (40). Katekolaminler, NADPH oksidaz aktivitesi için gerekli indirgeyici substratların üretildiği, pentoz fosfat yolu ve Krebs siklusunda, G6PDH (glukoz-6-fosfat dehidrogenaz) ve sitrat sentaz gibi enzimlerin aktivitelerini uyararak veya antioksidan enzimlerin aktivitelerini baskılayarak lipid peroksidasyonunu, dolayısıyla da MDA oluşumunu artırabilir (125). Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, katekolaminlerin lipid peroksidasyonu ve bazı enzimler üzerine olan etkilerini araştırmak için adrenomedülektomi yapılan hayvanların dalak ve gastrokinemius ve soleus kası dokularında, adrenomedülektominin kontrol grubuna göre G6PDH ve sitrat sentaz aktivitelerini ve buna paralel olarak da TBARS oluşumunu azalttığı ifade edilmiştir (125). Buna ilave olarak epinefrinin, makrofajlarda cAMP üzerinden H_2O_2 üretimini uyardığı ve buna bağlı olarak da transkripsiyon-translasyon mekanizmaları yanında allosterik olarak da NADPH üretimini artırabileceği literatürlerde belirtilmiştir (125, 126). Bu bilgileri destekleyen, Toleikis ve ark.(127) nin sıçanlar üzerinde yapmış oldukları, kimyasal ve cerrahi sempatektomi ile antioksidan statusu ilişkisinin araştırıldığı benzer bir çalışmada, adrenalektomili sıçanların karaciğer, akciğer ve böbrek homojenatlarında in vitro lipid peroksidasyonunun, dolayısıyla TBARS'ın tek başına adrenalektomi ile anlamlı şekilde azaldığı ve adrenalektomiye ilave, birinci derecede periferik dokularda noradrenalin düzeyini azaltan 6-hidroksidopamin (6-OHD) uygulaması ile TBARS düzeyinde ilave bir azalmanın olmadığı ifade edilmiştir (127). Bununla birlikte, adrenalektominin lipid peroksidasyonu üzerine olan etkilerinin araştırıldığı değişik çalışmalarda birbirleriyle çelişen sonuçlar da bildirilmiştir. Yukarıda bahsedilen in vitro çalışmanın aksine, Hidalgo ve arkadaşlarının (128) yapmış olduğu, Sprague-Dawley sıçanlarda bazal ve stres şartlarında hepatik doku TBARS düzeyleri üzerine katekolaminler ve glukokortikoidlerin etkilerinin araştırıldığı in vivo bir çalışmada, deney hayvanlarını strese tabi tutmadan bazal şartlarda, karaciğer dokusunda TBARS düzeyinin yalancı operasyon grubu ile karşılaştırıldığında adrenalektomili grupta daha yüksek bulunduğu, buna karşılık adrenalektomiye ilave olarak kortikosteron verilen grupta TBARS düzeyinin kontrol grubu değerlerinin altına düştüğü görülmüş. Bundan dolayı, bazal şartlarda düşük karaciğer TBARS düzeyinin, bilinmeyen bir mekanizma ile, glukokortikoidlerin antioksidan özelliğinden kaynaklanabileceği ifade edilmiştir (128).

Glutasyon, bir çok hücresel fonksiyonla ilgili peptittir ve gastrik mukozal bütünlüğün sürdürülmesinde önemli olduğu düşünülmektedir. Özellikle insan ve

sıçanların gastrik mukozasında yüksek konsantrasyonda bulunan glutatyon, proteinlerin -SH gruplarının geri dönüşümsüz otooksidasyonunu önleyerek ve O_2^- radikallerini toplayarak oksidatif strese karşı gastrik mukozanın direncini artırır (16, 17, 129). Bir başka ifadeyle, endojen sülfidril konsantrasyonu düştüğü zaman serbest radikallerin zararlı etkilerine ve asit salgısına karşı gastrik mukus hücrelerinin hassasiyeti artar(17, 18).

Bizim çalışmamızda, yalancı operasyon grubunda ölçülen eritrosit ve mide dokusu GSH düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla % 16 ve % 11 oranında daha düşük bulundu. Buna karşılık, yalancı operasyon grubuyla karşılaştırıldığında adrenaletomili grupta ölçülen eritrosit ve mide dokusu GSH düzeyleri sırasıyla % 46 ve % 30 oranında daha yüksekti. Kısmen bizim çalışmamıza benzemekle birlikte, ancak mide dokusunda GSH düzeylerinin ölçülmediği, Toleikis ve ark. nın (127) Wistar sıçanlar üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada, hem kimyasal hem de cerrahi sempatektomi sonrası eritrositlerde ve diğer bazı dokularda GSH düzeyleri ölçülmüş. Eritrositlerde ölçülen GSH düzeyi, kontrol grubuna göre adrenaletomili grupta daha yüksek bulunduğu, ki bu sonuç bizim bulgularımızla uyumlu idi, adrenaletomiye ilave 6-OHD verilen grupta ise GSH düzeyinin kontrol grubuna göre çok daha yüksek bulunduğu ifade edilmiştir. Bizim çalışmamızda, adrenaletomiden sonra GSH düzeylerinde gözlemlediğimiz artış katekolaminlerle ilişkili olabilir. Adrenalin, cAMP üzerinden H_2O_2 oluşumunu uyarır(125). H_2O_2 ise redükte GSH'ın kullanıldığı glutatyon peroksidaz reaksiyonuyla 2 mol H_2O ya dönüştürülür. Mekanizması tam olarak açık olmamakla birlikte, adrenaletomiden sonra eritrosit ve mide dokusunda tespit ettiğimiz GSH düzeylerindeki bu artışın muhtemel sebeplerinden biri adrenal bezin çıkartılmasıyla katekolaminlerin özellikle de adrenalinin major kaynağının kesilmiş olmasıdır.

Adrenalin, noradrenalin gibi katekol yapılı adrenerjik ajanlar feritinden demir iyonunu serbestleştirir ve bu serbestleşen demir iyonu çeşitli reaksiyonlarla (Fenton vb.) serbest oksijen radikallerinin oluşmasına yol açabilir(130). Buna ilaveten katekolaminlerin nonenzimatik yıkımıyla da (Katekolamin + $O_2 \longrightarrow$ Melanin + O_2^-) superoksid radikalleri oluşur (131). Ortaya çıktığı hücre bölümünden daha uzak yerlere kolaylıkla geçerek başka radikallerin oluşmasına ve doku hasarına neden olabilen O_2^- radikali SOD ile H_2O_2 'e dönüştürülür (2). Bizim çalışmamızda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yalancı operasyon grubunda ölçülen mide dokusu SOD aktivitesi % 11 oranında daha yüksek bulundu. Bunun aksine, yalancı operasyon grubu ile karşılaştırıldığında adrenaletomili grupta ölçülen mide dokusu SOD aktivitesi % 14

oranında daha düşükdü. Adrenalektomiden sonra gözlemlediğimiz mide dokusu SOD aktivitesindeki anlamlı azalma kısmen katekolaminlerin neden olduğu O_2^- miktarındaki azalmaya bağlı olabilir, ki buna bağlı olarak da SOD aktivitesi azalır.

Bizim çalışmamızda, yalancı operasyon grubu ile karşılaştırıldığında adrenalektomili grupta ölçülen eritrosit ve mide dokusu GPx aktiviteleri sırasıyla % 28 ve % 30 oranında düşükdü. Çalışmamızda adrenalektomili grupta gözlemlediğimiz antioksidan parametrelerdeki değişiklikler azalmış glukokortikoid düzeylerinden de kısmen kaynaklanıyor olabilir. Akciğer dokusunda antioksidan enzimlerin gelişimi ile sürfaktan oluşumu paralellik gösterir (132). Sürfaktan oluşumu glukokortikoidlerle uyarılabildiğinden, bu hormonların antioksidan enzim düzeyleriyle de ilişkili olabileceği düşünülmektedir yapılan bir çalışmada deksametazonun fetal sıçan akciğerinde SOD ve GPx'deki normal artışı hızlandırdığı görülmüş (132). Sıçanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada, adrenal bezde 11- β hidrosilaz inhibitörü olan metiraponla oluşturulan endojen glukokortikoid üretimindeki baskılanmanın sıçan fetal akciğer dokusunda hem sürfaktan hem de antioksidan enzim gelişimini paralel bir şekilde geciktirdiği görülmüş (133).

Pereira ve ark. nın (27) sıçan makrofajları üzerinde yapmış oldukları in vitro bir çalışmada, adrenalektomi ile Cu,Zn-SOD aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış, GPx aktivitesinde ise anlamlı bir azalmanın olduğu görülmüş. Bizim çalışmamızda ise; adrenalektomili grupta eritrosit ve mide dokusunda ölçülen Cu,Zn-SOD ve GPx aktivitelerini hem kontrol hem de yalancı operasyon grubuna göre daha düşük bulduk. Cu,Zn-SOD ve GPx aktivitelerindeki bu azalma, kontrol ve yalancı operasyon grubuna göre adrenalektomili grupta tespit ettiğimiz, artmış T-GSH ve azalmış MDA düzeyleriyle birlikte düşündüğümüzde, sonuç olarak birbirleriyle uyumluydu. Zira, MDA düzeyindeki azalma lipid peroksidasyonunun, dolayısıyla oksidatif stresin azalmış olduğunu ve bunun neticesi olarak da antioksidan enzim aktivitelerinin düşmüş olabileceğini gösterir. Ancak, Cu,Zn-SOD ve GPx aktivitelerinde gözlenen bu azalma, adrenal bez kaynaklı bir veya birden fazla faktörün etkilediği sentez düzeyindeki bir azalmadan kaynaklanmış olabileceği de gözardı edilmemelidir. Pereira ve ark. nın (27) adrenalektomiden sonra elde ettikleri bulgularla bizim bulgularımız arasında, Cu,Zn-SOD aktivitesi açısından düşündüğümüzde ortaya çıkan uyumsuz sonuç analiz edilen materyalin farklı olmasından veya in vitro deney şartlarından kaynaklanmış olabilir. Çünkü adrenalektomi ile her ne kadar katekolaminler ve glukokortikoidlerin kaynağı büyük oranda ortamdaki uzaklaştırılmış olsa da in vivo bir çalışmada glukokortikoid senteziyle ilişkili ACTH ve CRH gibi

hormonlar da antioksidan aktivite üzerinde bir etkiye sahip olabilir. Neonatal sıçanların adrenokortikal hücrelerinde mitokondrial GPx ekspresyonunun ACTH uyarısına bağlı olduğu (134), başka bir çalışmada ise yetişkin sıçanların glomeruloza hücrelerinde ACTH'ın GPx mRNA düzeyini azalığı ifade edilmiştir (135).

Her ne kadar kullanılan deney hayvanlarının cinsleri ve incelemeye tabi tutulan dokuları farklı olsa da bizim çalışmamızda, adrenaletomili grupta MDA düzeylerinin kontrol ve yalancı operasyon grubuna göre düşük oluşu, Toleikis ve ark. (127) ayrıca Pereira ve ark. (125)'nin elde etmiş oldukları sonuçlarla uyumludur. Bahsi geçen literatürlerde MDA düzeyindeki bu azalma her ne kadar katekolamin seviyesi ve buna bağlı olarak oksijen tüketimi ile izah ediliyor olsa da, Hidalgo ve ark. (128)'nin sonuçları dikkate alındığında, adrenaletomiden sonra mide dokusu ve eritrosit MDA seviyelerinin azalmış olmasında lipid peroksidasyonunu etkileyen adrenal kaynaklı bir veya birden fazla faktörün muhtemel varlığını düşündürmektedir. Bunlar adrenal kaynaklı kortikosteroidler ve katekolaminler ve bunların metabolitleri olabileceği gibi adrenal bez kaynaklı moleküllerin etkilediği fakat adrenal dışı başka faktörler de olabilir. Bu durum ancak daha spesifik edilmiş çalışmalarla ortaya konabilir. Adrenaletominin çeşitli dokulardaki lipid peroksidasyonu üzerine olan etkileriyle ilişkili ortaya çıkan farklı sonuçlar muhtemelen deney şartları ve uygulanan deney protokollerindeki farklılıktan ve / veya adrenaletominin dokuya spesifik etkilerinden kaynaklanmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Yaptığımız literatür taramalarında bazal ve stres şartlarında karaciğer, böbrek, kalp kası gibi çeşitli dokularda oksidan ve antioksidan sistemlerle adrenal bezin ilişkisi (adrenalektominin etkisi) araştırılmış olmasına rağmen; mide dokusunda, GPx, SOD, GSH ve MDA üzerine olan etkilerini inceleyen literatüre rastlanmamıştır. Bu itibarla bu çalışma bir ilki ifade etmektedir.
2. Adrenalektomi, intakt grupla kıyaslandığında mide dokusunda ülser oluşumuna karşı defansif faktörlerinden olan GPx, SOD gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini azaltmamakta, TBARS'ın seviyesini artırmamaktadır.
3. Bunun yanında, adrenalektomi, yalancı operasyon grubunda etkin bir şekilde var olmasına karşılık, operasyon stresine karşı organizma için gerekli olan koruyucu antioksidan cevaptan organizmayı yoksun bırakmaktadır (GPx ve SOD aktivitelerindeki azalma dikkate alındığında).
4. Adrenalektomiden sonra mide dokusu MDA düzeyinde gözlenen azalma; savunma reaksiyonları için katekolaminler üzerinden hızlandırılmış O₂ alımı, hızlı yapım-yıkım reaksiyonlarının olmayışı ve bunların sonucunda üretilebilecek serbest radikallerin, dolayısıyla lipid peroksidasyonunun az oluşundandır.
5. Adrenal bez hormonları farklı konsantrasyonlarda ve farklı dokularda metabolizmayı çok yönlü etkilediğinden hareketle, sadece sınırlı oksidan veya antioksidan parametrelerle strese cevap mekanizmalarının açıklanamayacağı gözönünde tutularak, adrenalektomili deney modelleri daha spesifik fakat kapsamlı protokollerle çalışılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Gilbert DL. Fifty years of radical ideas. *Ann N Y Acad Sci* 2000;899:1-14.
2. Akkus i. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1. baskı ed. Konya: Mimoza Yayınları; 1995.
3. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001;54(3):176-86.
4. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002;18(10):872-9.
5. Mayne ST. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J Nutr* 2003;133 Suppl 3:933S-940S.
6. Saygili EI, Akcay T, Konukoglu D, Papilla C. Glutathione and glutathione-related enzymes in colorectal cancer patients. *J Toxicol Environ Health A* 2003;66(5):411-5.
7. Heinecke JW. Oxidative stress: new approaches to diagnosis and prognosis in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2003;91(3A):12A-16A.
8. Lerouet D, Beray-Berthat V, Palmier B, Plotkine M, Margaill I. Changes in oxidative stress, iNOS activity and neutrophil infiltration in severe transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 2002;958(1):166-75.
9. Sakurai K, Sawamura T. Stress and Vascular Responses: Endothelial Dysfunction via Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1: Close Relationships With Oxidative Stress. *J Pharmacol Sci* 2003;91(3):182-6.
10. Samuni A, Karmeli F, Moshen M, Rachmilewitz D. Mechanisms underlying gastric antiulcerative activity of nitroxides in rats. *Free Radic Res* 1999;30(2):133-40.
11. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982;47(5):412-26.
12. Stein HJ, Esplugues J, Whittle BJ, Bauerfeind P, Hinder RA, Blum AL. Direct cytotoxic effect of oxygen radicals on the gastric mucosa. *Surgery* 1989;106(2):318-23: discussion 323-4.
13. Ghanayem BI, Boor PJ, Ahmed AE. Acrylonitrile-induced gastric mucosal necrosis: role of gastric glutathione. *J Pharmacol Exp Ther* 1985;232(2):570-7.
14. Pihan G, Regillo C, Szabo S. Free radicals and lipid peroxidation in ethanol- or aspirin-induced gastric mucosal injury. *Dig Dis Sci* 1987;32(12):1395-401.

15. Stein HJ, Hinder RA, Oosthuizen MM. Gastric mucosal injury caused by hemorrhagic shock and reperfusion: protective role of the antioxidant glutathione. *Surgery* 1990;108(2):467-73; discussion 473-4.
16. Boyd SC, Sasame HA, Boyd MR. Gastric glutathione depletion and acute ulcerogenesis by diethylmaleate given subcutaneously to rats. *Life Sci* 1981;28(26):2987-92.
17. Loguercio C, Taranto D, Beneduce F, del Vecchio Blanco C, de Vincentiis A, Nardi G, et al. Glutathione prevents ethanol induced gastric mucosal damage and depletion of sulfhydryl compounds in humans. *Gut* 1993;34(2):161-5.
18. Romano M, Razandi M, Raza A, Szabo S, Ivey J. Cysteamine protects gastric epithelial cell monolayers against drug induced damage: evidence for direct cellular protection by sulphhydryl compounds. *Gut* 1992;33(1):30-8.
19. Gotz JM, van Kan CI, Verspaget HW, Biemond I, Lamers CB, Veenendaal RA. Gastric mucosal superoxide dismutases in *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1996;38(4):502-6.
20. Bhattacharjee M, Bhattacharjee S, Gupta A, Banerjee RK. Critical role of an endogenous gastric peroxidase in controlling oxidative damage in *H. pylori*-mediated and nonmediated gastric ulcer. *Free Radic Biol Med* 2002;32(8):731-43.
21. Offner PJ, Moore EE, Ciesla D. The adrenal response after severe trauma. *Am J Surg* 2002;184(6):649-53; discussion 653-4.
22. Burchard K. A review of the adrenal cortex and severe inflammation: quest of the "eucorticoid" state. *J Trauma* 2001;51(4):800-14.
23. Nakamura M, Suita S, Yamanouchi T, Masumoto K, Ogita K, Taguchi S, et al. Cortisol and cytokine responses after surgery in different age groups of pediatric patients. *Pediatr Surg Int* 2003;19(3):194-9.
24. Delahunt J, Mellsop G. Hormone changes in stress. *Stress Med* 1987;3:123-143.
25. Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003;53 Suppl 3:S26-36; discussion S36-8.
26. Yao X, Rarey KE. Detection and regulation of Cu/Zn-SOD and Mn-SOD in rat cochlear tissues. *Hear Res* 1996;96(1-2):199-203.
27. Pereira B, Rosa LF, Safi DA, Bechara EJ, Curi R. Hormonal regulation of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in rat macrophages. *Biochem Pharmacol* 1995;50(12):2093-8.

28. Valentine JF, Nick HS. Glucocorticoids repress basal and stimulated manganese superoxide dismutase levels in rat intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 1994;107(6):1662-70.
29. Kawamura T, Yoshioka T, Bills T, Fogo A, Ichikawa I. Glucocorticoid activates glomerular antioxidant enzymes and protects glomeruli from oxidant injuries. *Kidney Int* 1991;40(2):291-301.
30. McIntosh LJ, and HK, RM. S. Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: baseline studies. *Brain Res* 1998;791(1-2):209-14.
31. Takeuchi K, Nishiwaki H, Okada M, Niida H, Okabe S. Bilateral adrenalectomy worsens gastric mucosal lesions induced by indomethacin in the rat. Role of enhanced gastric motility. *Gastroenterology* 1989;97(2):284-93.
32. Hernandez DE, Adcock JW, Nemeroff CB, Prange AJ, Jr. The role of the adrenal gland in cytoprotection against stress-induced gastric ulcers in rats. *J Neurosci Res* 1984;11(2):193-201.
33. Avunduk C, Eastwood GL, Polakowski N, Quimby GF. Effects of stress on gastric mucosal prostaglandin generation in intact, adrenalectomized, and sham-operated rats. *J Clin Gastroenterol* 1990;12 Suppl 1:S48-51.
34. Stetinova V, Grossmann V. Effects of known and potential antioxidants on animal models of pathological processes (diabetes, gastric lesions, allergic bronchospasm). *Exp Toxicol Pathol* 2000;52(5):473-9.
35. Peter H. Forsham, Kenneth L. Melmon. The Adrenals. In: Robert H. Williams, editor. *Textbook of Endocrinology*. 4 th ed ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 1968. p. 287-403.
36. Arthur C. The adrenocortical hormones. In: Guyton and John E H, editor. *Textbook of Physiology*. 10th ed; 2000. p. 869-881.
37. Aliye Erkoçak. Özel Histoloji, İzmir: REFKO, 1984.
38. Heikkila P, Kahri AI, Ehnholm C, Kovanen PT. The effect of low- and high-density lipoprotein cholesterol on steroid hormone production and ACTH-induced differentiation of rat adrenocortical cells in primary culture. *Cell Tissue Res* 1989;256(3):487-94.
39. Ersöz B, Menten G. Adrenal Hormonlar. In: Onat T, Emerk K, Sözmen E, editors. *İnsan Biyokimyası*. Ankara: Palme Yayıncılık; 2002. p. 478-491.
40. Bhagavan N. *Medical Biochemistry*. 4 th ed. California: Academic Pres; 2002.
41. Magalhaes MM, Magalhaes MC. Peroxisomes in adrenal steroidogenesis. *Microsc Res Tech* 1997;36(6):493-502.

42. Cooper MS, Stewart PM. Corticosteroid insufficiency in acutely ill patients. *N Engl J Med* 2003;348(8):727-34.
43. Thompson BT. Glucocorticoids and acute lung injury. *Crit Care Med* 2003;31(4 Suppl):S253-7.
44. Chernow B, Alexander HR, Smallridge RC, Thompson WR, Cook D, Beardsley D, et al. Hormonal responses to graded surgical stress. *Arch Intern Med* 1987;147(7):1273-8.
45. Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 1995;332(20):1351-62.
46. Beishuizen A, Thijs LG, Vermes I. Patterns of corticosteroid-binding globulin and the free cortisol index during septic shock and multitrauma. *Intensive Care Med* 2001;27(10):1584-91.
47. Hammond GL, Smith CL, Paterson NA, Sibbald WJ. A role for corticosteroid-binding globulin in delivery of cortisol to activated neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71(1):34-9.
48. Cooper MS, Bujalska I, Rabbitt E, Walker EA, Bland R, Sheppard MC, et al. Modulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase isozymes by proinflammatory cytokines in osteoblasts: an autocrine switch from glucocorticoid inactivation to activation. *J Bone Miner Res* 2001;16(6):1037-44.
49. Franchimont D, Martens H, Hagelstein MT, Louis E, Dewe W, Chrousos GP, et al. Tumor necrosis factor α decreases, and interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(8):2834-9.
50. Tyrrell JB, Aron DC, Forsham PH. Glucocorticoids and adrenal androgens. In: Greenspan FS, Baxter JD, editors. *Basic and Clinical Endocrinology*: Appleton & Lange; 1994.
51. Demirpençe E. Moleküler endokrinoloji. In: Atlan N, editor. *Biyokimya*. Ankara: Palme Yayıncılık; 2000. p. 596-607.
52. Mehler AH. Amino Acid Metabolism II: Metabolism of the Individual Amino Acids. In: Devlin TM, editor. *Textbook of Biochemistry: with Clinical Correlations*. 3rd ed: ed. New York: Wiley-Liss, Inc.; 1993. p. 522-525.
53. Gelfand RA, Matthews DE, Bier DM, Sherwin RS. Role of counterregulatory hormones in the catabolic response to stress. *J Clin Invest* 1984;74(6):2238-48.
54. Lamberts SW, Bruining HA, de Jong FH. Corticosteroid therapy in severe illness. *N Engl J Med* 1997;337(18):1285-92.

55. Newton R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax* 2000;55(7):603-13.
56. McIntosh LJ, Sapolsky RM. Glucocorticoids increase the accumulation of reactive oxygen species and enhance adriamycin-induced toxicity in neuronal culture. *Exp Neurol* 1996;141(2):201-6.
57. Slater AF, Nobel CS, Maellaro E, Bustamante J, Kimland M, Orrenius S. Nitron spin traps and a nitroxide antioxidant inhibit a common pathway of thymocyte apoptosis. *Biochem J* 1995;306 (Pt 3):771-8.
58. Behl C, Lezoualc'h F, Trapp T, Widmann M, Skutella T, Holsboer F. Glucocorticoids enhance oxidative stress-induced cell death in hippocampal neurons in vitro. *Endocrinology* 1997;138(1):101-6.
59. Sapolsky RM, Packan DR, Vale WW. Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: in vitro demonstration. *Brain Res* 1988;453(1-2):367-71.
60. Filaretova L, Podvigina T, Bagaeva T, Makara G. Gastroprotective action of glucocorticoids during the formation and the healing of indomethacin-induced gastric erosions in rats. *J Physiol Paris* 2001;95(1-6):201-8.
61. Özgüven T, Üstdal M. *Hekimlikte Biyokimya, Hangi Test İstenmeli*. İstanbul, Barış Kitapevi, 1997.
62. Glazer AN. Fluorescence-based assay for reactive oxygen species: a protective role for creatinine. *Faseb J* 1988;2(9):2487-91.
63. Mooradian AD. Antioxidant properties of steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993;45(6):509-11.
64. Hazzard WR. The sex differential in longevity. In: *Principles of Geriatric Medicine and Gerontology*. 2nd Edn ed. New York: McGraw Hill; 1990. p. 37-47.
65. Jellinck PH, Michnovicz JJ, Bradlow HL. Influence of indole-3-carbinol on the hepatic microsomal formation of catechol estrogens. *Steroids* 1991;56(8):446-50.
66. Mukai K, Daifuku K, Yokoyama S, Nakano M. Stopped-flow investigation of antioxidant activity of estrogens in solution. *Biochim Biophys Acta* 1990;1035(3):348-52.
67. Bastianetto S, Quirion R. Any facts behind the DHEA hype? *Trends Pharmacol Sci* 1997;18(12):447-9.
68. Barrett-Connor E, Khaw KT, Yen SS. A prospective study of dehydroepiandrosterone sulfate, mortality, and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1986;315(24):1519-24.

69. Aragno M, Tamagno E, Gatto V, Brignardello E, Parola S, Danni O, et al. Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocin-treated rats against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1999;26(11-12):1467-74.
70. Boccuzzi G, Aragno M, Seccia M, Brignardello E, Tamagno E, Albano E, et al. Protective effect of dehydroepiandrosterone against copper-induced lipid peroxidation in the rat. *Free Radic Biol Med* 1997;22(7):1289-94.
71. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 1991;91(3C):14S-22S.
72. Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995;35(1-2):7-20.
73. Sara H. Kalsiyum kanal blokerlerinin oksidan ve antioksidan savunma sistemlerine etkileri. Uzmanlık Tezi, İzmir: Ege Üniversitesi; 1992.
74. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993;49(3):481-93.
75. Weiss SJ, LoBuglio AF. Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest* 1982;47(1):5-18.
76. Del Maestro R, Thaw H, Bjork J, Planker M, Arfors K. Free radicals as mediators of tissue injury. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1980;492:43-57.
77. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 1991;161(4):488-503.
78. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990;186:1-85.
79. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994;344(8924):721-4.
80. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 2000;109(1):33-44.
81. Di Mascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am J Clin Nutr* 1991;53(1 Suppl):194S-200S.
82. Kayaoglu N. Aktif ve pasif sigara içiminin eritrosit içi antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisi. Uzmanlık Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi; 1999.
83. Tokullugil A. Lippincott'un Biyokimyası. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 1997.
84. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984;222(1):1-15.

85. Bakan V. Deneysel koroziv özefagus yanığında oksidatif hasar ve antioksidan tedavi. Uzmanlık Tezi, Van:Yüzüncü Yıl Üniversitesi;2002.
86. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 2000;108(8):652-9.
87. Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *Faseb J* 1997;11(2):118-24.
88. Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999;34(6):879-86.
89. Fridovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci* 1999;893:13-8.
90. Fridovich I. Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 1986;247(1):1-11.
91. Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79(24):7634-8.
92. Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* 1973;248(13):4793-6.
93. Heffner JE, Repine JE. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis* 1989;140(2):531-54.
94. Nakane T, Asayama K, Kodera K, Hayashibe H, Uchida N, Nakazawa S. Effect of selenium deficiency on cellular and extracellular glutathione peroxidases: immunochemical detection and mRNA analysis in rat kidney and serum. *Free Radic Biol Med* 1998;25(4-5):504-11.
95. Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 1999;27(9-10):951-65.
96. Paglia D, Valentine W. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-169.
97. Sun Y, Oberley L, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34:497-500.
98. Beutler E, Duran O, Kelly B. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963;61:882-8.
99. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 1969;27:502-522.
100. Anderson M. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* 1985;113:548-555.

101. Jain S, McVie R, Duett J, Herbst J. Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes* 1989;38:1539-43.
102. Okhawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxidase in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem* 1979;95:351.
103. Fairbanks V, Klee G. Measurement of hemoglobin concentration in whole blood. In: Tietz N, editor. *Textbook of Clinical Chemistry*: WB Saunders Co.; 1986. p. 1532-34.
104. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
105. Jornot L, Petersen H, Junod AF. Hydrogen peroxide-induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions. *Biochem J* 1998;335 (Pt 1):85-94.
106. Mills EM, Takeda K, Yu ZX, Ferrans V, Katagiri Y, Jiang H, et al. Nerve growth factor treatment prevents the increase in superoxide produced by epidermal growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem* 1998;273(35):22165-8.
107. Ghosh J, Myers CE. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(22):13182-7.
108. Lee YJ, Galofofo SS, Berns CM, Chen JC, Davis BH, Sim JE, et al. Glucose deprivation-induced cytotoxicity and alterations in mitogen-activated protein kinase activation are mediated by oxidative stress in multidrug-resistant human breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 1998;273(9):5294-9.
109. Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999;32(8):595-603.
110. Abdel-Salam OM, Czimmer J, Debrececi A, Szolcsanyi J, Mozsik G. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. *J Physiol Paris* 2001;95(1-6):105-27.
111. Brooks FP. The pathophysiology of peptic ulcer disease. *Dig Dis Sci* 1985;30(11 Suppl):15S-29S.
112. Soll AH. Pathogenesis of peptic ulcer and implications for therapy. *N Engl J Med* 1990;322(13):909-16.
113. Myren J. Smoking and peptic ulcer. *Scand.J.Gastroenterol* 1988;23 (Suppl.153):99 –101.

114. Armstrong CP, Blower AL. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and life threatening complications of peptic ulceration. *Gut* 1987;28(5):527-32.
115. Glavin GB, Hall AM. Brain-gut relationships: gastric mucosal defense is also important. *Acta Physiol Hung* 1992;80(1-4):107-15.
116. Çevikbaş U, Güllüoğlu M. Ağız Boşluğu ve Gastrointestinal Sistem. In: Çevikbaş U, editor. *Temel Patoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi Ltd. Şti.; 2000. p. 470-515.
117. Glavin GB, Szabo S. Effects of the Ca²⁺ chelators EGTA and EDTA on ethanol- or stress-induced gastric mucosal lesions and gastric secretion. *Eur J Pharmacol* 1993;233(2-3):269-73.
118. Urushidani T, Kasuya Y, Okabe S. The mechanism of aggravation of indomethacin-induced gastric ulcers by adrenalectomy in the rat. *Jpn J Pharmacol* 1979;29(5):775-80.
119. Altavilla D, Saitta A, Cucinotta D, Galeano M, Deodato B, Colonna M, et al. Inhibition of lipid peroxidation restores impaired vascular endothelial growth factor expression and stimulates wound healing and angiogenesis in the genetically diabetic mouse. *Diabetes* 2001;50(3):667-74.
120. Gupta A, Singh RL, Raghubir R. Antioxidant status during cutaneous wound healing in immunocompromised rats. *Mol Cell Biochem* 2002;241(1-2):1-7.
121. Shukla A, Rasik AM, Patnaik GK. Depletion of reduced glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant defence enzymes in a healing cutaneous wound. *Free Radic Res* 1997;26(2):93-101.
122. Rasik AM, Shukla A. Antioxidant status in delayed healing type of wounds. *Int J Exp Pathol* 2000;81(4):257-63.
123. Borovic S, Meinitzer A, Loncaric I, Sabolovic S, Wildburger R, Tillian M, et al. Monitoring influence of surgical stress on formation of hydroxyl radicals in tumor bearing rats by measuring salicylic acid metabolites. *Electronic J Int Fed Clin Chem Lab Med* 2000;12(2):1-4.
124. Talas DU, Nayci A, Polat G, Atis S, Comelekoglu U, Bagdatoglu OT, et al. The effects of dexamethasone on lipid peroxidation and nitric oxide levels on the healing of tracheal anastomoses: an experimental study in rats. *Pharmacol Res* 2002;46(3):265-71.
125. Pereira B, Costa-Rosa LF, Bechara EJ, Newsholme P, Curi R. Changes in the TBARs content and superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the lymphoid organs and skeletal muscles of adrenodemodulated rats. *Braz J Med Biol Res* 1998;31(6):827-33.

126. Costa Rosa LF, Curi R, Murphy C, Newsholme P. Effect of adrenaline and phorbol myristate acetate or bacterial lipopolysaccharide on stimulation of pathways of macrophage glucose, glutamine and O₂ metabolism. Evidence for cyclic AMP-dependent protein kinase mediated inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase and activation of NADP⁺-dependent 'malic' enzyme. *Biochem J* 1995;310 (Pt 2):709-14.
127. Toleikis PM, Godin DV. Alteration of antioxidant status following sympathectomy: differential effects of modified plasma levels of adrenaline and noradrenaline. *Mol Cell Biochem* 1995;152(1):39-49.
128. Hidalgo J, Gasull T, Garcia A, Blanquez A, Armario A. Role of glucocorticoids and catecholamines on hepatic thiobarbituric acid reactants in basal and stress conditions in the rat. *Horm Metab Res* 1991;23(3):104-9.
129. Tsukimi Y, Okabe S. Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: role of heat shock proteins in mucosal defense and ulcer healing. *Biol Pharm Bull* 2001;24(1):1-9.
130. Allen DR, Wallis GL, McCay PB. Catechol adrenergic agents enhance hydroxyl radical generation in xanthine oxidase systems containing ferritin: implications for ischemia/reperfusion. *Arch Biochem Biophys* 1994;315(2):235-43.
131. Sözmen E. Yaşlanma Biyokimyası. In: Onat T, Emerk K, Sözmen E, editors. *İnsan Biyokimyası*. Ankara: Palme Yayıncılık; 2002. p. 665-674.
132. Frank L, Lewis PL, Sosenko IR. Dexamethasone stimulation of fetal rat lung antioxidant enzyme activity in parallel with surfactant stimulation. *Pediatrics* 1985;75(3):569-74.
133. Sosenko IR, Lewis PL, Frank L. Metyrapone delays surfactant and antioxidant enzyme maturation in developing rat lung. *Pediatr Res* 1986;20(7):672-5.
134. Murakoshi M, Osamura Y, Watanabe K. Immunoelectron microscopy pinpoints glutathione-peroxidase (GSH-PO) in neonatal rat adrenal cortical cells. *Cell Struct Funct* 1987;12(2):181-6.
135. Suwa T, Mune T, Morita H, Daido H, Saio M, Yasuda K. Role of rat adrenal antioxidant defense systems in the aldosterone turn-off phenomenon. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000;73(1-2):71-8.

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI**

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**İNTAKT VE ADRENALEKTOMİLİ SIÇANLARIN ERİTROSİT VE MİDE
DOKULARINDA OKSİDAN VE ANTİOKSİDAN PARAMETRELERİN
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Abdülkadir YILDIRIM

Uzmanlık Eğitime Başlama Tarihi : 07.07.1999

Uzmanlık Eğitimi Bitirme Tarihi : 06.11.2003

Uzmanlık Sınav Tarihi : 06.11.2003

Tez Danışmanı

: Prof. Dr. Yaşar Nuri ŞAHİN

Jüri Üyesi

: Prof. Dr. Ebubekir BAKAN

Jüri Üyesi

: Prof. Dr. Nuri BAKAN

Jüri Üyesi

: Prof. Dr. Erhan VAROĞLU

Jüri Üyesi

: Yrd. Doç. Dr. Mustafa YILDIRIM

Anabilim Dalı Başkanı

: Prof. Dr. Ebubekir BAKAN

**Kasım 2003
ERZURUM**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**