T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

TİP II DİABETLİLERDE ERİTROSİT GLUTATYON REDÜKTAZ, GLUTATYON PEROKSİDAZ, SÜPEROKSİT DİSMUTAZ, KATALAZ AKTİVİTELERİ, HEMOGLOBİN GLİKOZİLASYONU VE LİPİD PEROKSİDASYONUNUN İNCELENMESİ

Dr. Kağan HUYSAL

88315

Tez Yöneticisi
Prof.Dr. Yaşar Nuri ŞAHİN

Uzmanlık Tezi

ERZURUM-1999

...ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
...MERKEZİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
GİRİŞ VE AMAÇ	1
1- GENEL BİLGİLER	3
1.1. Diabetes mellitus	3
1.2. Kan Glukozunun Regülasyonu	10
1.3. Eritrosit metabolizması	15
1.4. Serbest Radikaller	17
1- MATERYAL VE METOD	43
2.1. Kullanılan cihazlar ve Kimyasal maddeler	43
2.2. Yapılan Analizler	45
2.3. İstatistiksel Analizler	56
2- BULGULAR	57
3- TARTIŞMA	61
4- ÖZET	70
5- KAYNAKLAR	74

GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes Mellitus, insidansı yüksek hastalıklar arasında önemli bir yere sahiptir. Batılı toplumlarda görülme sıklığı % 2 lere ulaşmaktadır. Etyolojisinde pek çok faktör öne sürülmüştür. Hem etyolojinin aydınlatılması, hem de yeni tedavi metotlarının geliştirilmesi açısından yoğun olarak üzerinde çalışılan bir hastalık grubudur.

Diabetes Mellitusta kan glukoz konsantrasyonunun uzun süreli yüksek seyretmesi vücutta metabolik değişikliklere yol açmaktadır. Hücrenin insulin yetmezliği nedeniyle glukozu kullanamaması sonuçta, serbest yağ asitleri (FFA) nin plazma düzeyini yükseltecek ve glukoz yerine enerji ihtiyacı daha çok yağlardan karşılanmaya çalışılacaktır. Karaciğer ise FFA'ları kullanarak keton cisimcikleri açığa çıkaracak ve sonuçta hasta diabetik ketosize sürüklenebilecektir. Diğer metabolik değişiklikler arasında; osmotik değişim, glikozilasyon ve oksidatif stress sonucu serbest radikallerin artışı sayılabilir. Bu metabolik değişimler sonuç olarak diabetik nefropati, diabetik retinopati, diabetik nöropati, ateroskleroz gibi komplikasyonların oluşumuna neden olur.

Yüksek glukoz konsantrasyonları, fizyolojik glukoz konsantrasyonlarında aktive olmayan aldoz redüktazı faliyete geçirerek sorbitol yolunu işletmeye başlamakta, bunun sonucunda hücrelerde osmotik değişiklikler oluşmakta ve ortamdaki NADPH harcanmaktadır. Bütün bunların sonucunda hücredeki glutatyon redüktaz aktivitesi, koenzimi olan NADPH'ın harcanmasıyla azalmakta ve bağlantılı olarak okside glutatyonun (GSSG) redükte glutatyona (GSH) dönüşümü yavaşlamaktadır. Sonuçta hücrenin oksidatif strese karşı savunma mekanizmasının önemli bir parametresi olan GSH'ın azalması, eritrositlerin serbest radikallerle

oluşabilecek hasara karşı korunmasını önemli ölçüde azaltabilecektir. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR); katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan savunma sisteminde görevli enzimlerin birarada çalıştığı ve fonksiyonları itibariyle birbirlerini tamamlayıcı etkileri olduğu düşünülecek olursa, metabolik değişiklikler nedeniyle oluşan antioksidan savunma zaafı bütün sistemi etkileyecektir. Bunun sonucu olarak da özellikle poliansatüre yağ asidlerince zengin biyolojik sistemlerin lipid peroksidasyonu kaçınılmaz olacaktır.

Eritrositler yüksek glukoz konsantrasyonu sonucu oluşan reaksiyonlara büyük ölçüde maruz kalırlar. Biz de bu nedenle her biri tek başına veya ikili ya da üçlü gruplar şeklinde çalışılmış olan GSH-Px, GR, CAT ve SOD aktiviteleri ile glikozile hemoglobin ve malondialdehit seviyelerini diabetli hastaların eritrositlerinde tespit ederek, nasıl etkilendiklerini ve aralarındaki ilişkiyi araştırmayı amaçladık.

1- GENEL BİLGİLER

1.1 Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM) heterojen bir hastalıktır. Karbonhidrat metabolizmasının patofizyolojik bir çok bozukluğunu ihtiva eder, bu bozuklukların her biri hiperglisemi sonucu gelişmektedir. Pankreasın insülin salgısının mutlak veya nisbi yetersizliği ya da etkisinin yetersizliği (insulin rezistansı) ile oluşan, kendini vakaların bir bölümünde bazı klinik belirtilerle, fakat bütün vakalarda hipergilisemi ile belli eden, karbonhidrat metabolizmasının yanında lipid ve protein metabolizması bozukluğu ile de karakterize bir endokrin ve metabolizma hastalığıdır. Hastalığın ilerlemesiyle retinopati, renal yetmezlik, nöropati ve ateroskleroz gibi spesifik komplikasyonların oluşumundaki risk artar (1-3).

Dünyada en çok kabul gören diabetes mellitus sınıflaması Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından önerilen ve diabetes mellitusu 3 ana başlık altında toplayan sınıflamadır. Bu sınıflamaya göre:

I- Bu ilk grup 4 alt başlıktan oluşmaktadır.

a) Tip I DM: İnsulin bağımlı Tip (IDDM)

b) Tip II DM: İnsulin bağımsız Tip (NIDDM)

c) Malnutrisyonla ilişkili DM

d) Bazı koşullar ve sendromlarla beraber olan DM

II- Bozulmuş glukoz toleransı ile beraber olan Tip

III- Gebelik diabeti (Gestasyonel diabet) (1,5)

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

1.1.1 SINIFLAMA

1.1.1.1 İnsülin Bağımlı Diabetes mellitus (IDDM)

Mevcut deliller göstermişler ki bu hastalığın oluşumunda pankreatik β hücrelerinde yavaşça gelişen otoimmün hasarın oluşumu için belli bir peryoda ihtiyaç olmasına rağmen, hastalığın semptomlarının ortaya çıkışı ani olmaktadır.

Hastalık ortaya çıktığı anda genellikle adacık antikorları mevcuttur. HLA DR_3 DR_4 ile ilgili genetik faktörler adacık hücrelerine karşı yönelmiş sitotoksik immün aktiviteyle ilişkilidir. Çevresel faktörlerin, özelliklede bazı viral ajanların (Rubella, kabakulak ve koksakiB gibi) predispoze bireylerde etyolojik rol oynadığı belirlenmiştir.

İnsulinin sekretuvar kapasitesinin yetersizliği tip I i tip II den ayıran klinik bir özellik olan ketozise neden olur. Bu tür hastaların tedavisinde ve ketozisin önlenmesi için insülin enjeksiyonuna ihtiyaç vardır. Diabet populasyonunun % 15 tip I diabetes mellitusdur. Primer olarak genç hastalardan oluşur. Ancak herhangi bir yaşta da görülebilir. Hastaların yaklaşık yarısında 21 yaşından önce tanı koyulur. Tanı koymak genellikle problem olmaz zira büyük sıklıkla hiperglisemi yüksek seviyededir ve insulin tedavisi uygulanmayanlarda ketozis gelişir.(1,4,5).

1.1.1.2 İnsülin Bağımsız Diabetes Mellitus (NIDDM)

Diabet populasyonunun yaklaşık % 90'nını teşkil etmektedir. Genellikle başlangıç yavaş ve asemptomatik olduğu için metabolik bozukluğun başlangıç tarihini söylemek zordur. Genetik geçiş özelliğine rağmen, hastalık oldukça geç başlar ve bazen 60, 70 ya da 80 yaş öncesi ortaya çıkmaz. Hastalar çoğunlukla şişman olup en az % 80'i ideal kilolarının % 15 üzerindedir. Bunlarda kilo kaybı genellikle hiperglisemiyi düzeltir. Bununla birlikte hiperglisemiyi kontrol etmek için bir

çok Tip II diabetli diet, oral hipoglisemik ajan veya insuline ihtiyaç duyar. Bazal ve stimule insulin cevapları Tip II diabetiklerde değişkendir.

Tip II diabetli hastalar normal şartlar altında ketozise dirençlidirler, şiddetli stres ve enfeksiyonlar sırasında ketozis gelişebilir. Nedeni tam olarak bilinmez. Genellikle hastalar hem insulin rezistansı, hem de β hücre yetmezliği gösterirler. Bu lezyonlardan hangisinin primer defekt olduğu bilinmemektedir. Her ikisinin birlikte hastalığın patogenezinda rol oynayıp oynamayacağı da tartışılmaktadır(1,2,4-6).

İnsulin Rezistansı

Şişman nondiabetik hastalar ve NIDDM'li hastalar insulin etkisine rezistansı düşündüren, dolaşımdaki normal insulin düzeylerine azalmış biyolojik cevabı göstermektedirler. Rezistansı oluşturan iki mekanizma, reseptör down regulasyonundan dolayı reseptör sayısındaki azalma ve henüz açıkca anlaşılamamış olan reseptör sonrası anomalileridir. İnsulin rezistansına sahip bir çok insanda hastalık gelişmemesi β hücre disfonksiyonunun diabet gelişiminde kritik bir role sahip olduğunu düşündürmektedir (2,5).

Yetersiz İnsulin Sekresyonu

Yetersiz insulin sekresyonu NIDDM gelişmesinde önemlidir. Çünkü sağlıklı β hücreleri insulin rezistansını kompanse edebilirler. Major defekt glukoza bağlı insulin salınımının kaybı ve arjinine bağlı insülin salınma fonksiyonundaki kayıptır. β hücre defektinin primer veya insulin rezistansına sekonder olup olmadığı bilinmemektedir.

Şişman erişkinlerde; insulin rezistansı, açlık ve postprandial (yemek sonrası) insulin konsantrasyonlarında artma ve insulin reseptörlerinin sayısında azalma sıklıkla görülmektedir. İnsulin reseptör sayısındaki azalmanın, reseptörlerde down

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

regülasyon oluşturan insulin seviye artışı nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Kilo kaybı ve egzersiz bu anormalliklerin hepsini tersine çevirebilmektedir.

Bu hastalıkta genetik faktörler de güçlü bir role sahiptir. Monozigotik ikizlerden birinde diabet görüldüğü taktirde % 90 oranında diğer kardeşte de diabete rastlanmaktadır. Bununla beraber NIDDM'nin HLA ile zayıf bir ilişkisinin zayıf olduğu tesbit edilmiştir.

NIDDM'nin patogenezi tam olarak bilinmemektedır. Etyolojisi muhtemelen multifaktöriyel gibi gözükmektedir ve tek bir nedenin gösterilmesi zordur (2,5).

1.1.1.3 Malnutrisyonla İlişkili DM

Bu klinik altgrup tropikal ve gelişmekte olan ülkelerde genç erişkinler arasında görülür. Farklı klinik özellikleri, seyri ve belli bölgelerde çok fazla sayıda vakaların olması sınıflandırmada diabete ayrı bir sınıfın girmesine yol açtı.

Klinik çalışmalar bu alt grub için en az 2 alt sınıfı öne sürmektedir:

A) Fibrocalculous pankreatik diabet

B) Protein yetersiz pankreatik diabet (2,5)

1.1.1.4 Bozulmuş Glukoz Toleransı

Bozulmuş toleranslı kişilerin plazma glukoz konsantrasyonları normal değerler ile diabet için tanı koydurucu olan değerler arasında seyreder. Bu gibi bireylerin plazma glukoz konsantrasyonları belli bir zaman periyodundan sonra aşikar diabete doğru ilerler. Ancak büyük bir kısmında aynı kalır. Bazılarında ise glukoz konsantrasyonları normale döner.

Bozulmuş glukoz toleransı sadece oral glukoz tolerans testi (OGTT) ile belirlenir. Bozulmuş glukoz toleransı, OGTT'de 2. saatteki plazma glukoz

konsantrasyonunun 126-200 mg/dl (7-11,1 mmol/L) arasında olmasıyla belirlenir (2,5).

1.1.1.5 Gestasyonel Diabet

Gestasyonel diabet, hamilelerin yaklaşık % 2 sinde olur. Eğer bu durum belirlenmezse ve tedavi edilmezse perinatal morbidite ve mortalite riski artar. Daha önemlisi bu gibi hastaların sonraki yıllarda diabetin gelişimi için artmış riske sahip oldukları bilinmektedir. Gestasyonel diabetli kişilerin doğumdan sonra glukoz düzeyleri genellikle normale döner veya bozulmuş glukoz toleransına sahip olurlar, ya da diabet oluşur (2,5).

1.1.2 Teşhis

Hastalık glukoz metabolizması bozuklukları ile karakterize olduğundan, teşhis, glukoz ölçümleriyle konmaktadır. Semptomatik diabetes mellitusun tanısı güç değildir. Polidipsi, polifaji ve kilo kaybı belirtileri ile birlikte plazma glukoz düzeyinin yükselmesi tanı koydurmaktadır. Semptomu olmayan bir kişide ise diabetten süphelenince ilk tanı koyduracak test açlık plazma glukoz konsantrasyonunun ölçülmesidir. Tanı koydurucu değer olarak açlık plazma glukoz konsantrasyonunun 7,8 mmo/L (140 mg/dl) den yüksek olması kriter olarak kabul edilmekteydi. Ancak son çalışmalar göstermiştir ki, OGTT yapılan ve 2. saat sonunda plazma glukoz düzeyi ≥ 11,1 mmol/L (200 mg/dl) olan hastaların ancak % 25 inde açlık plazma glukoz konsantrasyonu 7,8 mmol/L (140 mg/dl) seviyesine ulaşmıştır. OGTT'nin diabet için hassas bir test olduğu düşünülerek açlık plazma glukoz konsantrasyonuyla, OGTT arasında paralel çalışmalar yapılmış, sonuç olarak ta diabet için açlık plazma glukoz konsantrasyonunun sınır değeri 7 mmol/L (126 mg/dl) olarak kabul edilmiştir.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Yukarıdaki bulgular ışığında diabetin teşhisine 3 yolla gidilebilmektedir.

I- Diabet semptomları

II- Açlık plazma glukoz konsantrasyonunun ≥ 7 mmol/L (126 mg/dl) olması

III- OGTT de 2 saat sonunda plazma glukoz konsantrasyonunun ≥ 11,1 mmol/L (200 mg/dl) olması

Bu faktörlerden herhangi birinin pozitif olduğu kişilerde takip eden günlerde testi tekrarlayarak tanı kesinleştirilmelidir.

Normal bir insanda açlık plazma glukoz konsantrasyonu 6,1 mmol/L (110 mg/dl) dir. OGTT için son 3 gün içinde normal karbonhidrat diyeti almış ve normal fiziki aktivitesinde bulunmuş kişiye, içinde 75 g glukoz bulunan sıvı içirilir (8-16 saatlik açlık plazma glukozu < 7 mmol/L olanlara uygulanacak). Sonuçlar 30, 60, 90, 120 dakikalarda yorumlanır. WHO'nun tanı kriterleri aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 1) (2,3,6,7).

Tablo 1: Plazma glukoz konsantrasyonu mmol/L (mg/dl)

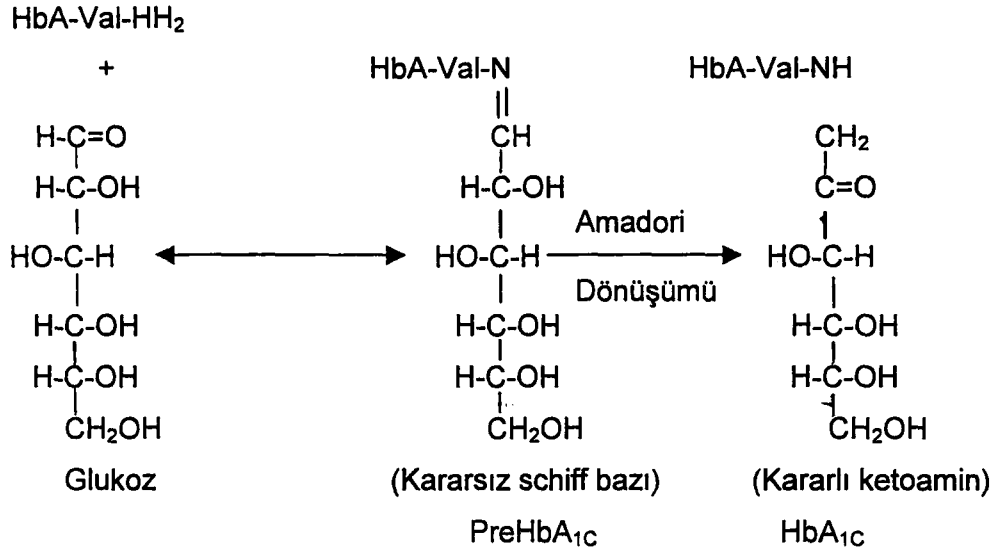
Açlık	≥7 mmol/L (126 mg/dl)	
OGTT 30, 60, 90 veya 120. Dakikaların en az biri	≥ 11,1 mmol/L (200 mg/dl)	Diabetes Mellitus
Açlık	< 7 mmol/L (126 mg/dl)	Bozulmuş
OGTT 2. Saat	7-11,1 mmol/L (126-200 mg/dl)	glukoz toleransı

Hastalığın en önemli kriteri olan hiperglisemiye bağlı olarak kan glukoz konsantrasyonu genellikle 10 mmol/L (180 mg/dl) yi aştığında glukozun maksimum renal tübüler reabsorbsiyon seviyeleri (böbrek eşiği) aşılır ve idrarla glukoz atılır. Glukozüri ile birlikte poliuri ve polidipsi görülür. Yeterli kalori alınımına rağmen kilo kaybı olur (7-9).

Tanıda kullanılan testlerden biri de intravenöz glukoz tolerans testidir (IVGTT). Rutin olarak kullanılan bir test değildir. Daha çok araştırmaya yönelik çalışmalarda ve intestinal emilim bozukluğu olan kişilerde kullanılır (6).

Kullanılan bir başka test ise glikozile hemoglobin tayinidir. Normal erişkin eritrositlerindeki hemoglobinler, hemoglobin A (HbA) hemoglobin A_2 (HbA_2) ve hemoglobin F (HbF) den ibarettir. HbA 2α ve 2β, HbA_2 2α ve 2δ HbF 2α ve 2γ biçiminde dörder polipeptid zincirinden müteşekkildirler. Yetişkinlerde toplam hemoglobinin % 90'ı HbA'dır. HbA'nın kromatografik incelenmesi sonucu HbA_{1a}, HbA_{1b} ve HbA_{1c}'den oluşan minor hemoglobinler bulunmuştur. Glikohemoglobinin major formu hemoglobin A_{1c}'dir ve normalde hemoglobinin % 4-6 sını oluşturur. Kalan glikohemoglobinler (total hemoglobinin % 2-4 dür), fosforile glukoz veya fruktoz içerirler ve sırasıyla hemoglobin A_{1a} ve hemoglobin A_{1b} olarak isimlendirilirler. HbA nın β zincirlerinin N-terminal ucundaki valin amino asidi ile glukozun korelasyonu sonucu kararsız bir Schiff bazı meydana gelir daha sonra bu Amadori dönüşümü ile kararlı bir ketoamini oluşturur (HbA_{1c}).

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ



Hemoglobinin glikozilasyonu kan glukoz konsantrasyonu ile yakından ilişkilidir. Bu reaksiyon reversibl değildir. Glikozile hemoglobinlerin yarı ömrü dolaşımdaki eritrositlerin yaşam süresi ile yakından ilişkilidir. Bundan dolayı glikohemoglobin önceki 8-12 haftadaki kan glukoz durumunu yansıtır. Glikohemoglobin tayini (HbA_{1c}) diabetik hastaların uzun zamanlı glikometabolik kontrolünü saptamak için en basit, uygun ve ekonomik yoldur (1,7,10,11).

1.2 Kan glukozunun regülasyonu

Kan glukoz konsantrasyonu, çeşitli hormonlar tarafından düzenlenen bir çok ara yolun kompleks etkileşimiyle kontrol edilmektedir. Glukoneogenezis ve glikojenoliz, glikojen ile glukoz arasındaki dönüşümü sağlar. Glukozun karbonhidrat dışı kaynaklardan (aminoasitler, gliserol veya laktat gibi) elde edilmesi glukoneojenezis olarak adlandırılır. Glikoliz ve Krebs siklusuyla glukoz veya diğer hekzosların CO_2 ve H_2O ye kadar oksidasyonu sırasında açığa çıkan indirgenmiş koenzimler elektron transport zincirinde oksijene aktarılarak ATP formundaki enerji ortaya çıkarılır.

Açlık sırasındaki karaciğerde depolanmış olan glikojenin yıkımıyla kana glukoz sağlanır. Yıkılan glikojenden kana glukoz verilmesini sağlayan organlar glukoz-6-fosfataz içerirler (karaciğer ve böbrekler). Bu enzim glukoz-6-fosfatı (glikojenoliz veya glukoneogenezle elde edilen) glukoza çevirmek için gereklidir. İskelet kasında glukoz-6-fosfataz olmadığı için kas glukozu direkt olarak kana verilemez. Daha fazla uzamış açlıklardan normoglisemik kan glukoz düzeylerinin sağlanmasında glukoneogenezis önemli bir role sahiptir. Yemekten sonra ise absorbe edilen glukoz, glikojen veya yağa çevrilir.

Kan glukoz düzeyi, hormonlar tarafından dar bir aralıkta tutulmaktadır. Bu hormonlar glukozu kana vermekte veya çıkarmaktadır. Bu hormonlardan insulin kan glukoz düzeyini düşürürken, karşı regulatuar hormonlar (glukagon, kortizol, epinefrin ve Growth Hormon) kan glukoz düzeyini arttırırlar (2,6,7).

1.2.1 İnsulin

Langerhans'ın 1860 larda pankreas ada hücrelerini, Mering ve Minkowbslei'nin 1889 da pankreatominin diabet oluşturduğunu tesbit etmiş olmalarına rağmen ada hücreleri ile diabet arasındaki ilişki 1909 da Mayer, 1917 de Sharpey Schaffer tarafından ileri sürülmüştür. Banting ve Best ise pankreas ada hücrelerinin asid etanol ekstraktlarının güçlü hipoglisemik etkili bir faktöre sahip olduğunu tesbit ettiler. Sığır ve domuzdan elde edilenlerin de insanda hipoglisemik etki göstermekte olduğu bu aktiviteye "insülin" adı verilmiştir.

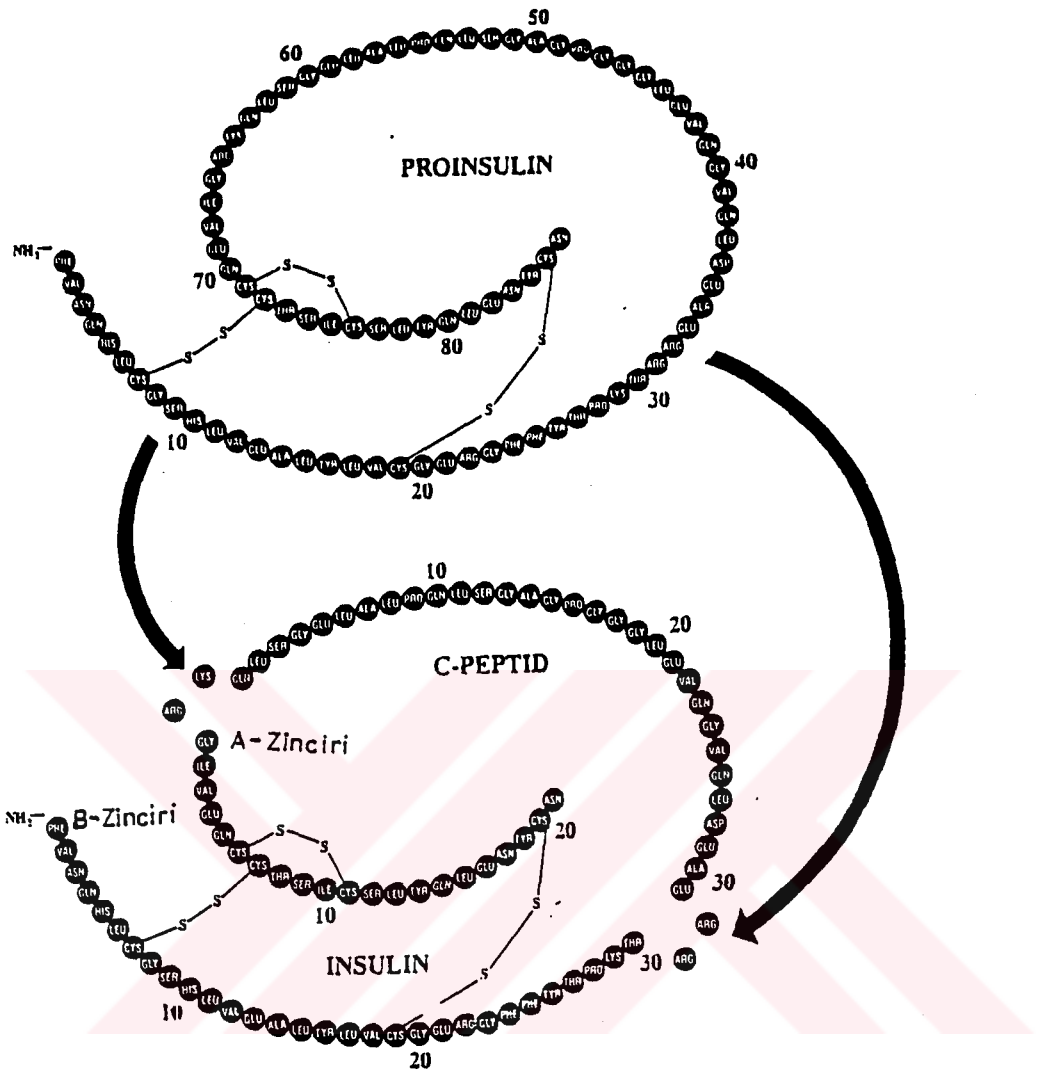
Banting-Best ile koordineli olarak Eli Lilly 1922 de diabetli hastalarda kullanılmak üzere yeterli miktarlarda insülini saflaştırdılar. Hormon aktivitesine sahip olduğu bilinen ilk protein olan insülin Abel ve arkadaşları tarafından 1926 da saflaştırılıp kristallendirildi. Sanger ve arkadaşları tarafından 1955 te amino asid dizisi

belirlendi. Du, Zahn ve arkadaşları 1964 te kimyasal teknikle sentezlediler. Steine ve arkadaşları aktif insülinden daha büyük bir protein halinde insülinin sentezlendiğini tesbit ettiler ve nihayet recombinant DNA tekniği ile 1970 li yılların sonlarında insan proinsülini E.Coli vasıtasıyla üretilmiş, karboksi peptidaz-B ve tripsin ile aktif peptid ve C-peptid birbirinden koparılmış ve bunların karışımından insülin izole edilmiştir. Bütün bu teknikler proteinler için ilk olarak insülinde gerçekleştirilmiş uygulamalardır. Bu yönüyle ilklere sahip olan insülinin, moleküler etki mekanizmasında pek çok husus hala bilinmemektedir (2,5).

İnsulin, pankreasın Langerhans adacıklarındaki β hücreleri tarafından üretilen protein yapısında bir hormondur. İnsan insulini (MW 6000) 51 amino asidi içeren A ve B zincirlerinden oluşmuştur. Bu iki zincir birbirine 2 disülfür köprüsüyle bağlanmaktadır. Üçüncü bir zincir içi disülfür köprüsüyse A zincirinde bulunmaktadır.

Sentez aşamasında ilk olarak oluşan preproinsülin (MW 12.000) 100 amino asid içermektedir. Bu, pankreasın β hücrelerindeki granüllü endoplazmik retikulumun ribozomları tarafından sentezlenmektedir. Normal şartlarda sirkülasyonda bulunmayan preproinsülin cleaving enzim (parçalayıcı enzim) tarafından proinsuline (MW 9000) dönüştürülmektedir. Bu da 86 amino asid içermektedir. Daha sonra proinsulin ve cleaving enzim golgi kompleksine geçmekte, ve buradan sekretuvar bir granül içerisinde sitozole salınmaktadır. Bu oluşum içinde proteolitik cleaving enzim tarafından insülin ve C peptit ortaya çıkarılmaktadır. Daha sonra sekretuvar kese hücre membranıyla birleşerek insulin ve C peptid portal sirkulasyona verilmektedir (Şekil 1).

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ



Şekil 1: Proinsülinden insülinin oluşumu

İnsülinin etkileri her ne kadar iyi bilinse de, etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Etkiler hormon hücre yüzeyindeki glikoprotein yapısındaki reseptöre bağlanınca başlar. Bu reseptörler disülfür bağlarıyla bağlı olan 2α ve 2β subunitlerini içeren tetramerlerdir. α subuniti (MA 135.000) plazma membranının yüzeyinde bulunur, ekstrasellulerdir ve insulini muhtemelen sisteinden zengin

bölgesine bağlamaktadır. β subunitesi (MA 95.000) reseptörün ikinci temel işlevini, yani sinyal naklini başaran bir transmembran proteindir. β subunitesinin stoplazmik bölümü trozin kinaz aktivitesi ve bir otofosforilasyon bölgesine sahiptir.

Kendi reseptörüne bağlanan insülin endojen tirozin kinazı aktive eder ve β subünitinin otofosforilasyonunu sağlar. Bu insülin etkisinde ara ürünleri oluşturabilecek çeşitli sellüler proteinlerin artmış fosforilasyonuna sebep olur. Bu proteinlerdenbir kaçı intakt hücrede tirozin rezidüleri üzerinden fosforile edilirler. İnsülin çok fazla sayıdaki proteinin serin/treonin rezidülerinin fosforilasyonunu stimüle etmektedir. Bu nedenle protein kinazların bir kısmının insülinle aktive edildiği ileri sürülmektedir. Bazı serin kinazların insülinle aktive edildiği belirlenmiş olmasına rağmen bunların insülin sinyal iletimindeki direkt rolleri kesin değildir. Serin/treonin kinazların kaskadını başlatan tirozin kinazın aktivasyonundan sonraki olaylar henüz aydınlatılamamıştır. İnsülin tarafından stimüle edilen sayısız etkilere göz atıldığında tek bir faktörün bulunmadığı görülmüştür. Bu etkiler hem ikincil haberci hem de fosforilasyon yollarını beraberce ilgilendirebilir.

İnsülin reseptör siklüsü hücre yüzeyi ile intrasellüler bölgeler arasındadır. İntraselüler havuza resöptörlerin lokalizasyonu insulin, diğer hormonlar (Örn. GH) ve egzersiz tarafından stimüle edilmektedir. Bu prosesin insulin sinyal üretimindeki rolü henüz bilinmemektedir.

NIDDM'li bazı hastalarda insülin reseptör sayısında azalma tespit edilmişse de bu durum pek çok hastada insülin rezistansının derecesiyle göreceli değildir. Ek olarak hastalarda insulin reseptör otofosforilasyonu, trozin kinaz aktivitesi bozuktur. Kilo kaybı ve hiperglisemiyi düzelten diğer tedavi yöntemleri ile bu defektler düzeltilebilir. Dolayısıyla reseptör fonksiyonlarındaki bu defekt sebepten çok bir sonuç gibi görülmektedir (1,2,4,5).

1.3 Eritrosit Metabolizması

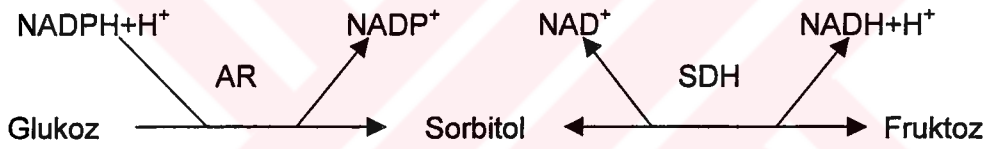
Eritrositler hemoglobin vasıtasıyla akciğerlerden dokulara oksijen, dokulardan da akciğere karbondioksit taşırlar. Hemoglobin bu fonksiyonunu yerine getirebilmek için indirgenmiş durumda olmalıdır. Çevresinde çeşitli organik ve inorganik iyonlar belli konsantrasyonlarda bulunmalıdır. Eritrosit metabolizması da bu ortamı sağlayacak şekilde düzenlenmektedir. Plazma glukozu da onun ana enerji kaynağıdır. Glukozun Embden-Meyerhof yoluyla pirüvik ve laktik aside kadar anaerobik olarak yıkımı, ADP'nin fosforilasyonuyla ATP'nin oluşumuna yol açar; ATP'nin primer fonksiyonu ise hücre içine K^+ girişini, dışına ise Na^+ çıkışını sağlayan pompanın enerjisini sağlamak gibi gözükmektedir. Ayrıca eritrositin bikonkav şeklinin korunmasında ATP kullanılmaktadır ve bazı vital eritrosit bileşiklerinin (FAD, AMP ve GSH) sentezi için de ATP gereklidir. NADH ise hemoglobinin okside formunun (methemoglobin) redükte forma indirgenmesi için gereklidir. Embden-Meyerhof yolunun diğer bir önemli fonksiyonu 2,3-difosfogliserat üretimidir. ATP ile birlikle bu fosfat esteri eritrositin oksijene olan affinitesini düzenler.

Glukoz metabolizmasının ilave bir yolu da direkt oksidatif bir şanttır (Heksoz monofosfat şantı). Bu yoldaki indirgenen koenzim Embden-Meyerhof yolunda olduğu gibi NAD^+ değil $NADP^+$ dir. İndirgenmiş NADP nin (NADPH) ana fonksiyonu glutatyonun, glutatyon redüktaz reaksiyonuyla indirgenmiş durumda kalmasını sağlamaktır. Ayrıca hemoglobin ve GSH'nın disülfürlerini de indirgeyebilir. Glutatyon eritrositlerde sülfhidril gruplarının aktif, indirgemiş durumda kalmalarını sağlar ve glutatyon peroksidaz yoluyla düşük H_2O_2 seviyelerini detoksifiye eder. Eritrositler proteinleri üretebilme yeteneğine sahip olmamalarına rağmen FAD, NAD ve NADH gibi koenzimleri ve glutatyonu üretebilme kapasiteleri vardır (7,12).

Seminal veziküller, lens, retina, sinir dokusu, aorta, böbrekler, plasenta, karaciğer ve eritrositler gibi glukozun hücre içine girişinde insuline ihtiyaç duymayan doku, organ ve hücrelerde intrasellüler glukoz konsantrasyonu kan glukoz seviyesine ulaşır.

Eritrositlerde artan hücre içi glukoz konsantrasyonu aldoz redüktazı indükleyerek aşırı miktarda sorbitol oluşmasına yol açmaktadır. Bu yolda glukoz, glikolizdeki hekzokinaz ve fosfofruktokinaz kontrol noktalarına uğramayarak, sorbitol üzerinden dihidroksi asetonfosfat ve gliseraldehit-3-fosfat ile glikolizin son aşamasına girmektedir (9,13).

Sorbitol yolu glukozun fosforillenmeksizin enzimatik olarak sorbitol üzerinden fruktoza dönüştüğü karbonhidrat metabolizmasının bir yan yoludur. Bu dönüşüm iki enzim ile gerçekleşir. Bunlar aldoz reduktaz (AR) ve sorbitol dehidrojenazdır (SDH).



Sorbitol yolu bir transdehidrojenasyon fonksiyonu da görmektedir. Burada NADPH'ın oksitlenmesi ve NAD^+'nin redüklenmesi reaksiyonları birbirine bağlı olarak gerçekleşir. Glutatyon redüktazın (GR) da kofaktör olarak kullandığı NADPH için GR ile AR arasında bir yarışma söz konusu olabilir. GR'in kofakötrünün azalması, GSSG'nin GSH'a dönüşümü reaksiyonunu yavaşlatacak sonuçta hücreyi oksidatif hasardan korumakla görevli GSH seviyesinin düşmesi hücre hasarına neden olabilir (9,13).

1.4 Serbest Radikaller

Atomlardaki elektronlar, orbitaller olarak bilinen bölgelerde dönerler. Herbir orbital maksimum olarak 2 elektronu ihtiva eder. Bu iki elektron birbirine zıt yönde dönmektedir. Serbest radikaller ise bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir(14).

Molekülleri oluşturan bağların çözülmesi ve başka bir düzenle yeniden oluşması kimyasal reaksiyon olarak adlandırılır. Bu kimyasal reaksiyonların bir çoğunda bağların parçalanması sonucunda kısa ömürlü ara bileşikler oluşur.

Moleküllerdeki bağların parçalanması heterolitik ve homolitik olmak üzere başlıca iki şekilde olur. Heterolitik parçalanmada bağ parçalanırken bağı oluşturan her iki elektron da aynı atom üzerinde kalır. Bu tür parçalanma sonucunda (+) ve (-) yüklü iyonlar oluşacağından, bu tür parçalanmaya iyonik parçalanma denir.

$$X\text{-}Y \longrightarrow X^{+}+Y^{-}$$

Homolitik parçalanmada ise bağ parçalanırken elektronlardan herbiri farklı atom üzerinde kalır. Bu şekilde bağ parçalanmasına, sonuçta ortaklanmamış elektron taşıyan moleküller veya atomlar meydana gelmesi sebebiyle radikalik parçalanma denir. Homolitik füzyon için gerekli enerji yüksek sıcaklık, ultraviyole veya iyonize radyasyondan sağlanır(15-17).

Biyolojik sistemlerdeyse serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelir.

$$A+e^{-} \longrightarrow A^{-}.$$

Elektron transport sistemlerinin aktivitesi sırasında veya çeşitli hücresel enzimlerin aktivitesiyle (örn. ksantin oksidaz) tek elektron transferi şeklinde gerçekleşen reaksiyonlar, radikal yapısına sahip ara ürünler oluşturur (14,17-19).

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Bir elektron bir orbitali tek başına işgal ediyorsa dönmenin yönü iki şekilde olabilir. Elektronun dönme rezonansını ölçme teknikleriyle radikaller tespit edilirler. Bu tespit ortaklanmamış elektronlardan dolayı meydana gelen enerji değişiminin ölçümüyle yapılmaktadır. Orbitallerde ortaklanmış elektronların mevcudiyetinde molekül daha stabildir. Radikal yapısına sahip atom veya moleküller, ortaklanmamış elektronları sebebiyle ileri derecede reaksiyona girme eğilimi taşırlar. İşte başka moleküllerle veya atomlarla kolayca elektron alışverişine girip onların yapısını bozan bu moleküllere serbest radikaller denmektedir (20,21).

1.4.1 Serbest Oksijen Radikalleri

Aerobik organizmalarda, moleküler oksijen bulunduğundan ve bu molekülün elektron alıcı özelliğinden dolayı, oksijen kaynaklı serbest radikaller, hücresel serbest radikal reaksiyonlarının medyatörüdür (22).

Oksijenin elektronları o şekilde dağılmışlardır ki bu elektronlardan iki tanesi eşleşmemiştir. Bu yüzden oksijen bazen bir diradikal olarak değerlendirilir. Ancak bu molekülün reaktif bir özelliği yoktur. Ama oksijenin bu yapısı ona diğer radikallerle reaksiyona girme özelliği sağlar. Radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girer (15,20).

Aerobik organizmalarda mitokondrial solunum zinciri sonunda oksijen suya indirgenir. Oksijen molekülü 4 elektron ve 2 proton transferiyle suya indirgeninceye kadar ferrositokrom C:oksijen oksidoredüktaza [kompleks IV] bağlı kalır. Mitokondrial solunum zincirinin başlangıç kısmındaki elektron akışı sırasında tek elektron sızması, özellikle hem olmayan Fe-sülfür proteinlerinden elektronların kaçışıyla olmakta ve bunun sonucunda oksijenin süperoksit anyonuna redüksiyonu gerçekleşmektedir.

Mitokondrial solunum zincirinden elektronların sızması normal aerobik metabolizma sırasında devamlı olarak superoksit anyonu oluşturabilir (18).

H_2O_2 ve myeloperoksidaz tarafından açığa çıkarılan HOCl de ortaklanmamış elektronlara sahip değildir bu nedenle radikal olarak tanımlanmazlar. Ancak reaktif oksijen türleri terimi sadece O_2^- ve·OH gibi radikaller için değil, aynı zamanda H_2O_2 ve HOCl gibi non- radikaller içinde kullanılmaktadır (14).

1.4.1.1 Superoksit Radikali

Doğal oksijen molekülünün çevresindeki herhangi bir başka molekülden elektron almış hali olan süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) anyonu; başka moleküller ile kolayca elektron alış verişine girebilen bir özelliktedir, yani radikaldir. Oksijen metabolize edilirken sıklıkla ilk oluşan radikal süperoksit radikalidir ($O_2^{\cdot-}$). Süperoksit radikali moleküler oksijenin indirgenmesinde ara basamaktır. Bu radikalin moleküler düzeyde önemli özelliği, sekonder olarak ürettiği radikallerdir. Yani $O_2^{\cdot-}$ üzerinden diğer radikallerin üretimi önem arz etmektedir (20,23,24).

$O_2^{\cdot-}$ genel olarak anyon şeklinde tarif edildiği halde, ortamın pH sına bağlı olarak protonlanarak katyon haline dönüşebilir. Bu durumda perhidroksi radikali ($HO_2^{\cdot}$) ismini alır (22).

İn vivo olarak $O_2^{\cdot-}$ üretimi tesadüfi olabilir, fakat genellikle fonksiyoneldir. Aktive fagositik hücreler, monositler, nötrofiller, eozinofiller ve her tip makrofajlar $O_2^{\cdot-}$ üretebilirler. Süperoksid hücrede pek çok enzimatik tepkimede ürün olarak oluşur bu enzimlere örnek olarak NADP oksidaz, ksantin oksidaz ve monoaminooksidaz (MAO) gösterilebilir (14,19,23).

Süperoksit radikalinin (O_2^-) oluşumu bazen de kimyasal bir kaza sonucu oluşabilir. Örneğin mitokondri fonksiyonel olduğu zaman solunum zinciri boyunca

geçen elektronların bazıları elektron taşıyıcılarından sızarak direkt olarak oksijene geçer ve oksijeni, oksijen radikali haline getirir. Superoksid bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak fazla zarar vermez. Asıl önemli olan H_2O_2 kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (14,17,18,21,22).

Superoksit hem oksitleyici hem de redukleyici olarak reaksiyona girebilen, iyi bir indirgeyici zayıf bir oksitleyici ajandır. Diğer yandan iki süperoksit radikalinden biri indirgeyici, diğeri ise yükseltgeyici olacak şekilde birbiri ile reaksiyona girerek bir moleküler oksijen ve bir H_2O_2 meydana getirebilir.

$$HO_2^{\cdot} + O_2^{\cdot-} + H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2$$

Bu dismutasyon reaksiyonu uygun şartlarda spontan olarak meydana gelebileceği gibi SOD enziminin katalizi ile de meydana gelebilir. PH 4,8 de superoksit anyon ve katyon şekli eşit oranda bulunacağından spontan dismutasyon en hızlı olarak bu pH da gerçekleşir. Peroksi katyon radikalinin pKa sı olan 4,8 den çok düşük veya çok yüksek pH larda spontan dismutasyon çok yavaş olarak gerçekleşir. Örneğin pH 7,8 in üstünde SOD yokluğunda dismutasyon, SOD varlığına nazaran 4 kat yavaştır (14,16,17).

$O_2^{\cdot-}$ redüktan olarak ferrisitokrom C nin ya da nitroblue tetrozoliumun redüksiyonunda bir elektron kaybeder ve yükseltgenir. Sitokrom C yi indirgemesi SOD tarafından inhibe edilir. Bundan faydalanılarak SOD aktivitesi ve fagositler tarafından üretilen O_2^- tayini yapılır(14,16,17).

$$Cyt(Fe^{+3}) + O_2^{\cdot-} \longrightarrow O_2 + Cyt(Fe^{+2})$$

Oksidan olarak görev yaptığında, örneğin epinefrinin oksidasyonunda bir elektron alır ve hidrojen perokside indirgenir(14,17).

1.4.1.2 Hidrojen Peroksit

Doğal oksijen çevresindeki moleküllerden iki elektron alırsa oluşan molekül peroksittir. Bu molekülün oluşması bazen superoksitin bir elektron alışı ile de olabilmektedir.

Peroksit molekülü, iki hidrojen atomu ile birleşecek olursa hidrojen peroksit (H_2O_2) molekülü oluşur. Bu molekül nonradikal fakat hafif reaktif özellikte, membranlardan kolayca geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır (17,20).

H_2O_2'nin mitokondrial üretimi 1966 da ilk defa Deta Jensen tarafından bulunmuştur. Biyolojik sistemlerde H_2O_2 oluşumuyla ilgili çalışmalar göstermiştir ki hepsi olmasa da H_2O_2 in çoğu $O_2^{\cdot-}$ nin dismutasyonuyla oluşmaktadır. H_2O_2 spontan veya enzimatik olarak $O_2^{\cdot-}$ in dismutasyonunun katalizlenmesiyle bir elektronun otooksidasyonunun sonucunda sekonder ürün olarak oluşur. Buna örnek olarak ksantin oksidaz enziminin aktivitesi sonucu oluşan $O_2^{\cdot-}$ in dismutasyon reaksiyonu ile H_2O_2 ye dönüşümünü verebiliriz (16,17,22,23).

$$\text{Ksantin} + H_2O + 2O_2 \xrightarrow{XO} \text{Ürik asit} + 2O_2^{\cdot-} + 2H^+$$

$$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

SOD, $O_2^{\cdot-}$ i dismutasyon reaksiyonunu katalizleyerek yok etmektedir.

H_2O_2 radikal yapısında değildir. Ancak yüksüz bir molekül olduğundan süperoksit anyonunun aksine hücre içine kolayca girebilir. Bu nedenle de süperoksidin ulaşamadığı membranla korunan yapılara kolaylıkla ulaşabilir. Burada süperoksid ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir(16,17).

$$H_2O_2 + O_2^{\cdot-} \longrightarrow {}^{\cdot}OH + OH^- + O_2$$

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU

Bu reaksiyonun ismi Haber-Weiss reaksiyonudur. Bir başka yolla $O_2^{\cdot-}$ doğrudan Fe^{+3} ile reaksiyona girer. Oluşan Fe^{+2} ile de H_2O_2 etkileşerek ·OH molekülünü oluşturur. Bu reaksiyona da Fenton Reaksiyonu adı verilir ve geçiş metallerinin olmadığı katalizörsüz Haber-Weiss reaksiyonuna nazaran çok daha hızlı ilerler. Askorbat gibi redüktanlar da Fe^{+3} ü indirgeyebilir. Bunlar geçiş metallerinin varlığında peroksit kaynakları gibi davranarak $O_2^{\cdot-}$ olmasa da ·OH oluşturabilirler (15,16-18,21,22).

$$Fe^{+3} + O_2^{\cdot-} \longrightarrow Fe^{+2} + O_2$$

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{+3} + {}^{\cdot}OH + OH^-$$

1.4.1.3 Hidroksil Radikali

Tek atom halinde ve bir elektronu eksik olan oksijen partikülü bir H^+ ile birleşecek olursa, reaktivitesi çok güçlü olan ve hidroksil radikali (·OH) denilen bir molekül oluşur (6). İki tip oluşum reaksiyonu 1.4.1.2 de yer almaktadır.

Radikal oluşumunda bir başka yol da, dokuyu örnek olarak alırsak, gamma radyasyonuna maruz kalınması olabilir. Bu gibi durumda alınan enerjinin çoğu hücre suyu tarafından absorbe edilir. Çünkü diğer moleküllerle kıyaslandığı zaman su en fazla olanıdır. Bu radyasyon sudaki bir oksijen-hidrojen kovalent bağının ayrılmasına sebep olur. Sonuçta hidrojen üzerinde tek bir elektron kalır ve 2 radikal oluşur.

$$H\text{-}OH \longrightarrow H^{\cdot} + {}^{\cdot}OH$$

·OH kimyada bilinen en reaktif radikaldir. Amino asitler, nükleik asidler, organik asitler, fosfolipidler ve şekerler gibi biyokimyasal maddelerin bir çoğuyla reaksiyona girebilir. Yarılanma ömrü çok kısadır. Bir çok biyolojik molekülden H atomu çıkarılmasını sağlar. Örnek olarak tiyoller gösterilebilir.

$$R\text{-}SH + {}^{\cdot}OH \longrightarrow RS^{\cdot} + H_2O$$

Bunlar sülfür radikallerini oluşturmak için oksijenle kombine olabilirler. $RSO_2^{\cdot}$ ve $RSO^{\cdot}$ oluşur.

$$RS^{\cdot}+O_2 \longrightarrow RSO_2^{\cdot}$$

$RSO_2^{\cdot}$ ve $RSO^{\cdot}$ biyolojik molekülleri tahrip ederler. $^{\cdot}OH$ iyonu tarafından yapılan, en iyi karakterize edilmiş hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonunu stimüle etme kabiliyetine sahip olmasıdır (14,17,18,21).

1.4.1.4 Singlet Oksijen

Ortaklanmamış elektronu olmadığı için singlet oksijen radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi, serbest radikal reaksiyonunun başlamasına da sebeb olabilir. Oksijenin elektronlarından birinin enerji olarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle veya farklı orbitallerde farklı yönde döndüğünde singlet oksijen oluşmaktadır. Delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır (17,26).

1.4.2Geçiş Metal İyonları ve Serbest Radikal Reaksiyonları

Geçiş metallerinin pekçoğu değişik yükseltgenme basamaklarında bulunabilirler, Fe^{+2} ve Fe^{3+} , Cu^{2+} ve Cu^{+} gibi oksidasyon durumları sırasındaki değişim tek bir elektronun alınması ve verilmesi şeklindedir.

$$Fe^{+3}+e^{-} \longrightarrow Fe^{+2} \quad , \quad Cu^{+2}+e^{-} \longrightarrow Cu^{+}$$

Geçiş metal iyonları bu özelliklerinden dolayı serbest radikal reaksiyonlarını hızlandırır ve katalizör vazifesi görürler. Cu^{++} iyonlarının, tiyollerin oksidasyonunu başlattığı ispatlanmıştır.

$$R\text{-}SH+Cu^{+2} \longrightarrow R\text{-}S^{\cdot}+Cu^{+}+H^{+}$$

Ve Fe^{+2} iyonlarının $^{\cdot}OH$ vermek üzere H_2O_2 yi indirgeyebildikleri de ispatlanmıştır (Fenton reaksiyonu).

$$H_2O_2+Fe^{+2} \longrightarrow Fe^{+3}+{}^{\cdot}OH+OH^-$$

Metal iyonlarının serbest radikal reaksiyonlarındaki asıl önemleri ise lipid peroksidasyonlarındaki etkileridir. Aşağıda gösterildiği gibi geçiş metalleri lipid peroksidasyonunu başlatmaktan ziyade sentezlenmiş olan lipid hidroperoksitlerinin parçalanmalarını ve lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını katalize ederler. Böylece az zararlı olan radikalleri daha zararlı hale getirirler (14,17,18,22).

1.4.3 SERBEST RADİKALLERİN KAYNAKLARI

1.4.3.1 Serbest Radikallerin Biyolojik Kaynakları

Serbest radikal reaksiyonları geniş oranda biyolojik sistemlerin normal metabolizmaları sırasında ortaya çıkabildiği gibi, organizmaya yabancı bazı maddelerin (adriamisin, donorubisin, daksorubisin, gibi bir çok antrasiklik antineoplastik ajanlar ve kinoid gruplara bağlanan diğer antibiyotikler) metabolize edilmesi sırasında da ortaya çıkabilir. Bu ilaçların kemoteropatik etkileri ve sitotoksik yan etkileri bunların oksijeni, $O_2^{\cdot-}$, H_2O veya $^{\cdot}OH$ radikallerine indirgeme kabiliyetine bağlıdır.

Yine elektromagnetik radyasyonla (x ışını ve γ ışını) ve partikül radyasyonlar (elektron, proton, nötronlar, dötron ve α, β partikülleri) H_2O gibi selüler komponentlere enerjilerini transfer ederek primer radikalleri oluştururlar.

Bir başka serbest radikal üreten mekanizma ise aktifleşmiş fagositlerdir. Bunlar mikrobiyositlerdir ve geriye dönüşümsüz olarak doku hasarına sebeb olurlar. Ayrıca fotokimyasal olarak hava kirliliğine neden olan maddeler, hiperoksi, pestisidler, sigara

içimi, solventler, anestezik maddeler ve aromatik hidrokarbonlar gibi geniş miktardaki çevresel ajanlar da hücrede serbet radikal hasarı oluşturur (14,17,22).

1.4.3.2 Serbest Radikallerin İntrasellüler Kaynakları

A) Küçük Moleküllerin Otooksidasyonu

Oldukça değişken miktardaki çözünebilir hücre içi komponentler nötral sıvı ortamda oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarına katılırlar ve kantitatif olarak hücre içi serbest radikal üretiminde rol oynarlar. Bunlar tioller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler ve tetra hidropterinlerdir. Bu moleküller tarafından dioksijenin indirgenmesiyle ortaya çıkan primer radikal, süperoksid radikalidir. Ayrıca tioller, ascorbat ve diğer redüktanlar Fe^{+3} yı Fe^{+2} ye indirgemektedirler. Fe^{+2} süperoksid raidkali oluşturacak şekilde daha sonra otookside olabilir (17,22).

B) Çözünebilir Enzim ve Proteinler

Bir çok enzim katalitik siklusları sırasından serbest radikal oluştururlar. Ksantin oksidaz bu enzimler içinde en çok çalışılmış olanıdır. İlginç olarak insan ksantin oksidazı NAD^+ ye bağımlı dehidrojenaz olup in vivo şartlarda serbest radikal oluşturmaz. Saflaştırma sırasında veya in vivo olarak iskemi sırasında, ksantin oksidazın proteolitik modifikasyonu enzimi dehidrojenaz formundan $O_2^{\cdot-}$ üreten oksidaz formuna çevirir. Yapısal olarak ksantin oksidaza benzer aldehit oksidazda aynı substratların çoğunu katalizler ve $O_2^{\cdot-}$ oluşturur. Benzer şekilde dihidroororat dehidrojenaz, homoprotein dehidrojenaz, aminoasit oksidaz ve triptofan dioksijenaz gibi enzimlerde radikal oluşmasına sebeb olurlar (16,17,22).

C) Mitokondrial Elektron Transportu

Normal koşullarda mitokondri, sitokrom oksidaz sistemi ile oksijeni suya indirgeyerek detoksifiye etmektedir. Elektron transport zincirinde yer alan pek çok bileşik (NAD, FAD, koenzim Q gibi) oksijen ile tepkimeye girerek tek değerli oksijen kaçağı adı verilen $O_2^{\cdot-}$ salınımına neden olmaktadır. Normal koşullarda hücrenin savunma sistemleri ile yok edilen bu kaçağa neden olan faktörler bilinmemektedir. Ancak oksidan stress durumunda savunma sistemleri yetersiz kalmakta ve mitokondride hasar oluşmaktadır. Sitokrom oksidazın oksijeni suya indirgemesini sınırlayacak kadar düşük konsantrasyonlarda (1-3 mmHg) oksijen bulunduğu durumlarda, elektron transport zinciri komponentleri indirgenmiş formda kalırlar, hücre içinde de indirgenmiş kofaktörler artar ve bunlar üzerinden iskemik hücrelerde elektron transport komponentleri $O_2^{\cdot-}$ oluşumunu arttırırlar (22,26).

İskemi, hemorji, travma, enfeksiyonlar, radyoaktivite etkisi veya allerjik durumlarda mitokondrilerdeki oksidatif fosforillasyon dengesi etkilenir ve elektron taşıma sisteminden elektron kaçakları daha fazla olur ve oksidan moleküllerin düzeyi artar (20).

D) Endoplazmik Retikulum ve Nükleer Membran Elektron Transport Sistemi

Nükleer membranlar ve endoplazmik retikulum tarafından üretilen serbest radikaller, hem intraorganel hem de sitozolik reaksiyonlara katılabilirler. Nükleer membran kaynaklı serbest radikaller hücre çekirdeğinde başlıca DNA ile reaksiyona girmektedir.

Bu intrasellüler membranların her ikisi de sitokrom P_{450} ve sitokrom b_5 içerirler. Mikrozomal veya membran sitokromları bir elektron transferi ile direkt olarak $O_2^{\cdot-}$ veya peroksi sitokrom komplekslerinin dissosiyasyonuyla H_2O_2 oluşturabilirler. Bu karma fonksiyonlu oksidazlar unsature yağ asitlerini, ksenobiyotikleri oksidize

edebilirler ve diğer substratlarla oksijeni indirgerler. Sitokrom P_{450} ve sitokrom b_5 e bağımlı reaksiyonlar için e^- sağlayan flavoprotein içeren sitokrom redüktazlar da $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 oluşumu için otooksidasyon yeteneğine sahiptir (17,22,26).

E) Peroksizomlar

Peroksidazlar hücresel H_2O_2'in önemli kaynaklarıdırlar. Çünkü oksidazların konsantrasyonu yüksek olduğundan H_2O_2'in hazır prekürsörü olarak hiçbirinin $O_2^{\cdot-}$ ürettiği gösterilememiştir. H_2O_2 üreten bazı peroksizomal enzimleri sayacak olursak bunlar, D-aminoasit oksidaz, ürat oksidaz, L-hidroksil asit oksidaz ve yağ asidi açil-CoA oksidaz örnek olarak verilebilir. Peroksizomal katalaz, peroksizomal oksidazlarla yapılan H_2O_2 in normalde çoğunu metabolize eden enzimdir. Peroksizomal H_2O_2 nin salınan kısmı % 2 den % 12 ye kadar, substrat kullanımına bağlı olarak, değişmektedir (17,22).

F) Plazma Mebranları

Fagositik hücre plazma membranının NADPH oksidaza bağlı serbest radikal üretimi serbest radikallerin önemli bir biyolojik kaynağıdır. Fagositik hücrelerin uyarılması fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna ve plazma membranında araşidonik asidin salınımına yol açar. Araşidonik asidin enzimatik oksidasyonuyla da çeşitli serbest radikal ara ürünler meydana gelebilir. Mikrozomal ve plazma membranı tarafından radikal, üretiminin önemli enzimleri olan lipoksijenaz ve siklooksijenaz (araşidonik asid metabolizması) aktivitesi, serbest radikaller için önemli bir kaynaktır (17,22).

1.4.4 Serbest Radikallerin Canlı Organizmaya Etkileri

1.4.4.1 Proteinler

Oksijen türlerinin amino asitlerle reaksiyona girdiğine, böylelikle de protein yapı ve fonksiyonunu etkilediğine dair bir çok kanıt vardır. Oksijen radikalleri, oksidatif olarak proteinleri modifiye ederler ve bunların intrasellüler proteolitik sistemlerle yıkımına yol açarlar. Proteolitik enzimler oksidatif hasarın etkilerini minimum hale getirebilirler.

Serbest radikal hasarına proteinlerin duyarlılığı aminoasit kompozisyonlarına bağlıdır. Sülfür ihtiva eden moleküller ve doymamış moleküllerin reaktivitelerinden dolayı, sistein, metiyonin, histidin, fenilalanin, tirozin ve triptofan gibi amino asitleri çokça ihtiva eden proteinler, oksijen radikalleriyle oluşan aminoasid modifikasyonuna maruz kalırlar; çalışmalar göstermiştir ki reaktif oksijen türleri aminoasid rezidülerini okside ederek proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında değişikliğe sebep olurlar. Bu reaksiyonlar sonucu immunglobulin G ve albumin gibi fazla sayıda disülfür bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur. Ksantin oksidaz, askorbat+demir, fenil hidrazin ve nitrit, eritrositlerde ve retikulositlerde protein yıkımını arttırırlar.

Papain ve gliseraldehit-3-P dehidrogenaz gibi yukarıda bahsedilen amino asidlere bağımlı enzimler serbest radikal oluşturan ajanlara maruz bırakıldığında inhibe olurlar. Stoplazma ve membran proteinleri ozon ve protoporfirin IX gibi okside edici ajanlara maruz kaldıktan sonra çapraz bağlanarak dimerleşir veya daha büyük agregatlara dönüşürler. Prolin ve lizin superoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali üreten reaksiyonlara maruz kaldıktan sonra nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler. Proteinlerle serbest radikallerin reaksiyonu başka bir ürünü meydana getirebilir ve bu ürünse başlangıç reaksiyonunun zararını artırabilir. Örnek olarak, triptofanın oksidasyonu N-formil kinürenin ve H_2O_2 üretir. Oluşan N-

formil kinürenin protein veya lipidlerle amino ihtiva eden gruplar arasında Schiff baz reaksiyonu aracılığı ile çapraz bağlanmalara sebep olabilir. Oluşan H_2O_2 ise direkt olarak hücre komponertleri ile reaksiyona girebildiği gibi daha başka radikallerin oluşumuna da sebep olur (17,22,27-29).

1.4.4.2 Nükleik Asitler ve DNA

İyonize edici radyasyon serbest radikalleri meydana getirir. Bu radikaller ile hücredeki mutasyon ve ölümlerin nedeni DNA ile olan reaksiyonlarıdır. Sitotoksisite ya nükleik asid baz modifikasyonu veya DNA iplikcik bozulmasıyla meydana gelen kromozomal moleküllerin bir sonucudur. Fotokimyasal hava kirletici gibi çevresel kaynaklar, hiperoksit gibi serbest radikal üreten kaynaklar nedeniyle oluşan mutasyonlar ve hücre ölümü de DNA ile olan reaksiyonlara atfedilir. DNA ya oksidatif hasar normal metabolik durumlar altında da yüksek oranda devam eder ve tahmin edilmektedir ki her bir hücredeki DNA günde 10^4 kadar oksidatif etkiye maruz kalır. Bu da 20 den fazla DNA hasarına yol açabilir. Bu lezyonlardan bir çoğu mutojenik olarak bilinmektedir. DNA tamir enzimleri, eksonukleaz, endonukleaz ve spesifik glikozilaz bu lezyonları tamir edebilirler. Bununla birlikte eğer tamir sistemleri tam olarak çalışmıyorsa bu lezyonların zamanla birikimi çeşitli problemlere yol açabilir. Bundan dolayı oksidatif DNA hasarı ve mutasyonların yaşla ilerlemesi karsinogeneze ve dejeneratif hastalıklara sebep olabilir.

Seyreltik çözeltilerle yapılan çalışmalar ·OH'nın deoksiriboz ve baz türevleriyle reaksiyona girdiğini göstermiştir. H_2O_2 de membranlardan kolayca geçerek çekirdeğe ulaşır ve hasara yol açabilir (17,22,25).

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

1.4.4.3 Membran Lipidleri (Lipid peroksidasyonu)

Artmış oksidatif stresin önemli bir sonucu lipid peroksidasyonudur. Membran kolesterolünün ve yağ asidlerinin doymamış bağları serbest radikallerle direkt etkileşebilir ve peroksidasyona katılabilir. Memeli hücrelerinde, dokularda ve vücut sıvılarında lipid peroksidasyonunun yaşlanma, hastalık durumları veya toksinlerin alınımından sonra arttığı gösterilmiştir. Bu olaylar şu sıraya göre cereyan eder :

Peroksidasyonun başlama safhasında yağ asidi, H atomu üzerinde 1 e^- ve kendi üzerinde 1 e^- kalacak şekilde parçalanır ve bu parçalanmadan sonra lipid radikali oluşur. Bu lipid radikali ortamdaki mevcut O_2 ile hemen reaksiyona girer ve lipid peroksil radikali oluşur. Oluşan lipid peroksil radikali ortamdaki diğer poliansature yağ asidlerin yan zincirleriyle reaksiyona girebilir ve böylece zincirleme şekilde lipid radikali oluşumu ilerler. Lipid peroksil radikalleri membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asidlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine dönüşürler (Şekil 2).

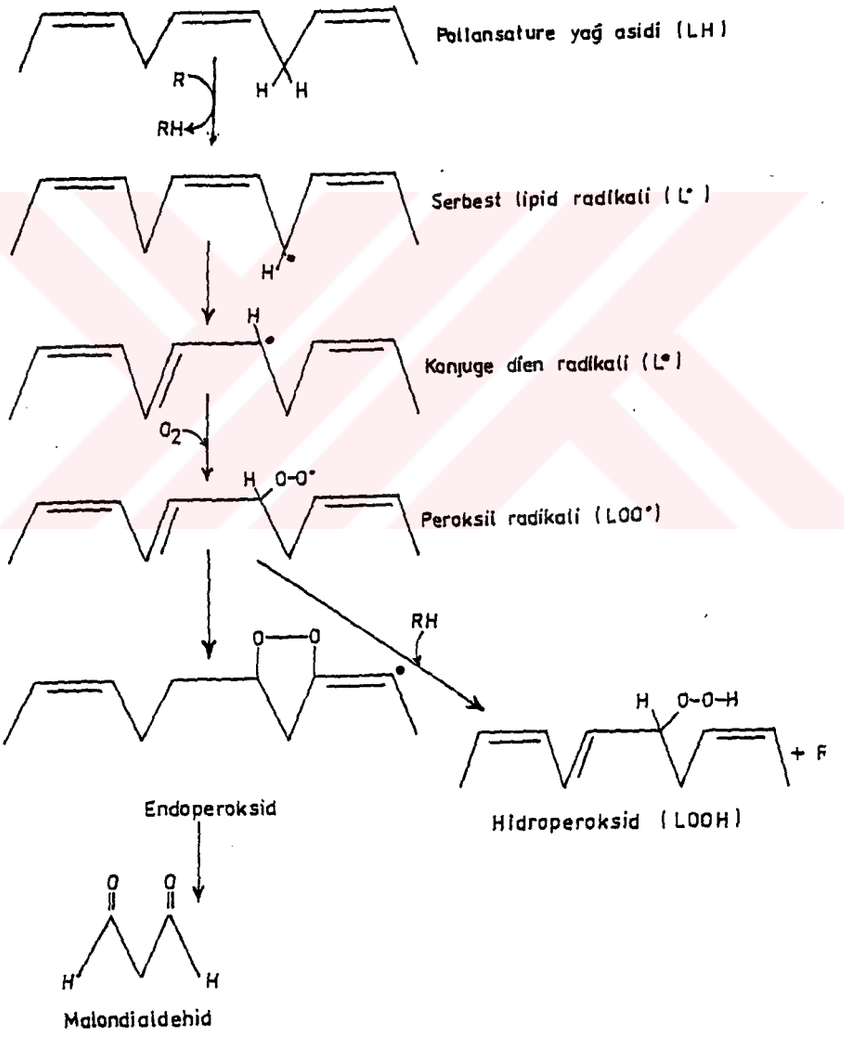
Hücre membranındaki unsature yağ asidlerinin kaybı, lipid peroksitlerinin oluşumu ve oksijenin lipid yapıları tarafından alınması şeklindeki reaksiyonların hepsi peroksidasyon olayı içinde bulunmaktadır (18,22,29-31).

Demir gibi geçiş metalleri, lipid peroksidasyonuna iki yolla katılırlar. Birincisi, H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$ nin reaksiyona girerek oluşturduğu $^{\cdot}OH$ radikaliyle ilk zincir başlangıç reaksiyonunu tetiklemesini katalize etmektir (Haber Weeiss reaksiyonu). Ascorbat ve çeşitli tioller gibi, $O_2^{\cdot-}$ dan farklı çeşitli Fe^{+3} indirgeyiciler de bu reaksiyonu ($^{\cdot}OH$ üretimi ve peroksidasyonun tetiklenmesi) başlatabilirler. Geçiş metal iyonları aynı zamanda lipid peroksidasyonunu etkileyebilirler. Peroksitleri içeren lipid sistemlerine

geçiş metal iyonları eklendiğinde en önemli etkileri peroksitleri peroksil ve alkoksile çevirmeleridir (14,32).

$$\text{Lipid-OOH} + Fe^{+2} \xrightarrow[(Cu^{+})]{} \underset{\text{alkoksil radikal}}{\text{Lipid-O}^{\cdot}} + Fe^{+3} + {}^{-}OH \quad (Cu^{+2})$$

$$\text{Lipid-OOH} + Fe^{+3} \longrightarrow \underset{\text{Peroksil radikal}}{\text{Lipid-OO}^{\cdot}} + Fe^{+2} + H^{+}$$



Şekil 2: Poliansatüre bir yağ asidinin peroksidasyonu

Lipid peroksidler daha sonra yıkılım ürünlerine dönüşebilirler. Bu yıkılım ürünlerinden en önemlileri malondialdehit ve 4 hidroksi nonenal'dir ki bunlar DNA ile reaksiyona girebilirler, mutajeniktirler, proteinlerle reaksiyona girip yapısal hasara yol açabilirler. Üç veya daha fazla çifte bağlı zincire sahip yağ asidlerinin peroksidasyonu malondialdehit (MDA) oluşturmaktadır. Bu oksidasyonun varlığı tio barbütürik asit (TBA) ile ölçülebilir. Ancak MDA spesifik ve kantitatif olarak yağ asidi oksidasyonunun göstergesi değildir. Lipid peroksidasyonunun büyüklüğüyle uyumlu olarak artar. MDA invivo olarak metabolize edilen bir üründür, aynı zamanda diğer hücre lipidleri ve proteinleri ile etkileşebilir. MDA membran komponentlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmasına sebep olmaktadır. Bu olay iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey reseptörlerinin yerleşimi gibi membrana ait özellikleri değiştirebilir. MDA difüze olabilir aynı zamanda DNA nın azotlu bazlarıyla etkileşebilir.

Lipofuksin denen yaşlılık pigmentleri peroksidasyon sırasında lipid ve proteinle MDA nın reaksiyonu sonucu oluşan çözünmeyen konjuge Schiff bazlarının lizozomal birikiminden kaynaklanır. Lipid peroksidasyonunun büyüklüğünün diğer bir ölçümü de etan ve pentan miktarlarının belirlenmesidir. Bu uçucu hidrokarbonlar hücresel hidroperoksit metabolizmasının metabolik ürünleridirler ve gaz kromatografisi ile saptanabilirler (18,22,33,34).

1.4.4.4 Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri:

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerinede önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Monosakkaridlerin otooksidasyonu sonucu H_2O_2, peroksitler ve oksoaldehitler meydana gelir. Bunlar diabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklar gibi patolojik proseslerde önemli rol oynarlar.

Oksoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturabilme özelliklerinden dolayı antimikotik etki gösterir. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar.

Karbonhidratların ve poliansatüre yağ asidlerinin oksidasyonunun bir ürünü olan glyoxal'in hücre bölünmesini inhibe ettiği kaydedilmiştir. Yine serbest radikallerin hiyalüronik asidi parçaladığı gösterilmiştir ve bunun etkilerine sinovyal sıvıda ve göz sıvısında rastlanmıştır (17,22).

1.4.5 Serbest Radikal Hasarına Karşı Savunma Sistemleri

Atmosferik oksijen konsantrasyonundaki evrime bağlı olarak artan atmosferik oksijen konsantrasyonu, aerobik enerji metabolizmasına bağlı organizmaların gelişmesini sağlamıştır. Bu aşamadan itibaren O_2 ihtiva eden atmosferde hem prokaryatik hem de eukaryotik hayat formlarının canlılığını sürdürebilmesi, organizmaları serbest radikal hasarından koruyacak biyokimyasal savunma sistemlerine bağlı kılmıştır. Bu kimyasal savunma sistemleri dört farklı mekanizma kullanarak etki etmektedir.

1) Temizleme (scavenging) etkisi : Oksidanları tutma ve zayıf bir moleküle dönüştürme şeklinde gerçekleştirilen bu etki, enzimler tarafından oluşturulmaktadır.
2) Baskılama (quencher) etkisi : Oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme vitaminler ve flavanoidler bu şekilde etki etmektedir.
3) Onarma etkisi
4) Zincir koparma etkisi: Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını önleyen ağır metaller hemoglobin, seruloplazmin E vitamini bu yolla etkili olmaktadır (22,26).

1.4.5.1. Enzim Olmayan Antioksidanlar

1.4.5.1.1 Yağda Çözünen Vitaminler

Bunlar α tokoferol (E vitamini) ve β karotendir. E vitamini ilk olarak Evans tarafından 1938 yılında bulunmuştur. Doğal olarak alfa, beta, gama, delta, eta ve zeta gibi çeşitli tipleri mevcuttur. Biyolojik ve kimyasal olarak vitamin E nin en aktif formu α-tokoferoldür. Lipidde çözünebilen bir bileşiktir, biyolojik membranlarda ve lipoproteinlerde bulunur. İnsanda lipidde çözünen antioksidanlar içinde en fazla bulunanıdır (17,25).

α tokoferol zincir kırıcı antioksidan olarak fonksiyon görmektedir. Bu vitaminin hidrofobik yapısına hidrojen atomunu kolaylıkla verebilen –OH grubu bağlıdır. Böylece lipid peroksidasyonu sırasında oluşan peroksil ve alkoksil radikalleri yağ asidi zinciri yerine tercih edilebilir şekilde antioksidanla birleşir. Örneğin



Bu reaksiyon zincir kırıcı antioksidan teriminin hangi nedenle söylendiğini göstermektedir. Bu aynı zamanda α-tokoferolü yeni bir radikal olan tokoferol-O.'e çevirmektedir. Bu radikalin komşu yağ asidi zincirleriyle birleşebilme reaktivitesi zayıftır, sonuçta zincir reakisyonunu durdurur. Aynı zamanda LDL'nin aterojerik modifikasyonunu önlemede önemli role sahip olabilir. Deliller göstermektedir ki tokoferol radikali membran yüzeyine göç edebilir ve burada askorbik asidle reaksiyona girerek tekrar tokoferole dönüşebilir.

Vit E.+Asc ⟶ VitE + DHAsc

Vitamin C ve α tokoferrolün her ikisi de lipoproteinler ve membranlarda lipid peroksidasyonunun sonuçlarını minimize ediyor gibi görünmektedir. Tokoferolun anti oksidan etkisi yüksek oksijen konsantrasyonlarında ortaya çıkar ve bundan dolayı

yüksek oksijen kısmi basınçlarına maruz kalan lipid yapılarında örneğin eritrosit membranının ve solunum sistemi membranlarında yoğunlaşma eğitimi hiç de şaşırtıcı değildir.

Dolaşımdaki düşük dansiteli lipoproteinlerin α–tokoferol kapasitesi lipid peroksidasyonuna rezistanslarını saptamaya yardımcı olmaktadır ve bu lipid peroksidasyonuyla ilgili olan aterosklerozun oluşumunu etkileyebilmektedir. α tokoferol ve vitamin C nin düşük plazma düzeyleri miyokard infaktüsü ve bazı kanser türlerinin artmış insidansı ile uyumludur (7,14,17,18,31,35-37).

α–tokoferol gibi β karoten de lipidde çözünen bir maddedir. Vitamin A'nın prekürsörüdür. Fakat bunun yanında başka fonksiyonları da vardır. β karoten singlet oksijenin baskılanmasında çok etkindir. Ayrıca lipid peroksidasyonunun inhibisyonunda rol oynar. Enteresan olarak β karoten düşük oksijen basınçlarında etkin radikal yakalayıcı antioksidan özellik gösterir. α-tokoferolle karşılaştırıldığı zaman oldukca zayıf bir antioksidandır. İnsan LDL sinde β karoten α-tokoferolün 1/20 si oranında bulunur. α tokoferol bittikten sonra kullanılır (25).

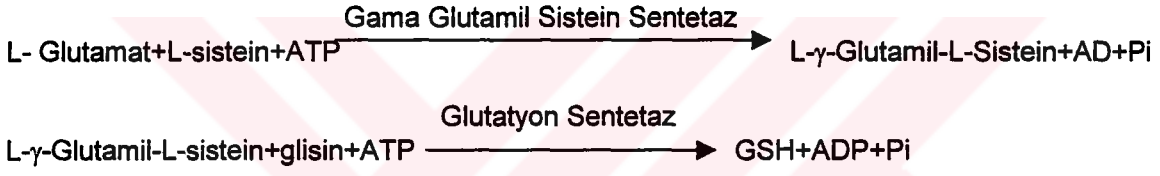
1.4.5.1.2 Sıvı Fazda (hücre sitoplazması ve kan plazmasında) Bulunanlar

Glutatyon intrasellüler sülfhidril grubuna sahip önemli bir nonproteindir. Süfhidril grubu sayesinde nükleofilik tioeter oluşumuna veya oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarına sebep olmaktadır.

Glutatyon hücre içerisinde primer olarak indirgen formda bulunur (GSH). Endojen olarak üretilen peroksitlere karşı koruma amacıyla GSH okside olur. Bu reaksiyon glutatyon peroksidaz tarafından katalizlenir. Daha sonra oluşan okside glutatyonun (GSSG) indirgenmesi gerekir. Bu redüksiyon reaksiyonu heksoz monofosfat yoluyla bağlantılı olur, çünkü NADPH'a ihtiyaç vardır. Glutatyon

redüktazın katalizlediği bu reaksiyonda, NADPH'da kullanılarak yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) indirgenmiş forma dönüştürülür (GSH). Böylece GSH/GSSG yüksek oranı korunmuş olur ki bu da etkin hücre korunması için önemlidir.

Glutatyonun eritrosit içerisindeki konsantrasyonunun rölatif olarak sabit kalmasına karşın glutatyon dinamik bir dengededir. İnsanda glutatyonun yarılanma ömrü yaklaşık 4 gündür, eritrositin ömrü ise yaklaşık 120 gündür. GSH'ın sentezi ATP'ye ihtiyaç duyan birbirini izleyen iki basamakta meydana gelir. Bu iki basamak iki ayrı enzim tarafından katalize edilir. Bu enzimler gama glutamil sistein sentetaz ve glutatyon sentetazdır.



Glutatyon eritrositlerin dışına okside (GSSG) formda taşınır. GSSG'nın aktif transportu ilk defa Srivastava ve Beutler tarafından tanımlanmıştır. Ayrıca insan eritrositlerinde γ-glutamil transpeptidaz olmadığı bulunmuştur. Glutatyonun hücre içi turnoverinden sorumlu bir başka mekanizma GSSG nın hücre dışına aktif transportudur. Bu aynı zamanda hücre içi GSSG konsantrasyonunun düşük GSH konsantrasyonunun yüksek oluşumu sağlanaktadır. Normal şartlar altında glutatyonun çoğu redükte haldedir (0,5 ila 10 mM arası). GSSG nun intrasellüler konsantrasyonu ise 5 ile 50 μM düzeylerindedir (22,39,40,41,42,43).

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

C Vitamini

Askorbik asid moleküler oksijen, nitrat, sitokrom a ve sitokrom c gibi bileşiklerin indirgenmesini mümkün kılan +0,084'lük hidrojen potansiyeline sahip indirgeyici bir ajandır. Suda eriyebilir vitaminlerden olan askorbik asid bir çok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak rol oynar. Bunun yanında kollajen sentezinde, trozin yıkılımında, epinefrinin tirozinden sentezinde ve safra asidi oluşumunda rolü vardır.

Vitamin C geniş bir antioksidan aktiviteye sahiptir. Bu da reaktif oksijen türleriyle ve sulu ortamdaki serbest radikallerle reaksiyona girebilme kabiliyetinden kaynaklanmaktadır. Vitamin C insan plazmasında oksidan maddelere karşı maruziyette ilk antioksidan defansı oluşturur.

Askorbik asid semidehidroaskorbat ara ürünü üzerinden kolaylıkla dehidroaskorbik aside okside olur. C vitamini $O_2^{\cdot-}$ ve OH radikalleriyle reaksiyona girip temizlemesi yanında bir anti oksidan olan α-tokoferole yükseltgenmiş hali olan tokoferoksil radikalinin tekrar α tokoferolü redüksiyonunu sağlar. Vitamin C yetersiz düzeyde olursa oluşan tokoferoksil radikali GSH ile reaksiyona girerek düzeyini azaltacaktır. Hücrede GSH düzeyinin korumasının ne kadar önemli olduğu düşünülürse, bu anti oksidan savunma ile ilgili ciddi sonuçlara yol açabilecektir. Ayrıca Vitamin C LDL kolesterolu oksidasyona karşı etkin olarak koruyabilir. Böylece ateroskleroz gelişimini yavaşlatabilir.

C vitaminin bir özelliğide antioksidan etki yanında oksidan etki göstermesidir. Çünki C vitatimi ferri demiri (Fe^{+3}) ferro demire (Fe^{+2}) indirgeyen superoksid radikali dışındaki bir ajandır. Bu yolla ferri demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye uygun olan ferro demire dönüştürür. Yani süperoksit

üretimine katkıda bulunur. Ancak bu tip etkisi düşük konsantrasyonlarda (0,2 mM den az) görülür (7,17,20,22,25).

Melatonin en zararlı radikal olan $^{\cdot}OH^{-}$ radikalini ortadan kaldıran çok güclü bir antioksidandır. Hidroksil radikali ile reaksiyonu sonucu indolil katyon radikali oluşur ki bu da ortamdaki superoksid radikalini tutarak antioksidan aktivite gösterir.

Serbest radikaller oluşturarak kansere yol açan safrol'un DNA üzerindeki hasarı melatonin tarafından çok etkili şekilde inhibe edilir.

Melatoninin bir başka önemli özelliğide lipofilik oluşudur. Dolayısı ile hücrenin hemen her organeline ulaşabildiği gibi kan-beyin bariyerinide geçer. Böylece çok geniş bir alanda anti oksidan aktivite gösterir (17).

Bunun yanında ürat, sistein, albumin, bilurübin, seruloplazmin transferrin, laktoferrin, ferritin, selenyum, ekselende antioksidan özellikleri olan maddelerdir (17,21).

1.4.2.1 Enzim Olan Anti Oksidanlar

1.4.5.2.1 Superoksid dismutaz (SOD. EC 1.15.1.1):

Biyokimyacılar ancak 1970'lerde radikallerle ilgilenir hale gelmişlerdir. Bu ilgi superoksit radikalini substrat olarak kullanan bir enzim olan superoksit dismutazın 1968'de McCordve Fridovich tarafından bulunmasıyla başlamıştır. Üç tür SOD mevcuttur. Birincisi mitokondri matriksine lokalize olan tetramerik Mn SOD 21.500 Daltonluk 4 alt üniteden meydana gelen tipdir. Bu fare karaciğeri mitokondrisinde bulunmuştur. İnsan karaciğeri ise Mn SOD'ı fare karaciğerine göre 20 kat daha fazla konsantrasyonda bulundurmaktadır. İkinci tip ise 32.000 Daltonluk 2 alt üniteden oluşan Cu-Zn SOD'dir. Bu tür SOD ise sitozolde lokalizedir. Yine 134.000 Daltonluk

Cu ihtiva eden ve sirkulasyondaki superoksit radikallerini metabolize eden vasküler endotelyuma bağlı 3. bir tür de rapor edilmiştir.

SOD' ler metalloproteinler olup bir dismutasyon reaksiyonunu katalizleyerek 2 adet superoksit radikalini uzaklaştırır. Bunu bir superoksit molekülünü O_2 molekülüne yükseltgeyip, diğer superoksit molekülünü H_2O_2 e indirgeyerek yapar.

$$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Bilindiği gibi bu dismutasyon reaksiyonu superoksit radikalinin anyon ve katyon formlarının eşit oranda bulunduğu pH 4,8 de en hızlı olacak şekilde spontan olarak da cereyan etmektedir. Ancak fizyolojik şartlarda pH'nın 7,35-7,45 arasında korunduğunu düşündüğümüzde bu spontan dismutasyon reaksiyonu çok daha yavaş oluşacaktır. SOD enzimi varlığında pH en az 7,4 olduğu koşullarda bu reaksiyon 4 kat daha hızlı oluşacaktır.

SOD, katalaz ve GSH-Px enzimleriyle beraber çalışmaktadır. Çünkü SOD tarafından üretilen H_2O_2 katalaz ve GSH-Px tarafından metabolize edilir. Kinetik şartlar düşünüldüğünde bu metabolizma işleminin GSH-Px tarafından yapılacağı düşünülür. Çünkü H_2O_2 için katalazdan daha düşük bir Km değerine sahiptir. Katalaz H_2O_2'ye karşı yüksek konsantrasyonlarda yüksek bir aktiviteye sahiptir. Böylece hücrelerde GSH peroksidaz tarafından GSH ın harcanıp GSSG nın yığılması önlenmiş olur.

Son zamanlarda gen mühendislerinin yaptığı çalışmalardan SOD enzimini kodlayan genler yok edilerek bu enzimin önemini belirten önemli deliller elde edilmiştir. Şurası ilginç olarak not edilmekdir ki insanlarda SOD ın doğuştan tam eksikliği tespit edilmemiştir. Muhtemelen bunun nedeni bu tip mutasyonun fatal olmasından kaynaklanmaktadır (14,17,18,22,44-48).

1.4.5.2.2 Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6)

İlk olarak hayvan dokularında H_2O_2'in parcalanarak açığa oksijen çıktığını 1818 yılında Thenard tarafından bulundu. 1901 de Loew bunun spesifik bir enzim tarafından katalizlendiğini gösterdi. 1937 yılında Sumer ve Dounce tarafından kristalize halde saflaştırıldı. Her biri prostetik grub olarak yapısında Fe (III) bulunduran 4 hem grubundan oluşmuş bir hemoproteindir. Peroksizomlarda lokalizedir. Ekstrasellüler olarak çok düşük miktarlarda (eser) bulunur.

Katalazın görevi H_2O_2'i oksijen ve suya parçalamaktır. SOD ile katalaz beraber çalışır; birinin yaptığı H_2O_2'i değeri parçalar. Bu parçalama işini katalaz peroksidazlarla beraber yapar. Glutatyon peroksidazın H_2O_2'ye karşı Km'i daha düşüktür. Katalaz H_2O_2 konsantrasyonu yükseldiğinde aktivite kazanır ve hızla H_2O_2 parçalayarak hücrenin GSH sarfiyatını önler.

H_2O_2'in düşük konsantrasyonlarında katalazın etanol veya fenoller gibi elektron vericilerini oksitlediği bilinmektedir. Buna göre katalazın katalitik ve peroksidatik olmak üzere iki fonksiyonu vardır. Katalaz aktivitesi eritrosit, karaciğer ve böbrekte yoğun olarak mevcuttur (43,48-50).

1.4.5.2.3 Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px, EC 1.11.1.9)

Glutatyon peroksidaz molekül ağırlığı 84.000 Dalton olan, tetramerik yapıda, dört alt biriminin her birinde selenosistein yapısı içeren bir enzimdir. H_2O_2 ve lipid hidroperoksitlerinin yıkılımını katalizleyerek membran lipidlerini ve hemoglobinin oksidan strese karşı koruyan glutatyon peroksidaz bu etkisini redükte glutatyonu (GSH) yükseltgeyerek gerçekleştirir.

$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GSH\text{-}Px} GSSG + 2H_2O$$

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DÖKÜMANTASYON MERKEZİ

$$ROOH+2GSH \xrightarrow{GSH\text{-}Px} GSSG+ROH+H_2O$$

Fosfolipid hidroperoksid glutatyon peroksidazda (PLGSH-Px) molekül ağırlığı 20.000 Dalton olan monomerik, selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Membran fosfolipid hidroperoksidlerini, alkollere indirger.

$$PLOOH+2GSH \xrightarrow{PLGSH\text{-}Px} GSSG+PLOH+H_2O$$

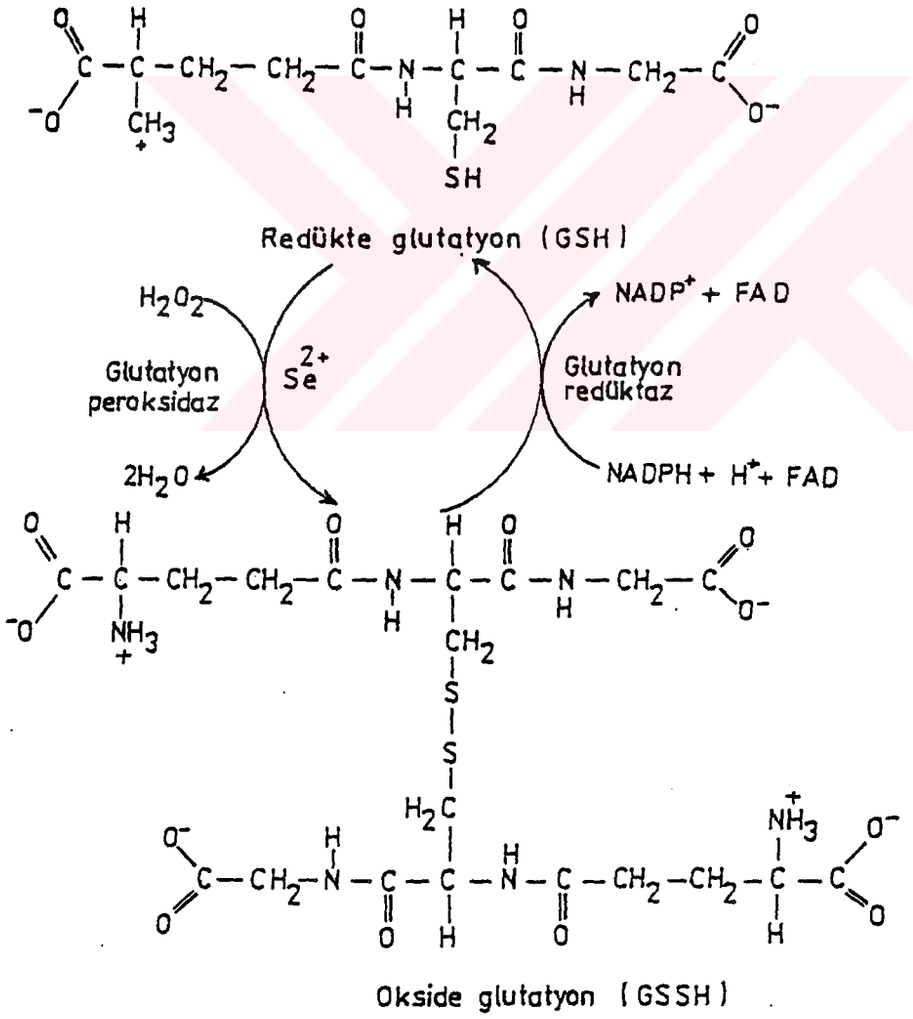
Membrana bağlı en önemli antioksidan olan Vit E yetersiz olduğu zaman PLGSH-Px membranının peroksidasyona karşı korunmasını sağlar. Eritrositlerde GSH-Px oksidan strese karşı en kuvvetli antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma H_2O_2 artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar. GSH-Px yetersizliği selenyum eksikliği sonucu olabilir. Çünki selenyum bu enzimin bir integral parçasıdır.

GSHPx ve SOD tamamlayıcı komponetler olarak düşünülmelidir. Çünkü birisi tarafından üretilen H_2O_2 diğeri tarafından zararsız hale getirilmektedir. Sonuçta $O_2^{\cdot-}$ ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Bu radikal ($O_2^{\cdot-}$) optimal hücre fonksiyonları yönünden tolere edilebilen bir madde değildir. GSH-Px H_2O_2'in düşük konsantrasyonlarında da etkilidir. Çünkü H_2O_2 için Km'si katalaza nazaran küçüktür (14,17,22,36,39,40-42,46,48).

1.4.5.2.4 Glutatyon Redüktaz (GR. EC 1.6.4.2)

Glutatyon redüktaz 50.000 Daltonluk subunitlere sahip bir dimerdir. Görevi yükseltgenmiş glutatyonu (GSSG) indirgenmiş (GSH) hale çevirmektir. Bu indirgenme işlemi sırasında NADPH dan gelen elektronlar okside glutatyonun disulfid bağına direkt olarak transfer edilmezler. Sıklıkla önce NADPH'dan sıkıca bağlı bulunan FAD'ye transfer edilirler. Daha sonra subinitteki 2 sistein arasında bulunan

disülfid köprüsüne transfer edilmek suretiyle okside glutatyona aktarılmış olurlar. Her bir subunit 3 tane yapısal alan içerir, bunlar: FAD bağlayıcı alan, NADPH bağlayıcı alan ve ara yüz alanıdır. FAD alanı ve NADP+ alanı birbirine benzer ve diğer dehidrojenazlardaki nukleotid bağlayıcı alanlara benzerler. FAD ve NADP+ nin izoalloksozin ve nikotinamid halkaları birbirlerine geçecek şekilde geniş ölçüde aralarında bağlanırlar. Oksidize glutatyon için bağlayıcı alanın bir subunitin FAD alanı ile diğer subunitin ara yüz alanından meydana geldiğini belirtmek gerekir (51) (Şekil 3).



Şekil 3: Glutatyon redoks siklusu

2- MATERYAL VE METOD

Yaptığımız çalışmada Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Araştırma Hastanesine müracaat eden, klinik ve biyokimyasal açıdan yapılan tetkikler sonucu WHO kriterlerine göre Tip II diabet (IDDM) olduğu tespit edilen 53 hastadan alınan kan numunelerini ve kontrol grubu olarak WHO kriterlerine göre nondiabetik sağlıklı 30 kişiden alınan kan numunelerini çalışmalarımızda kullandık.

Tip II diabetik hastalarda ve kontrol grubunda; eritrosit GR (FAD'li ve FAD'siz sistemde), GSH-Px, CAT, SOD aktiviteleri, MDA, glikozile hemoglobin (GHb) ve serum açlık kan glukozu konsantrasyonları tayin edilerek sonuçların istatistiki analizleri yapıldı.

2.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

2.1.1 Kullanılan Cihazlar

Çalışmamızda kullanılan cihazlar ve temin edildikleri yerler aşağıda verilmiştir.

Spektrofotometre: Shimadzu UV-120-01 Seri no: A 103 Shimadzu Coorporation- JAPAN

Spektrofotometre: Shimadzu UV-1208 Seri no: A1012 Shimadzu Coorporation- JAPAN

Su Banyosu: Nüve BM 101 Type: BT400 Nüve San. Malz. Lm ve Tic AS. ANKARA

Çalkalayıcılı Su Banyosu: Warner-Chilcott Laboratories intruments dıvision Model No. 0215601 USA

Distile Su Cihazı: Easypure RF compact ultrapure water system, Bornsted/thermolyne model no: 70 33 Dubuque, USA

Hassas Terazi: Sartorius AG Gottingen Tip No.BA 3105, Germany

Karıştırıcı: Vortex-Genie, Model KS50-GE Massachusetts, USA

pH metre: Jenway 3010 pH Meter, UK

Derin Dondurucu: Sanyo MDF-U70U-86°C Freezer, Japan

Derin dondurucu: Kottermann-KG Tip No: 2542, Germany

Santrifuj: Heraeus instruments Latige 400 R, Germany

2.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Etilendiamintetraasetikasit-di sodyum tuzu, Na_2 EDTA (MERCK)
- β-Merkoptaetanol, CH_3CH_2 SH (Merk)
- Flavin adenin dinükleotid (FAD), $C_{27}H_{31}O_{15}NaP_2Na_2$ (Sigma)
- Glutatyon okside form (GSSG), $C_{20}H_{32}N_6O_{13}S_2$ (Sigma)
- Nitroblue tetrazolium, $C_{40}H_{30}C_{l2}N_{10}O_6$(Sigma)
- Ksantin oksidaz, (XO, EC 1,1,3,22) (Sigma)
- Glutatyon redüktaz, (GR, EC 1,6,4,2) (Sigma)
- Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) Redükte form,
- $C_{21}H_{26}N_7O_{17}P_3Na_4$ (Sigma)
- t-Butil hidroperoksid, $(CH_3)_3COOH$ (Merk)
- Tris, hidroxymethyl-aminomethan, $C_4M_{11}NO_3$ (Merk)
- Hidroklorik asid, HCl (Merk)
- Trikloro asetik asid (TCA), CCl_3COOH (Merk)
- Sodyum hidroksit, NaOH (Merk)
- 1,1,3,3-tetra etoksi propan (Tep), (Sigma)
- Tiyobarbutirik asid (TBA), $C_4MH_4O_2N_2S$ (Merk)
- Ksantin, $C_5H_4NaO_2$ (Sigma)

- Sodyum karbonat Na_2CO_3 (Merk)

- Sığır albumüni (Sigma)

- Potasyum fosfat monobazik, KH_2PO_4 (Fisher)

- Potasyum fosfat dibazik, K_2HPO_4(Fisher)

- Hidrojen Peroksit, % 30, H_2O_2 (Merk)

2.2. Yapılan Analizler:

2.2.1 Glutatyon Redüktaz Tayini (GR. EC 1.6.4.2)

2.2.1.1 Prensip:

Glutatyon redüktaz NADPH yardımıyla okside glutatyonun (GSSG) redükte glutatyona (GSH) redüksüyonunu katalizler.

$$NADPH+H^+ + GSSG \xrightarrow{GR} NADP^+ + 2GSH$$

Glutatyon redüktaz aktivitesi; okside olan NADPH'ın spektrofotometrik olarak 340 nm'deki absorbans değeri değişiminin ölçülmesi esasına dayanır. Her bir mol GSSG redüksiyonu için bir mol NADPH harcanır. GR aktivitesi; gr Hb başına internasyonal enzim ünitesi, 1 dakikada 1 μmol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarı olarak hesaplanır. Dolayısıyla glutatyon redüktaz aktivitesi 25°C de 1 μmol okside NADPH/dakika/gr Hemoglobin olarak belirlenir.

2.2.1.2 Kullanılan Çözeltiler

Tris-HCl, 1M; EDTA, 5mM, pH 8.0

Flavin adenin dinukleotid (FAD); 10 μM

Okside glutatyon (GSSG); 0,033 M

NADPH; 2 mM

Serum fizyolojik; 0,15 M NaCl

β-Merkaptaetanol

EDTA Na_2;0,27 M

2.2.1.3 Numunelerin alınması

5 ml açlık kanı 0,5 ml EDTA çözeltisi bulunan tüplere alındı. Numunelerin bekletilmeden plazması ayrıldı, bunun için tüpler + 4°C de 10 dakika 2500g'de santrifüj edildi. Daha sonra buzda soğutulmuş serum fizyolojik ile (0,15 M NaCl) üç kez yıkandı. Bunun için plazması ayrılmış kana buzda soğutulmuş 10 ml 0,15 M NaCl konup 2500 g de 15 dakika santrifüj edildi. Supernatant atıldı. Daha sonra numunenin üzerine buzda soğutulmuş 10 ml 0,15 M NaCl konup 10 dakika 2500g de santrifüj edildi, supernatant atıldı. Üçüncü kez yine numune üzerine buzda soğutulmuş 10 ml 0,15 M NaCl konarak 2500g'de 5 dakika santrifüj edilip supernatantı atıldı. Elde edilen eritrosit paketinden 0,2 ml alınıp numune tüpüne kondu. Üzerine 1,8 ml β Merkaptoetanol-EDTA çözeltisinden ilave edildi (50 μl, β-merkaptoetenol ile 10 ml nötral (0,27 M) EDTA 1 L distile suyla tamamlandı). Hazırlanan hemolizat hemen dondurulup, ardından oda ısısında su içeren kaplarda çözdürüldü. Tüpler –80 °C'de derin dondurucuya konuldu ve çalışılacağı güne kadar burada saklandı.

2.2.1.4 Deneyin Yapılışı

Derin dondurucu da saklanan hemolizatlardan, kör ve numune tüpleri Beutler ve Glatzle metoduyla (12) aşağıdaki deney şemasına göre (Tablo 2.2.1) hazırlanıp glutatyon redüktaz tayini yapıldı.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Tablo 2.2.1 Glutatyon Redüktaz Tayini Deney Şeması

	FAD'siz sistem		FAD'li sistem	
	GR Kör tüpü GRk	GR Numune Tüpü GRk	GR Kör tüpü GRk	GR Numune Tüpü GRn
Tris HCl, 1 M, EDTA, 5 Mm PH 8	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Hemolizat (1: 20)	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Distile su	890 µl	790 µl	790 µl	690 µl
FAD, 10 mM	-	-	100 µl	100 µl
37°C 10 dakika inkübasyon				
GSSG 0,033 M	-	100 µl	-	100 µl
37°C 10 dakika inkübasyon				
NADPH, 2 mM	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

Deney tüplerine NADPH ilave edildikten sonra, glutatyon redüktazın aktivitesi NADPH ın oksidasyonunu takiben spektrofotometrik olarak 340 nm'de optik dansitedeki azalma FAD'siz sistemde FAD'siz köre karşı ölçülür. FAD'li sistemde ise aynı şekilde FAD'li köre karşı ölçüldü.

2.2.1.5 Sonuçların Hesaplanması

$$\text{Enzim aktivitesi (mU/ml)} = \frac{1000 \times V}{t \times \varepsilon \times d \times v} \cdot \Delta A$$

Bu formülde:

V: Deney çözeltisinin toplam hacmi (ml)

v: Deneyde numune olarak kullanılan hemolizatın hacmi (0,01 ml)

d: Işık yolu, optik yol uzunluğu (1 cm)

ε: NADPH'ın 340 nm deki molar absorbsiyon sabitesi 6,22 $cm^2/mmol$

t: Reaksiyon süresi, dakika (5 dakika)

ΔA: Optik dansite değişimi : ($\Delta A_{Numune} - \Delta A_{Kör}$)

$\Delta A\ [A_{GRN2}-A_{GRN1}]-[A_{ZGRK2}-A_{1GRK1}]$

Yukarıdaki formülden 5 dakikadaki optik dansite değişimi bulunarak mU/ml cinsinden enzim aktivitesi hesaplandı. Enzim aktivitesi sonra, her numune için hemoglobinin gramı başına düşen enzim ünitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Enzim aktivitesi (U/grHb)} = \frac{100\ A}{C_{Hb}}$$

A: Her ml hemolizattaki enzimin ünite olarak aktivitesi

C_{Hb}: Her 100 ml hemolizattaki gram olarak hemoglobinin konsantrasyonu

2.2.2 Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px, EC 1.11.1.9)

2.2.2.1 Prensip

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG) oksidasyonunu hidrojen peroksid kullanarak katalizler.

$$2GSH + R\text{-}O\text{-}OH \xrightarrow{GSH\text{-}Px} GSSG + H_2O + ROH$$

GSSG nin oluşum hızı GR reaksiyonu vasıtasıyla ölçülür.

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2GSH + NADP^+$$

Reaksiyon ortamındaki t-butilhidroperoksidin (Bu enzim ölçümlerinde en uygun peroksid substratıdır) herbir molekülünün redüksiyonu için 1 mol GSSG oluşur. GSSG nın GSH a redüksiyonu ise GR enziminin katalizlediği reaksiyonla oluşur. Bu reaksiyonda GSSG nin her bir molunun redüksiyonu için 1 mol NADPH okside olur.

GSH-Px aktivitesi de NADPH oksidasyonunu takiben spektrofotometrik olarak 340 nm deki sistemin optik dansitesindeki düşüşten hesaplanır.

2.2.2.2 Kullanılan Çözeltiler:

Tris-HCl, 1 M, EDTA, 5 mM, pH=8,0

GSH; 0,1 M

Glutatyon redüktaz (GR), 10 U/ml

NADPH, 2 mM

t- Butil hidroperoksid, 7 mM

β-Merkaptoetanol

EDTA, 0,27 M

NaCl, 0,15 M

2.2.2.3 Numunelerin Alınması:

Numuneler, glutatyon redüktaz tayinindeki gibi (2.3.1.2) alınmıştır.

2.2.2.4 Deneyin Yapılışı:

Deney gününe kadar derin dondurucuda –80°C de saklanan eritrosit paketlerinden hazırlanan hemolizatlar kullanılarak Kokatnur metoduyla (68) aşağıdaki deney şemasına göre (Tablo 2.2.2) hazırlanıp glutatyon peroksidaz tayini yapıldı.

Tablo 2.2.2: Glutatyon Peroksidaz Deney Şeması

	GSH-Px Kör tüpü (GSH-Px)	GSH-Px Numune Körü (GSH-Px N)
Tris HCl, 1 M, EDTA, 5 Mm PH 8,0	100 µl	100 µl
GSH, 0,1 M	20 µl	20 µl
Glutatyon redüktaz 10 U/ml	100 µl	100 µl
NADPH 2 mM	100 µl	100 µl
Hemolizat (1: 20)	10 µl	10 µl
Distile su	670 µl	660 µl
37°C 10 dakika inkübasyon		
t-Butil hidroperoksid, 7 mM	-	10 µl

2.2.2.5 Sonuçların hesaplanması:

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesinin U/gr Hb olarak hesaplanması glutatyon redüktaz (2.2.1.5) gibi yapılmıştır.

2.2.3 Superoksit Dismutaz (SOD, EC 1,15,1,1) Tayini

2.2.3.1 Prensip:

Enzimatik reaksiyon sonucu üretilen serbest radikallerin reakisyon ortamında bulunan nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgemesinin numunede bulunan SOD enzimi tarafından engellenmesi prensibine dayanır. Süperoksit radikali üretimi ksantin oksidaz enzimatik reaksiyonu ile sağlanır. Üretilen superoksit radikalleri, NBT ile reaksiyona girerek 560 nm'de absorbans veren formazon oluşturur. Reaksiyon ortamına ilave edilen numunede bulunan SOD, üretilen radikalleri dismutasyona uğratır ve bundan dolayı NBT redüksiyon reaksiyonu yavaşlar ve sonuçta spektrofotometrede okunan absorbans değerleri düşer.

2.2.3.2 Kullanılan çözeltiler:

- Ksantin stok çözeltisi, 3 mmol/L
- EDTA , 0,6 mmol/L
- NBT, 150 μmol/L
- Na_2CO_3, 400 mmol/L
- Sığır albumini, 1 gr/L
- Ksantin oksidaz, 0,166 Ü/ml

2.2.3.3 Numunelerin Alınması:

5 ml açlık kanı 0,5 EDTA bulunan tüplere alındı. 2500 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Üsteki plazma ve lökosit tabakası atıldıktan sonra kalan eritrosit tabakası soğuk serum fizyolojik ile üç kez yıkanarak santrifüj edildi. Son yıkama ve santrifüj sonrası dipte kalan eritrositlerden 0,4 ml alınıp üzerine aynı miktarda serum fizyolojik eklenerek analiz zamanına kadar derin dondurucuda -80°C saklandı.

Reaktif Karışımı: 20 tüplük analiz için, 20 ml 10 kez seyreltilmiş ksantin stok çözeltisi, 10 ml EDTA çözeltisi, 10 ml NBT çözeltisi, 6 ml Na_2CO_3 çözeltisi ve 3 ml sığır albümüni çözeltisi karıştırıldı.

2.2.3.4 Deneyin Yapılışı:

Eritrositler analiz öncesi üzerlerine 3,2 ml buz soğukluğunda distile su ilave edilerek hemoliz edildi. 1 ml hemolizat üzerine 0,8 ml kloroform/etanol karışımı (3/5 [v/v]) ilave edilerek, 2500 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Analizde üste kalan berrak kısım kullanıldı.

Sun ve arkadaşlarının metodu (69) kullanılarak aşağıdaki deney şemasına (Tablo 2.2.3) göre kör ve numune tüpleri hazırlanarak SOD tayini yapıldı.

Tablo 2.2.3 Süperoksid Dismutaz Deney Şeması

	SOD Kör tüpü	SOD Numune Tüpü
Reaktif Karışımı	2,45 ml	2,45 ml
Numune	0,50 ml	-
Distile su	-	0,50 ml
Ksantin Oksidaz(-)	50 µl	50 µl
20°C 25 dakika inkübasyon		

2.3.3.5 Sonuçların Hesaplanması:

Aşağıda verilen eşitlikten yararlanarak numunede bulunan enzimin meydana getirdiği % inhibisyon hesaplanır.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{\text{Körün absorbansı-Numunenin absorbansı}}{\text{Körün absorbansı}} \times 100$$

Bir SOD ünitesi, NBT redüksiyonunu % 50 oranında inhibe eden aktivite olarak kabul edilmektedir. Reaksiyon ortamına konulan numunede bulunan hemoglobin miktarı önceden bilindiğinden, hemoglobinin gram miktarı başına düşen aktivite oranı, spesifik aktivite olarak verildi.

2.2.4. Katalaz (CAT. EC 1.11.1.6) Tayini:

2.2.4.1 Prensip:

Uygun tampon içinde bulunan H_2O_2 ın numunede bulanan katalaz enziminin etkisi ile yıkılması sonucu, bu maddenin 240 nm deki absorbansında azalma meydana gelir. Absorbansta gözlenen azalma hızı katalaz enzimi aktivitesi ile orantılıdır.

2.2.4.2 Kullanılan Çözeltiler:

- Fosfat tamponu, 1/15 mM; pH 7
- H_2O_2, % 30 luk

2.2.4.3 Numunelerin alınması

Numuneler SOD tayinindeki (2.2.3.3) gibi alınmıştır.

2.2.4.4 Deneyin yapılışı:

Eritrositler analiz öncesi üzerlerine 3,2 ml buz soğukluğunda distile su ilave edilerek hemoliz edildi. 1 ml hemolizat üzerine 0,8 ml kloroform/etanol karışımı (3/5[v/v]) ilave edilerek, 2500g'de 10 dakika santrifüj edildi. Analizde üstte kalan berrak kısım kullanıldı.

% 30 luk H_2O_2'ten 0,16 ml alınarak daha önce hazırlanmış bulunan fosfat tamponunun 100 ml sinde seyreltildi. Bu karışım 240 nm'de 0,5 absorbans verecek şekilde ayarlandı; bunun için küçük miktarlarda H_2O_2 ilave edildi. Daha sonra aşağıdaki şemaya uygun olarak küvetlere önce hazırlanan H_2O_2 çözeltisi kondu daha sonra numune ilave edilerek absorbansdaki düşüş 15'er saniye aralıklarla kaydedildi.

	Numune	Kör
Fosfat tamponu (ml)	-	2,99
H_2O_2 (ml)	2,99	0,01
Superatant (ml)	0,01	-

2.2.4.5 Sonuçların Hesaplanması:

Aşağıda verilen eşitlikten yararlanarak reaksiyonun k hız sabiti bulundu. Daha sonra da hemoglobinin gramı başına düşen k hız sabitleri hesaplandı.

$$k = \frac{2,3}{Dt} \text{ Log } \frac{S_1}{S_2}$$

Bu formulde

$Dt = t_2 - t_1$

S_1 = t_1 anındaki H_2O_2 konsantrasyonu

S_2= t_2 anındaki H_2O_2 konsantrasoynunu gösterin

2.2.5. Lipid Peroksid tayini

2.2.5.1 Prensib

Poliansature yağ asidlerinin peroksidasyonuyla oluşan malondialdehit, TBA ile renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Bu pembe-kırmızı renkli kompleksin 532 nm'de vermiş olduğu absorbanstan yararlanılarak kolorimetrik metodla lipid peroksidasyonunun bir indeksi olan MDA'nın tayin edilmesi prensibine dayanır.

2.2.5.2 Kullanılan Çözeltiler

- Fosfat-tuz tamponu; 4 mM PO_4^{-3} ; pH 7,4 - 150 mM NaCl
- Sodyum arsenit çözeltisi; 0,1 M
- TCA çözeltisi; 28 gr TCA 100 ml 0,1 M sodyum arsenit içinde
- TBA çözeltisi; % 1 lik (0,005 M NaOH içinde)

Stok standart çözeltisi; 1 mmol 1,1,3,3 tetraetoksi propan 100 ml 0,01 M HCl içinde 50 °C'de 60 dakika inkübe edildi. 1.1.3.3. tetra etoksi propanın hidrolizi ile oluşan bu stok MDA çözeltisinden 20, 10, 5, 2.5 ve 1 nmol/ml lik çalışma standatları hazırlandı.

2.2.5.3 Deneyin Yapılışı:

EDTA'lı tüplere alınan kanlar 2500xg de 10 dakika santirfüj edildi. Supernatant atıldı. 0,22 ml eritrosit paketinden alınarak üzerine 9 ml fosfat tuz tamponu ilave edildi. 2500 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. 7 hacim eritrosit paketine 19 hacim tampon denk gelecek şekilde fosfat-tuz tamponu ilave edildi. 37°C de 1 saat calkalayıcı su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyonu takiben 1 ml TCA çözeltisinden ilave edildi. 2500 g de 10 dakika santrifüj edildikten sonra berrak supernatattan 2 ml alınıp 0,5 ml TBA çözeltisi ilave edildi. Kaynar su banyosunda 15

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

dakika inkübasyondan sonra tüpler oda sıcaklığına kadar soğutulup 532 nm de absorbansları okundu.

2.2.5.4 Sonuçların Hesaplanması:

Numune yerine 2 ml çalışma standartlarından konularak hazırlanan tüplerden elde edilen absorbaslar ordinata ve MDA konsantrasyonları absise yerleştirilerek elde edilen standart eğriden numunenin optik dansite değerinin karşılığı olan numunedeki MDA miktarı nmol/ml olarak bulundu. Daha sonra tayin edilen hemoglobin miktarından gram Hb başına MDA miktarı hesaplandı.

2.2.6 Glikozile Hemoglobin Tayini (GHb):

2.2.6.1 Prensib:

Glikozile hemoglobinlerin diğer hemoglobinlerden boronik asid affinite kromotografi kolonları kullanılarak ayrılması esasına dayanar.

2.2.6.2 Deneyin Yapılışı:

GHb, tayini affinite kromotogrofi tekniği ile hazır mini affinite kolonları (Isolab-Gly-affin GHb test kiti) kullanılarak yapıldı.

Önce kolonlar dengelenerek hazırlandı. Heparinli tüpe alınan kan hemoliz edilip kolona uygulandı. Birinci elüsyon sıvısı ile bütün nonglikozile hemoglobinleri ihtiva eden ilk fraksiyon elüe edildi ve elüatlar toplandı. Numune kolondan geçerken boronat gruplarına bağlanan glikohemoglobinler ikinci elüsyon sıvı kullanılarak elüe edildi.

Her iki fraksiyonun absorbansları 415 nm'de su körüne karşı ölçüldü.

2.2.6.3 Sonuçların Hesaplanması

$$\% \text{ GHb} = \frac{100\ x}{x+100y}$$

x= GHb fraksiyonunun absorbansı

y= Non-glikozile hemoglobin fraksiyonunun absorbansı

2.3. İstatiksel Analizler

Sonuçlar ortalama ± standart sapma (X±SD) olarak verildi. Önemlilik dereceleri varyans analizi yaparak belirlendi. Parametreler arası ilişkileri değerlendirmek için korelasyon analizi yapıldı. Bu işlemler Minitab R isimli istatistik paket programıyla yapıldı. $p<0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3- BULGULAR

Çalışmamızda toplam 53 diabetli, 30 sağlıklı şahısta; eritrosit GR, FAD'li ve FAD'siz sistemlerde çalışıldı, GSH-Px, CAT, SOD aktiviteleri, eritrosit MDA, glikozile hemoglobin (GHb) ve serum açlık kan şekeri (AKŞ) değerleri tespit edildi. Bu parametrelere ait ortalama değerler (x) ve standart sapmalar (SD) Tablo 3.1 de verildi.

Tablo 3.1 Diabetli ve sağlam şahıslarda eritrosit GSH-Px, GR (FADli, FAD siz), SOD, katalaz GHb ve AKŞ değerleri

Parametreler	Hasta Grubu (n=53) x±SD	Kontrol Grubu (n=30) x±SD
GR (FAD`siz)(U/gHb)	9,67±1,41	6,44±1,11
GR(FAD`li) (U/gHb)	12,55±1,43	9,31±1,18
GSH-Px(U/gHb)	21,38±2,94	24,48±2,72
SOD(U/gHb)	1824±166	2000±127
Katalaz(k/gHb)	275,2±37,6	309,1±49,4
MDA(nmolMDA/grHb)	254,6±132,3	116,5±50,5
GHb(%)	13,69±3,95	5,67±0,87
AKŞ(mg/dl)	248,5±98,0	97,6±10,0

Çalışılan parametreler arasındaki korelasyon hesapları yapılarak korelasyon katsayısı hesap edildi. Önemlilik derecesi belirlendi. Bu hesaplama sonuçları Tablo 3.2 ve 3.3 de verilmiştir.

Tablo 3.2: Hasta grubu parametreleri arasındaki korelasyon sonuçları

Parametreler	n	r	p
GR(FAD`siz)-GR(FAD`li)	53	0,970	<0,001
GR (FAD`siz)-GSH-Px	53	0,090	> 0,05
GR (FAD`siz)-SOD	53	0,030	>0,05
GR (FAD`siz)-Katalaz	53	0,218	>0,05
GR (FAD`siz)-MDA	53	0,179	>0,05
GR (FAD`siz)-GHb	53	-0,089	>0,05
GR (FAD`siz)-AKŞ	53	-0,149	>0,05
GR (FAD`li)-GSH-Px	53	0,103	>0,05
GR (FAD`li)- SOD	53	0,039	>0,05
GR (FAD`li)-Katalaz	53	0,183	>0,05
GR (FAD`li)-MDA	53	0,150	>0,05
GR (FAD`li)- GHb	53	-0,070	>0,05
GR (FAD`li)-AKŞ	53	0,131	>0,05
GSH-Px-SOD	53	0,114	>0,05
GSH-Px-Katalaz	53	0,155	>0,05
GSH-Px-MDA	53	0,008	>0,05
GSH-Px-GHb	53	-0,268	<0,05
GSH-Px-AKŞ	53	-0,316	<0,05
SOD-Katalaz	53	0,332	<0,05
SOD-MDA	53	0,064	>0,05
SOD-GHb	53	0,005	>0,05
SOD-AKŞ	53	0,060	>0,05
Katalaz-MDA	53	-0,037	>0,05
Katalaz-GHb	53	0,140	>0,05
Katalaz-AKŞ	53	0,091	>0,05
MDA-Gb	53	-0,056	>0,05
MDA-AKŞ	53	0,056	>0,05
GHb-AKŞ	53	0,461	<0,01

Hasta grubu parametreleri arasında yapılan korelasyon çalışmalarında GR(FAD'siz) ile GR(FAD' li) ($p<0,001$) arasında çok kuvvetli, GHb ile AKŞ ($p<0,01$) arasında orta erecede kuvvetli , SOD ile CAT ($p<0,05$), GSH-Px ile AKŞ ($p<0,05$) ve GSH-Px ile MDA ($p<0,05$)arasında zayıf dereceli korelasyonlar saptandı. Diğer parametreler arasında herhangi bir korelasyon saptanmadı.

Tablo 3.3: Kontrol grubu parametreleri arasındaki korelasyon sonuçları

Parametreler	n	r	p
GR(FAD'siz)-GR(FAD'li)	30	0,977	<0,001
GR (FAD'siz)-GSH-Px	30	-0,159	> 0,05
GR (FAD'siz)-SOD	30	0,002	> 0,05
GR (FAD'siz)-Katalaz	30	-0,179	> 0,05
GR (FAD'siz)-MDA	30	0,81	> 0,05
GR (FAD'siz)-GHb	30	0,184	> 0,05
GR (FAD'siz)-AKŞ	30	-0,139	> 0,05
GR (FAD'li)-GSH-Px	30	-0,136	> 0,05
GR (FAD'li)- SOD	30	0,031	> 0,05
GR (FAD'li)-Katalaz	30	-0,216	> 0,05
GR (FAD'li)-MDA	30	0,036	> 0,05
GR (FAD'li)- GHb	30	0,239	> 0,05
GR (FAD'li)-AKŞ	30	-0,131	> 0,05
GSH-Px-SOD	30	-0,082	> 0,05
GSH-Px-Katalaz	30	-0,200	> 0,05
GSH-Px-MDA	30	-0,160	> 0,05
GSH-Px-GHb	30	0,063	> 0,05
GSH-Px-AKŞ	30	0,086	> 0,05
SOD-Katalaz	30	0,231	> 0,05
SOD-MDA	30	-0,034	> 0,05
SOD-GHb	30	-0,066	> 0,05
SOD-AKŞ	30	0,096	> 0,05
Katalaz-MDA	30	0,015	> 0,05
Katalaz-GHb	30	-0,327	> 0,05
Katalaz-AKŞ	30	0,068	> 0,05
MDA-GHb	30	-0,158	> 0,05
MDA-AKŞ	30	0,026	> 0,05
GHb-AKŞ	30	0,075	> 0,05

Kontrol grubu parametreleri arasında sadece GR(FAD'li) ile GR(FAD'siz) arasında çok kuvvetli derecede korelasyon vardı. Diğer parametreler arasında herhangi bir korelasyon saptanmadı.

Yapılan analiz sonucu iki grup arasındaki farkın önemli olup olmadığını tespit etmek için varyasyon analizi uygulandı. Buna göre önemlilik dereceleri tablo 3,4'de verildi.

Tablo 3.4: Çalışılan parametrelerin kontrol grubu ve diabetiklerde karşılaştırılması

Parametreler	Hasta Grubu (n=53) x±SD	Kontrol Grubu (n=30) x±SD	P
GR (FAD'siz)	9,67±1,41	6,44±1,11	<0,001
GR(FAD'li)	12,55±1,43	9,31±1,18	<0,001
GSH-Px	21,38±2,94	24,48±2,72	<0,001
SOD	1824±166	2000±127	<0,001
Katalaz	275,2±37,6	309,1±49,4	<0,001
MDA	254,6±132,3	116,5±50,5	<0,001
GHb	13,69±3,95	5,67±0,87	<0,001
AKŞ	248,5±98,0	97,6±10,0	<0,001

Yapılan istatistiksel karşılaştırmalarda GR (GAD'siz), GR(FAD'li), GSH-Px, SOD, CAT, MDA, GHb ve AKŞ parametreleri açasından hasta ve kontrol grubu arasındaki fark ($p<0,001$, herbiri için) istatistiksel olarak önemli derecede anlamlıydı.

4- TARTIŞMA

Diabet ve diabet komplikasyonlarının patogenezinde oksidatif stress önemli bir yere sahiptir. Nonenzimatik glikozilasyon, otooksidatif glikozilasyon, enerji metabolizmasındaki değişiklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yolu aktivitesi, inflamatuar mediatörlerin düzeyleri, antioksidan savunma sistemindeki değişklikler, hipoksi ve iskemik reperfüzyon hasarı sonucu oluşan lokalize doku hasarı diabette oksidatif stresi arttıran mekanizmalardır.

Meydana gelen serbest radikaller; lipidler, proteinler, enzimler ve nükleik asidler gibi çok önemli makromoleküller ile etkileşip hücre yapı ve fonksiyonunda büyük ölçüde hasara sebep olurlar. Oluşan lipid peroksidasyonu, protein parçalanması ve enzim inaktivasyonu sonucunda membran hasarı, DNA yapı bozuklukları ve mutasyonlar görülür. Oksidatif stres sonuçta diabetik katarakt, retinopati nöropati, nefropati, ve ateroskleroz, amfizem, aritmi ve yaşlanma gibi diabetin komplikasyonlarının oluşum ve ortaya çıkışında rolü olabilir (14,17,20,22,23,24,30,31).

Alloksan ve streptozosinle yapılan hayvan çalışmalarından elde edilen bulgular diabetin başlamasında oksidasyonun rol oynadığını göstermiştir (17). Bu kimyasal maddelerin her ikisi de oksidan maddeler meydana getirerek pankreasın Langerhans adacıklarını tahrip ederler. Bunlardan alloksan; intrasellüler redüktan olarak görev yapan askorbat ve tiollerle reaksiyona girerek onların antioksidan etkilerini engeller ve böylece oksidan üretimine sebeb olur.

Bütün bunların ışığında diabet oluşumu ve etkileri ile oksidatif stres ve antioksidan sistem arasındaki ilişki büyük önem kazanmaktadır. Bu bir çok araştırmacının da ilgisini çekmiştir. Yapılan çalışmalarda gerek diabetin heterojen bir

etyopatogenezinin oluşu, gerekse kullanılan metod farklılıkları nedeniyle değişik sonuçlara rastlanmıştır. Biz de antioksidan enzim sisteminin işleyişini, bunların lipid peroksidasyonu ve hemoglobin glikozilasyonu ile ilişkilerini araştıran daha geniş bir çalışma yaparak konunun incelenmesini amaçladık. Bu amaçla da GR, GSH-Px, SOD ve CAT aktiviteleri, lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA tayini ve glikozile hemoglobin düzeylerinin ölçümü yapıldı.

Bir flavo enzim olan GR normalde hemolizatlarda FAD ile tam aktive olmamış bulunmaktadır. Apoenzimin tam aktivasyonu için FAD ile ön inkübasyonu, NADPH ve GSSG nin, apoenzimin FAD ile bağlanmasını engellememesi için gereklidir. Beutler metodu (12) kullanılarak yaptığımız çalışmada GR aktivitesi, hem FAD'lı hem de FAD'siz sistemlerde ölçülmüştür. Literatürde GR için verilen eritrosit aktivitesi değerleri FAD'siz 6-8 U/gHb ve FAD'li 9-11,5 U/g Hb arasındadır (41,47). Bizim çalışmamızdaki kontrol grubu ortalama değerleri de literatürle uyumluydu. Sırasıyla kontrol değerleri FAD'siz sistemde 6,44±1,11 U/g Hb, FAD'li sistemde ise 9,31±1,18 U/g Hb olarak bulundu. Diabetik eritrosit GR aktivitesi ise FAD' siz sistemde 9,67±1,41 U/g Hb FAD'li sistemde ise 12,55±1,43 U/g Hb olarak bulundu. Diabetik ve kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Beutler metoduyla daha önce yapılan çalışmada diabetik eritrosit GR aktiviteleri FAD'siz ve FAD'li sistemlerde tespit edilmiştir ve sonuçlar FAD'siz 11,75±1,41 U/g Hb ve FAD'li 14,91±1,78 U/gH olarak bulunmuştur (23). Godin ve arkadaşları FAD'siz deney ortamında yaptıkları çalışmada eritrosit GR aktivitesini kontrol grubunda 3,96±0,53 µmoll NADPH/mın/gHb, diabetik grubta ise 5,47±0,85 µmol/NADPH/mın/gHb olarak bulmuşlar bu değerler bizim ve literatürdeki diğer araştırmacıların FAD siz sistemdeki değerlerinden biraz düşüktür (53). Gupta ve arkadaşları alloksanla diabet oluşturdukları sıçanlarda eritrosit GR aktivitesini Erden ve Bor metoduna göre tayin

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

etmişlerdir. Bunlar, kontrol ve diabetik grup eritrosit GR arasında önemli fark tespit etmişlerdir ve diabetiklerde GR aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir (56). Yine Wohaieb ve arkadaşları streptozosin ile oluşturdukları diabetik sıçanlarla diabetik insan eritrositlerinin GR aktivitelerini aynı metoda göre çalışıp, eritrosit GR aktivitesini her iki grupta da karşılaştırmalı olarak yüksek bulmuşlardır (54,55). Velyki ve arkadaşları streptozosin vererek oluşturdukları diabetli sıçanlarda GR aktivitesini kontrol grubuna göre % 20 oranında yüksek bulmuşlardır (62). Atalay ve arkadaşları da tip I diabetli (IDDM) hastalar üzerinde yaptıkları çalışmalarda GR aktivitesinin kontrollere göre% 15 oranında arttığını bulmuşlardır (57).

Eritrosit GSH-Px'i, diabetle artan hidrojen peroksid ve lipid peroksitleri indirgeyerek eritrosit membranlarının peroksidasyonunu önlemektedir. Diabetik eritrositlerdeki GSH-Px aktivitesi Beutler'in metoduna göre (12) çalışıldı. GSH-Px'in aktivitesi; NADPH'ın oksidasyonuna bağlı olarak 340 nm deki optik dansite düşüşünün köre karşi ölçülmesiyle hesaplanarak kontrol grubunda 24,48±2,72 U/gHb, diabetik grupta ise 21,38±2,94 U/gHb olarak bulundu. Aralarındaki fark önemliydi. Aynı metodla daha önce yapılan bir çalışmada, kontrol grubunda eritrosit GSH-Px aktiviteleri 29,31±3,52 U/gHb, diabetli hasta grubunda 26,17±3,90 U/gHb olarak bulunmuştur (23). Literatürde yer alan GSH-Px aktiviteleri 20-35 U/gHb arasında verilmiştir (41,47). Atalay ve arkadaşları (57), Osterode ve arkadaşları (58), Ndahimama ve arkadaşları (59) IDDM'li hastalarda GSH-Px seviyelerini kontrol grubuna göre düşük bulmuşlardır. Gupta ve arkadaşları ise alloksanla oluşturdukları diabetli sıçan eritrositlerini üç ayrı yaş grubuna bölmüş ve her üç yaş grubunda diabetli eritrositlerin GSH-Px seviyelerini kontrollere göre düşük bulmuştur (56). Twardowska ve arkadaşları normal ve diabetik gebelerde yaptıkları çalışmalar

sonucunda; diabetik gebelerde eritrosit GSH-Px enzim aktivitelerini daha düşük bulmuşlardır (60).

Eritrosit katalaz aktivitesi tayinini Aebi (50) metoduyla yaptık. Katalazın H_2O_2'i H_2O ve O_2'e dönüştürmesiyle absorbansta meydana gelen düşüşü spektrofotometrede takip ettik.

Literatürde yer alan eritrosit katalaz aktiviteleri 293-313 k/gHb arasında değişen değerlerde verilmiştir (16,50). Bizim çalışmamızda da eritrosit katalaz aktivitesi kontrol grubunda 309±4,94 k/gHb, diabetli hasta grubunda ise 275±37,6 k/gHb olarak bulundu. Twardowska ve arkadaşları normal ve diabetik gebe kadınlar üzerine yaptıkları çalışmalarda diabetli gebelerin eritrositlerindeki katalaz aktivitesinde anlamlı bir azalma tespit etmişler (60). Vijayalingam ve arkadaşları yaptıkları çalışmada hastaları 2 saatlik OGTT sonrası plazma glukoz düzeyi; 11,1 mmol/l nin altında ancak 30, 60, 90 dakikalardaki herhangi bir değer 11,1 mmol/l nin üzerinde olan grup (erken hiperglisemik grup) ve açlık plazma glukoz konsantrasyonu 7,8 mmol/L'nin altında, OGTT plazma glukoz düzeyleri ise 7,8-11,1 mmol/L arasında olan grup (gerçek bozulmuş glukoz toleransı olan grup) olarak iki gruba ayrılmışlar, bu iki grup ve NIDDM'li hastalar arasında yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda eritrosit katalaz enzim aktivitesi benzer şekilde kontrollere göre düşük tespit edilmiştir (61). Velykyi ve arkadaşları streptozosin kullanarak diabet oluşturdukları sıçanlarda eritrosit katalaz aktivitesini kontrollerden düşük bulmuşlardır (62).

Literatürde yer alan eritrosit SOD enzim aktivitesi değerleri 2254±303 U/gHb (12), bir başka çalışmada da 2400 ile 3700 U/gHb arasında değişen değerler olarak verilmiştir (63). Bizim çalışmamızda da eritrosit SOD enzim aktivitesi kontrol grubunda 2000±127 U/g Hb, diabetli hasta grubunda ise 1824±166 U/gHb olarak

bulundu. Atalay ve arkadaşları da IDDM'li hastalarda yaptıkları çalışmada kontrol grubuyla mukayese edildiğinde, diabetli grupta SOD aktivitesinde anlamlı bir azalma tesbit etmişlerdir (57).

Vijayalingam ve arkadaşları (61) bozulmuş glukoz toleranslı hastalar ve NIDDM'li hastalarda, Velykyi ve arkadaşları (62) streptozosin vererek diabet oluşturdukları sıçanlarda ve Twardowska ve arkadaşları (60) diabetik gebelerde yaptıkları çalışmalarda eritrosit SOD enzim aktivitelerini kontrol gruplarına göre daha düşük olarak tesbit etmişlerdir. Biyomoleküllerin büyük bölümü serbest radikaller tarafından etkilenebilir fakat bunların içinde en hassas olanı lipidlerdir. Membrandaki kolesterol ve yağ asidlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asidlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü, kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür (9,17,22,23).

İlk kez Sato ve arkadaşları diabetli hastalarda plazma lipid peroksid seviyelerinde artma olduğunu belirlemişlerdir. Daha sonra Uzel ve arkadaşları diabetli hastalardaki lipid peroksidasyonundaki artışın membran lipidlerinin peroksidatif yıkımından kaynaklanabileceğini öne sürmüşlerdir (64,65).

Plazma membranları birkaç nedenden dolayı serbest radikal reaksiyonlarının kritik bölgesidir. Extrasellüler olarak oluşan serbest radikaller diğer hücresel komponentlerle etkileşmeden önce plazma membranını geçmektedirler. Membranda bulunan doymamış yağ asidleri (fosfolipidler, glikolipidler, gliseridler ve steroller) serbest radikaller tarafından hasara uğratılabilir. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan membran permeabilite artışı; transmembran iyon gradientinin bozulmasına, salgı

fonksiyon kaybına ve hücresel metabolik fonksiyonların inhibisyonuna neden olur (22).

Selvam ve Anuradha diabetik eritrositlerde lipid peroksidasyonunun artması sonucu membran yapı ve fonksiyonlarının değiştiği ve membran hasarının oluştuğunu, eritrositlerde rijidite, osmotik frajilite ve kalsiyum geçirgenliğinin arttığını ve lipid akışkanlığının değiştiğini bunların sonucu olarak da eritrosit ömrünün azaldığını bildirmişlerdir (66,67).

Üç ya da daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asidlerinin peroksidasyonu sonucu MDA oluşacaktır. MDA'nın TBA ile reaksiyonu sonucu pempe-kırmızı renkli 532 nm'de absorbans veren bir kompleks oluşacaktır. Malondialdehitin TBA ile ölçümü yağ asidi oksidasyonunun kantitatif ve spesifik bir ölçümü olmamasına rağmen lipid peroksidasyonunun derecesi hakkında fikir vermektedir (9,22,23).

Biz de çalışmamızda diabetik eritrositlerdeki lipid peroksidasyonunun bir indeksi olan MDA miktarını TBA metodu ile tespit ettik. Yaptığımız çalışmada eritrositlerde kontrol grubunda 116,5±50,5 nmolMDA/grHb, diabetiklerde 254,6±132,3 nmol MDA/grHb değerlerini tespit ettik. Çalışmamızda hasta ve kontrol gruplarının ortalama eritrosit MDA seviyeleri arasındaki fark çok anlamlıydı (23). Daha önce aynı laboratuvarda tip II diabetiklerde yapılan çalışmalarda eritrosit MDA seviyeleri hasta ve kontrollerde sırasıyla; 310.7±69.08 nmolMDA/gHb ve 106.6±39.8 nmolMDA/gHb; 301.2±67.4 nmolMDA/gHb ve 95.8±26.3 nmolMDA/gHb olarak bulunmuştur(9, 23). Uzel ve arkadaşları H_2O_2 asidli ortamda eritrosit MDA seviyelerini kontrollerde 559±98,4 nmolMDA/gHb, diabetiklerde ise 760,3±132,2 nmolMDA/gHb olarak bulmuşlardır (65). Selvam ve arkadaşlarının H_2O_2 ve asid ilave etmeden yaptıkları çalışmada eritrosit MDA seviyelerini kontrollerde 3,12±1,4 pmolMDA/gHb ve diabetiklerde 10,2±43 pmol MDA/gHb olarak bulmuşlardır (66).

Glikozile hemoglobin ölçümü diabetin kontrolünde önemli bir kriterdir. Bu amaçla çeşitli metodlar bulunmuştur. İyonik yük, pH ve sıcaklıktan etkilenen kromatografik metodlarda doğru ölçümü elde edebilmek için Pre-A_{1C}'nin uzaklaştırılması gerekmektedir. İzoelektrik odaklama ve agar jel elektroforezi gibi elektroforetik metodlar yaygın olarak kullanılmamaktadır. Kullanımı sınırlı olan bir başka metod da radyoimmünoassaydır. Kolorimetrik ve flurometrik metodlar yalnızca kararlı ketoaminlere spesifik olduğundan kararsız aldiminlerin uzaklaştırılması gerekmemektedir. Ayrıca diğer metodlara göre daha ucuz ve kolaydır. Ancak oldukça zaman almaktadır. Affinite kromatografisi metodu da kolorimetrik ve flurometrik metodlar gibi ketoaminlere spesifik ve total glikozile hemoglobinlerin ölçüldüğü bir metoddur. Bu metod pre-A_{1C} ve diğer hemoglobinlerden etkilenmemektedir. Plazma glukozunun uzaklaştırılması için yıkamalara gerek olmadığından kolorimetrik metoddan daha avantajlıdır. Bu metoda göre geliştirilen mini affinite kolonları ihtiva eden kitlerle son derece hızlı ve kolay bir şekilde glikozile hemoglobin tayini yapılmaktadır (2.5,8,9).

Biz de glikozile hemoglobini kromatografik metodla, total hemoglobinin % si olarak tesbit ettik ve kontrol grubunda % 5,67±0,87, diabetik grubta ise % 13,69±3,95 olarak bulduk. Referans değerleri normal kişiler için % 4-8 arasında verildi.

Elli üç diabetik ve otuz sağlam şahıs üzerinde yaptığımız çalışmada, diabetik ve kontrol grupları arasında eritrosit GR, GSH-Px, SOD, CAT aktiviteleri, eritrosit MDA seviyeleri, GHb ve AKŞ değerleri önemli ölçüde farklı bulundu (Her parametre için $p<0,001$).

Daha önceki çalışmalarda diabetik eritrositlerde oksidatif stresin arttığı tesbit edilmiştir. Diğer taraftan hayvan deneylerinle ve ayrıca tip II diabetiklerde eritrositlerin

pentoz fosfat yoluyla glukoz kullanım oranının arttığı tesbit edilmiştir. Nakasaka ve arkadaşları oksidatif streste eritrositlerde pentoz fosfat yoluyla glukoz kullanım oranının % 10'dan % 90'lara çıkabildiğini rapor etmişlerdir. Diabetiklerde pentoz fosfat yolunun hızlanışı, bir ihtiyacı karşılamak üzere olsa gerektir. Zira hem pentoz fosfat yolunda artış (dolayısı ile NADPH'de artış) ve hem de diabetiklerde yüksek GR ve düşük GSH seviyelerinin birlikte bir açıklamaya ihtiyacı vardır. Diabetik eritrositlerin yüksek glukoz konsantrasyonu ile AR aktifleşince normalde çalışmayan veya çok yavaş olan sorbitol yolu hızlanacak ve buna paralel olarak NADPH tüketecektir. Bu yolun hızına bağlı NADPH tüketimi diabetik eritrositlerde oksidatif stresin belki de en önemli sebeplerinden biridir. Glikozik proteinler ve diğer taraftan ayrıca yüksek glukoz konsantrasyonlarında sıkça oluşan glukozun enol formu da oksijeni indirgeyici serbest radikaller oluşturmaktadırlar (70,71,72).

Çalıştığımız diabetik eritrositlerde GR nin yüksek, GSH-Px, SOD ve CAT'ın kontrollere göre düşük bulunuşu literatürle uygunluk göstermektedir. Bununla beraber bu enzimlerin aktivitelerinde, az da olsa bazı literatürler de daha farklı değerlere ve hatta diabetik eritrositlerle diabetik başka dokularda farklı değişmelerin olduğuna dair bilgiler bulunmaktadır. Bu, protein sentezine muktedir olmayan eritrositlerin kemik iliğinden sirkülasyondaki ömürlerinin sonuna kadar, diabetten çok farklı şekillerde etkileniyor olmasından kaynaklanıyor olabilir. Zira tip II diabetin oluşumun ve daha sonra kişilerin aldıkları ilaç, diet, fiziki akitvite v.b. faktörlerin farklılığına bağlı olarak hastadan hastaya tezahürünün farklı olması; diabetiklerin bazı parametrelerindeki seviyelerini önemli ölçüde farklı olarak etkileyebilmektedir. Ayrıca aynı grup içinde antioksidan sistem enzimlerinin aktivite değişimleri de, SOD-CAT dışında birbiri ile korelasyon göstermemektedir.

Sonuç olarak, hiperglisemiden kaynaklanan protein glikozilasyonu, sorbitol yolu aktivasyonu gibi serbest radikal oluşumunu hızlandırıcı ortamların çoğalmasına karşılık, literatürdeki pek çok araştırmacının sonuçlarıyla uyum gösteren çalışmamızda da antioksidan savunma mekanizmasındaki enzim aktivitelerinde –GR dışında - tesbit edilen düşüş, diabetik eritrositlerinin serbest radikal hasarına yüksek seviyede maruz kalabileceğini göstermektedir.

Antioksidan mekanizmalarla ilgili diabetik eritrositlerde yer alan enzim değişikliklerinin, eritrosit protein sentez kademelerini de içine alan incelemelerle daha detaylı açıklanması ve yoğun oksidatif strese maruz kalan diabetli hastaların tedavisinde antioksidanların yerinin ne olduğunun araştırılması gerekmektedir.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

ÖZET

TİP II DİABETLİLERDE ERİTROSİT GLUTATYON REDÜKTAZ, GLUTATYON PEROKSİDAZ, SÜPEROKSİT DİSMUTAZ, KATALAZ AKTİVİTELERİ, HEMOGLOBİN GLİKOZİLASYONU VE LİPİD PEROKSİDASYONUNUN İNCELENMESİ

Diabetes Mellitusta ortaya çıkan hipergliseminin oksidatif stresi arttırdığı (serbest radikal oluşumunu arttırdığı) öne sürülmektedir. Bu çalışmada Tip II diabetes mellitusda oksidatif stresi ve antioksidan savunma sisteminin durumunu incelemeyi amaçladık. Bunun için 53 tip II diabetli hasta grubu ile 30 sağlıklı kontrol grubu eritrositlerinde antioksidan savunma sisteminin önemli parametreleri olan GR, GSH-Px, SOD, CAT aktiviteleri ve lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA düzeyleri ölçüldü. Bu parametrelerin serum glukoz ve glikozile Hb değerleri ile korelasyonu araştırıldı. Eritrosit GR akitviteleri diabetiklerde kontrollere göre anlamlı derecede yüksekti ($p<0,001$). Bunun yanısıra diabetiklerin eritrosit GSH-Px (21,38±2,94 U/gHb), SOD (1824±166 U/gHb) ve CAT (275±37,6 k/gHb) aktiviteleri kontrol grubu değerlerine göre (GSH-Px: 24,48±2,72 U/gHb; SOD: 2000±1127 U/gHb CAT: 309±4,94 k/gHb) oldukca düşüktü ve her üç parametre için fark istatistiksel olarak önemli ölçüde anlamlıydı ($p<0,001$). Ayrıca diabetiklerin eritrosit MDA düzeyleri de kontrollere göre oldukça yüksekti (sırasıyla 254,6±132,3 nmolMDA/gHb ve 116,5±50,5 nmolMDA/gHb; ($p<0,001$).

Diabetik grupta çalıştığımız parametrelerden GSH-Px ile HbA_{1C} ($r=0,268$; $p< 0,05$) ve GSH-Px ile AKŞ ($r=-0,316$; $p< 0,05$) arasında negatif, SOD ile CAT ($r=0,332$; $p<0,05$) arasında pozitif korelasyon saptandı.

Sonuç olarak diabetes mellitusda görülen sorbitol yolunun aktivasyonu ile artmış protein glikasyonu gibi durumlar serbest radikallerin fazla üretimine sebeb olur. Bu çalışmaların verilerine göre diabetes mellitusda serbest radikal üretiminin arttığı ve antioksidan savunma mekanizmasının bozulduğu söylenebilir.

SUMMARY

THE INVESTIGATION OF ACTIVITIES OF ERYTHROCYTE GLUTATHIONE REDUCTASE, GLUTATHIONE PEROXIDASE, SUPEROXIDE DİSMUTASE AND CATALASE; GLYCOSYLATION OF HEMOGLOBIN AND LIPID PEROXIDATION IN PATİENTS WITH TYPE II DIABETES MELLITUS

It has been proposed that hyperglycemia seen in diabetes mellitus (DM) increases oxidative stress(the production of oxygen free radicals). In this study, we aimed to investigate the condition of oxidative stress and antioxidative defense system in type II DM. So, the activities of glutathione reductase(GR), glutathione peroxidase(GSH-Px), superoşide dismutase (SOD) and catalase (CAT) being the important components of enzymatic antioxidative defense system, and MDA levels, as the marker of lipid peroxidation, were measured in erythrocytes of 53 patients with NIDDM and 30 healthy volunteers and the relationship of these parameters with serum glucose and HbA_{1C} values was also investigated.

Erythrocyte GR activities were found to be significantly higher in diabetics than in healthy subjects ($p<0,001$). In diabetic group, erythrocyte GSH-Px (21,38±2,94 U/gHb), SOD (1824±166 U/gHb) and CAT (275±37,6 k/gHb) activities were considerably lower when compared those (GSH-Px: 24,48±2,72 U/gHb; SOD: 2000±1127 U/gHb CAT: 309±4,94 k/gHb) of the control group, and the differences were statistically significant ($p<0,001$, for each).

Additionally, erythrocyte MDA levels of the patient group were found to be increased when compared to those of the controls (254,6±132,3 nmolMDA/gHb v.s. 116,5±50,5 nmolMDA/gHb; ($p<0,001$).

In corelation analysis, there were negative correlations between GSH-Px - HbA_{1C} ($r=0,268$; $p< 0,05$) and GSH-Px—serum glucose levels ($r=-0,316$; $p< 0,05$)

and positive corelation between SOD-catalase ($r= 0,332$; $p< 0,05$) in the patient group.

As a result, some conditions such as protein glycation and activation of sorbitol pathway seen in diabetes mellitus cause increased production of free radicals. From these results, it may be speculated that production of free radicals is increased and the antioxidative defense mechanism is impaired in type II DM.

6- KAYNAKLAR

1- Koloğlu S. Endokrinoloji Temel ve Klinik, Medikal Network, 1. Baskı, Ankara, 1996.

2- Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Company, 1998.

3- Sack BS. İmplications of the Revised Criteria for Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus Clinical Chemistry 43(12) 2230-2232, 1997.

4- Gedik O, Akalın S. Diabetes Mellitus, Modern Tıp Seminerleri. Haccettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Güneş Kitapevi Ankara, 1989.

5- Shuman CR. Diabetes mellitus: Definition, Clasification and Diagosis. In: Galowa JA, Patwin JH, Shuman CR,eds. Diabetes Mellitus. Ninth Edition, Eli Lilly and Company, 1988.

6- Aral Y, Ünüvar N. Endokrinloji ve Metabolizma Hastalıklarında Temel Tedavi. Servier Araştırma Grubu, 1998.

7- Muray KR, Mayes PA, Granner, DK, Rowell VW. Harper's Biochemistry, Twenty second Edition. A Lange Medical Book. 1991.

8- Kaplan AL, Pesce LA. Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation, Mosby Company, Third Edition, 1996.

9- Umudum FZ. Diabetiklerde Eritrosit Aldoz Redüktaz Aktivitesi ve Lipid Peroksidasyonu, Doktora Tezi, Erzurum, 1993.

10-Bhagahavan NY. Biochemistry, 2 nd edition, J.B., Lippincot Co. 1978.

11- Andrea M, Paleori R, Trapolino A. A Re-evaluation of Glycohaemoglobin Standardisation: The Italian Experience with 119 Laboratori and 12 metodhs, European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistr 35(3): 243-248,1997.

12- Beutler E. Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Metods. Third Edition. Grune Strattan, INC 1984.

13-Şahin YN. Koyun Karaciğer Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması Fiziko Kimyasal ve Kinetik Özelliklerin Araştırılması. Doktora Tezi, Ankara, 1984.

14- Hallwell B. Reactive Oxygen Species in Living Systems Source, Biochemistry, and Role in Human Disease, The American Journal of Medicine 91 (3C): 14-22, 1991.

15- Akyol Ö. Beyin Tümörlerinde Doku Superoksit Dismutaz, Katalaz ve Glutatyon Peroksidaz Aktiviteleri, Uzmanlık Tezi, Ankara, 1994.

16- Şahin A. Lösemili Hastaların Blastik Hücreleri ve Eritrositlerinde SOD ve Katalaz aktiviteleri, Uzmanlık Tezi, ankara, 1991.

17- Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, Konya, 1995.

18- Frei B. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Vitamins: Mechanisms of Action, The American Journal of Medicine 97 (3A): 5-13, 1994.

19-Lynch RE, Fridovich I. Permation of the Erytrocyte stroma by Superoxide Radical, The Journal of Biological Chemistry, 253(13): 4697-4699, 1978.

20-Özdemir G. Reaktif Oksijen Partikülleri, Roche Bilimsel Eserler Serisi, Eskişehir, 1993.

21- Altuntaş İ. Şizofrenik Hastalarda Enzimatik, Nonenzimatik Antioksidan Savunma Sistemleri ve Lipid Peroksidasyonu, Uzmanlık Tezi, Erzurum, 1998.

22- Freeman BA, Crapo JD. Biology of Diasease: Free Radicals and Tissue İnjury, Laboratory Investigation 47(5): 412-426, 1982.

23- Demir E. Diabetiklerde Eritrosit Glutatyon Reduktaz, Glutatyon Peroksidaz Aktivitelerinin; Glikozile Hemoglobin ve Lipid peroksidasyonu ile Değişimlerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Erzurum, 1994.

24- McCord JM. The Superoxide Free Radical: Its Biochemistry and Patophysiology, Surgery 94(3): 412-414, 1983.

25- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Principles of Biochemistry. Worth Publishers Inc. Second Edition: 760-761, 1993.

26- Onat T, Emerk K. Temel Biyokimya, Saray Medikal Yayıncılık, 2. Baskı İzmir, 1997.

27- Davies KJA, Goldberg AL. Proteins Damaged by Oxygen Radicals are Rapidly Degraded in Extracts of Red Blood Cells, The Journal of Biological Chemistry, 262(17): 8227-8234, 1987.

28- Davies KJA, Delsignore, ME, Lin SW. Protein Damage and Degradation by Oxygen Radicals: Modification of Amino Acids, The Journal of Biological Chemistry, 262(29): 9902-9907, 1987.

29- Davies KJA, Delsignore ME. Protein Damage and Degradation by Oxygen Radicals: Modification of Secondory and Tertiary Structure, The Journal of Biological Chemistry, 262(20): 9908-9913, 1987.

30- Rungby J, Flyvbjerg A, Andersen HB. Lipid Peroxidaiton in Early Experimental Diabetes in Rats: Effects of Diabetes and İnsulin, Acta Endocrinologica 126: 378-380, 1992.

31- Halliwell B, Gutteridge JMC. Lipid Peroxidation, Oxygen Radicals, Cell Damage, and Antioxidant therapy, The Lancet, 1396-1397, 1984.

32- Girotti AW, Thomas JP, Jordan JE. Lipid Photooxdation in Erythrocyte Ghosts: sensitization of the Membranes Toward Ascorbate and Superoxide-Induced Peroxidation and Lysis, Archives of Biochemistry and Biophysics, 236(1): 238-251,1985.

33- Santini SA, Marra G, Giardina B. Detective Plasma Antioxidant Defenses and Enhanced Susceptibilty to Lipid Peroxidation in Uncomplicated IDDM, Diabetes, 46: 1853-1857, 1997.

34- Gallou G, Ruelland A, Legras B. Plasma Malondialdehyde in Type I and Type II Diabetic Patients, Clinica Chimica Acta 214:227-234, 1993

35- Gaziano M. Antioxidant Vitamints and Coronary Artery Disease Risk. The American Jurnal of Medicine, 97(3A): 18-28, 1994.

36- Hennekens CH. Antioxidant Vitamins and Cancer, The American Journal of Medicine 97(3A)2-4, 1994.

37- Packer L. The Role of Anti-oxidative Treatment in Diabetes Mellitus,, Diabetologia 36:1212-1213, 1993.

38- Akpoyraz M. Organik Kimya, Optimal Tıp Yayınları, Ankara , 1990.

39- Smith JE. Relationship of in vivo Erythrocyte Glutathione Transport System,Journal of Laboratory and clinical Medicine, 83(3): 444-450, 1974.

40- Arrick BA, Nathan CF. Glutathione Metabolism as a Determinant of Therapeutic Efficacy: A Reiew. Cancer Research 44: 4224-4232, 1984.

41- Murakami K, kondo T, Ohtsuka Y. Impairement of Glutathione Metabolism in Erythrocytes from Patients with Diabetes Mellitus. Metabolism 38 (8): 753-758, 1989.

42- Fuji S, Dale GL, Beutler E. Glutathione Dependent Protection Against Oxidative Damage of the Human Red Cell Membrane, Blood 63(5): 1096-1101, 1984.

43- Gökhun İH, Taşman S, Durak İ, Şapih ŞH. Türk Toplumunda Glutatyon Redüktaz, Piruvat Kinaz ve Katalaz Eksikliğinin Tespiti İçin Tarama Testleri. Doğa 2: 239-244, 1987.

44- Mısra HP, Fridowch I., SuperoxideDismutase: A: Photochemical Augmentation Assay. Archives of Biochemistry and Biophysics 181: 308-312, 1977.

45- Lynch RE, Fridovich I, Effects of Superoxide on the Erythrocyte Membrane. The Journal of Biological Chemistry 253(6): 1838-1845, 1978.

46- Tho LL, Cendlish JK. Superoxide Dismutase and Glutathione Peroksidase Activities in Erythrocytes as Indices of Oxygen Loading in Disease: A Survey of One Hundred Cases. Biochemical Medicine and Metabolic Biology 38: 74-80, 1987.

47- Fujii S. The Role of Glutathione Peroxidase in the Anti-oxidant System of Erythrocytes. British Journal of Haematology, 68: 263-271, 1988.

48- Gonzales R, Auclair C, Voisin E, Gautero H. Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase in Red Blood Cells From Patients with Malignant Disease. Cancer Research 44: 4137-4139, 1984.

49-Avıram I, Shakla N. The Association of Human Erythrocyte Catalase with the Cell Membrane. Achives of Biochemistry and Biophysics 212(2): 329-337, 1981.

50- Aebi, H: Catalase İn: Bergmeyer U (ed), Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press, New York, 673-677, 1974.

51- Stryer L. Biochemistry. Third Edition, 439-437, 1988.

52- Tietz N. Testbook of Clinical Chemistry, W.B., Saunders Company, 1986.

53- Godin DV, Wohaieb SA, Garnett ME, Goumeniouk AD. Antioxidant Enzyme Alteration in Experimental and Clinical Diabetes, Molecular and Cellular Biochemistry, 84: 223-231, 1988.

54- Wohaieb SA, Godin DV. Alterations in Free Radical Tissue-Defense Mechanism in Streptozocin-Induced diabetes in Rat., Diabetes 36: 1014-1018, 1987.

55- Wohaieb, S., Godin, D.V., Allerations in Tissue Antioxidant Systems in the Spontaneusly Diabetic (BB Wistar) Rat, Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 65: 2191-2195, 1987.

56- Gupta BL, Ansarı MR, Srivastava P. Ageing Erythrocytes and Alloxan Diabetes: A Possible Role of Catalase, GSH, GSSG, and GSH-Enzymes in Decreasing Defence System. Biochemistry Molecular Biology Int. 31 (41): 669-679, 1993.

57- Atalay M, Laaksonen DE, Niskanen L, Uusitupa M. Altered Antioxidant Enzyme Defences in İnsulin-Dependent Diabetic Men with Increased Resting and Exercise-Induced Oxidative Stress. Acta Physiolologica Scandinavica 161(2): 195-201, 1997.

58-Osterode W, Holler C. Nutritional Antioxidants, Red Cell Membrane Fluidity and Blood Viscosity in Type I (İnsulin Depedent) Diabetes Mellitus. Diabetic Medicine 13(12): 1044-1050, 1996 (Abstract).

59- Ndahimana J, Dorchy H. Erythrocyte and Plasma Antioxidant Activity in Diabetes Type I. Presse Medicale 25(5): 188-192, 1996 (Abstract).

60- Twardowska-Saucha K, Grzeszczak W, Lacka B. Lipid Peroxidation, Antioxidant Enzyme Activity and Trace Element Concentration in II and III Trimwester of Pregnancy in Pregnant Women with Diabetes. Polskie Archiwum Medycyay Wewnetrznej 92(4) 313-321, 1994 (Abstract).

61- Vijayalingam S, Porthiban A. Abnormal antioxidant Status in İmparied Glucose Tolorance and Non-İnsulin dependent Diabetes mellitus. Diabetic Medicine 13(8): 715-719, 1996 (Abstract).

62- Velykyi MM, Burda YA, Bironf NU. The Effect of Nicotinamide on the Enzymatic Activity of the Antioxidant Defense in Experimental diabetes. Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal. 68(2): 109-114, 1996 (Abstract).

63- Christine C, Hawkins RE. The Estimation of Red Cell Superoxide Dismutase activity. Journal Laboratory Clinical Medicine 85(2): 337-341, 1975.

64- Yeh L, Asthan, MA. The Increase in Lipid peroxidation in Diabetic Rat Lens can be Reversed by Oral Sorbinil Metabolism, 39:619-622 1990.

65- Uzel N, Sivas A, Uysal M, Öz M. Erythracyte Lipid peroxidation and Glutathione Peroxidase Activities in Patients with Diabetes Mellitus. Hormmone and Metabolic Rescarch 19: 89-90, 1987.

66- Selvam R, Anuradha CV. Lipid peroxidation and Antiperoxidative Enzyme Changes in Erythrocytes in Diabetes Mellitus. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics 25: 268-272, 1988 (Abstract).

67- Mc Millan DE, Utterback NG, Puma JL. Reduced Erytrocyte Deformability in Diabetes. Diabetes 27: 895-901, 1978.

68- Kokatnur VR, and Jelling M. Iodometric determination of peroxygen in organic compoundsb American Chemical Society. 63: 1432-1433, 1941.

69- Sun Y, Oberlay LW, Li Y. A simple metod for clinical assay of superoxide dismutase. Clinical Chemistry 1988; 34:487-500.

70- Jain SK, Levine SN. Elevated Lipid Peroxidation Levels in Red Blood Cells of Streptozocin-Treated Diabetik Rats. Metabolism 39:971-975, 1990.

71- Jain SK. Hypergliycemia can Cause Membrane Lipid Peroxidation and Osmotic Fragility in Human Red Blood Cells. Journal of Biological Chemistry 264:21340-21245, 1989.

72- Hicks M, Delbridge L. Catalysis of Lipid Peroxidation by Glucose and Glycosylated Collagen. Biochemical and Biophysical Research Communication. 151:649-655, 1988.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
MERKEZİ