

T.C.  
İstanbul Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Biokimya Anabilim Dalı  
Danışman: Prof.Dr.Emine Kökoğlu

**STREPTOZOTOCİN (STZ) İLE OLUŞTURULAN BİR AYLIK  
DİABETİN SIÇAN BEYİN DOKUSUNUN AK VE GRİ  
MADDELERİNDEKİ SUPEROKSİD DİSMUTAZ ENZİMİ  
AKTİVİTELERİNE ETKİSİ**

111553

DOKTORA TEZİ

T.C.

Ahmet Belce  
Uzm. Arş. Grv.

İstanbul - 1992

## TEŞEKKÜR

İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı'nda uzmanlık ve doktora eğitimim süresince yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalı yöneticisi Sayın hocam Prof. Dr. Nevzat Baban'a;

Tezimin hazırlanmasında engin bilgi ve tecrübesi ile bana her konuda yardımcı olan tez yöneticim Biokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın hocam Prof. Dr. Emine Kökoğlu'na;

Uzmanlık ve doktora eğitimim sürecinde büyük katkıları olan Biokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma ;

Deney hayvanlarının temininde ve çalışmalarımnda her türlü yardımı esirgemeyen İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü Sayın hocam Prof. Dr. A.Sevim Büyükdevrim'e ve Müdür Yardımcısı Sayın hocam Doç. Dr. Tuncay Altuğ'a;

Doktora eğitimimi sürdürmemi destekleyen eşim Nimet (Sarıdere) Belce'ye teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

## K I S A L T M A L A R

SOD	: Superoksid dismutaz enzimi
Cu, ZnSOD	: Bakır ve çinko içeren superoksid dismutaz enzimi
Mn SOD	: Mangan içeren superoksid dismutaz enzimi
Fe SOD	: Demir içeren superoksid dismutaz enzimi
EC SOD	: Ekstrasellüler superoksid dismutaz enzimi
STZ	: Streptozotocin
AKŞ	: Açlık kan şekeri
ATP	: Adenozin trifosfat
NADP <sup>+</sup>	: Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	: Superoksid radikali
OH <sup>•</sup>	: Hidroksil radikali
HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	: Hidroperoksil radikali
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksid
GSSG	: Glutatyonun oksidlenmiş şekli
GSH	: Glutatyonun indirgenmiş şekli
CAT	: Katalaz enzimi
GP <sub>X</sub>	: Glutatyon peroksidaz enzimi
GR	: Glutatyon redüktaz enzimi
G6PDH	: Glukoz 6-fosfat dehidrojenaz enzimi

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b>	1
<b>GENEL BİLGİLER</b>	
Radikalın Tanımı	3
Radikallerin hücre içi kaynakları	4
Radikallerin biyolojik kaynakları	8
Radikal harabiyeti riski altındaki hücre komponentleri	11
Radikallerin etkilerine karşı hücreyi koruyucu enzimler	13
SOD enzimlerinin etki mekanizmaları	16
Katalaz	17
Glutasyon peroksidaz	17
Glutasyon redüktaz	18
Glukoz 6-fosfat dehidrojenaz	18
Radikallere karşı hücrenin antioksidan stratejisi	19
Oksijen radikalleri ve diabet	21
Superoksid dismutaz ve diabet	23
<b>GEREÇLER VE YÖNTEMLER</b>	
<b>GEREÇLER</b>	30
Kimyasal maddeler	30
Kimyasal çözeltiler	31
<b>YÖNTEMLER</b>	31
Kan şekeri tayini	31
SOD aktivitesinin tayini	33
Protein tayini	34
<b>BULGULAR</b>	36
<b>TARTIŞMA</b>	41
<b>ÖZET</b>	45
<b>SUMMARY</b>	46
<b>KAYNAKLAR</b>	47
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	72



## GİRİŞ VE AMAÇ

Radikal biyolojisi son yıllarda birçok yönleri ile dikkatleri üzerinde yoğunlaştırmıştır. Bir radikal 1,3,5 gibi tek sayıda elektron içeren herhangi bir molekül olarak tanımlanır. Hem organik ve hem de anorganik moleküller halinde bulunan radikaller oldukça reaktif özellik taşırlar. Organizmada normal metabolizmanın ürünleri şeklinde açığa çıkan radikaller ayrıca, organizmanın iyonize edici radyasyona, oksitleyici özellik taşıyan ajanlara ve doğal durumunda radikal metabolitleri oluşturabilen ksenobiyotiklere maruz kaldığı durumlarda da meydana gelirler. Canlılığın devamının zorunlu bir parçası olan oksijen radikalleri birçok enzimatik reaksiyon ve biyolojik fonksiyonlar için gereklidir. Ancak, herbir radikalin yapısı ve etkili olduğu yere göre hücrenel hedefler risk altındadır. Bu bakımdan, radikallerin hücrenel kaynakları, rol oynadıkları reaksiyonlar ve hücrenel savunma mekanizmalarının incelenmesi henüz açıklık getirilememiş bazı klinik durumların patojenezine ışık tutabilir kanısındayız.

Hücrelerde meydana gelen biokimyasal reaksiyonların çoğunda superoksid radikalleri oluşmaktadır. Superoksid radikalleri ve bu radikallerin reaksiyon ürünleri ileri derecede reaktif özellikte olduklarından eğer hücreden uzaklaştırılmazlarsa hücre bileşenlerinde çeşitli hasarlara yol açacaklardır. Oksijen radikallerine karşı savunma sağlayan küçük moleküller ve enzim sistemleri, radikallerin hücrede düşük konsantrasyonlarda kalmalarını sağlarlar.

Bu savunma mekanizmalarının aerobik hücrelerin canlılığını sürdürmede ne derecede kritik bir öneme sahip oldukları çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Söz konusu hücresel savunmada rol oynayan enzimlerden superoksid dismutaz (SOD), superoksid radikallerini hidrojen perokside dönüştürerek hücreden uzaklaştırır. Oluşan hidrojen peroksid, superoksid radikallerine göre daha az reaktif olmasına rağmen, hücre için halâ toksik etki göstermektedir. Bu da, detoksifikasyon mekanizması enzimlerinden katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin etkisiyle hücre için zararsız hale getirilir.

Superoksid dismutaz enziminin diğer birçok protein gibi gerek in vitro ve gerekse in vivo nonenzimatik glikasyona uğradığı ve Amadori ürünleri oluşturarak aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda diabetiklerde proteinlerin glikasyonu anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Proteinlerdeki reaktif amino gruplarının nonenzimatik glikasyonunun fizyolojik pH da radikal oluşum hızını yaklaşık elli kat hızlandırdığı gösterilmiştir. Oksijen radikalleri, glike proteinlerin moleküler oksijenle reaksiyonu sonucu meydana gelebilirler. Organizmada proteinlerin nonenzimatik glikasyonu sırasında oksijen radikallerinin meydana gelmesinin diabetin kronik komplikasyonlarına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

Yaptığımız araştırmada uzun süreli diabetin beyin dokusundaki SOD enziminin aktivitesi üzerine etkisini gösteren herhangi bir literatüre rastlamadık. Biz bu çalışmada Sprague Dawley straini sıçanları intrapenal streptozotocin (STZ) enjeksiyonu ile diabetik yaparak dört hafta sonra sakrifiye edip beyin dokusunda superoksid dismutaz enzimi aktivitesini ölçtük. Dört hafta süreli diabetin beynin ak ve gri maddelerinde bulunan superoksid dismutaz enziminin aktivitesini ne şekilde etkilediğini ve açlık kan şekerleri değerleriyle SOD enzimi aktiviteleri arasında bir korelasyon olup olmadığını saptamayı amaçladık.

## GENEL BİLGİLER

### Radikalin Tanımı

Anorganik kimya adlandırma komisyonu tarafından 1990 yılında önerilen tanıma göre bir radikal, bir ya da daha fazla sayıda ortaklanmamış elektron içeren atom veya atomlar grubudur (95). Birçok literatürde radikalin önüne getirilen « Serbest » sözcüğünün gereksiz olduğu bildirilmiştir (177). Radikal, formülünün sağ üst kısmına bir nokta işareti konularak belirtilir (Örn: HO<sup>•</sup>). Radikali belirten nokta işaretinden sonra yükü belirten işaret konulur (Örn: O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Superoksid radikali olarak bilinen O<sub>2</sub><sup>•-</sup> nin, dioksid ( 1- ) olarak adlandırılması önerilmiş olmasına rağmen superoksid teriminin kullanılmasına izin verilmektedir (95).

Radikaller hem organik ve hem de anorganik moleküller halinde bulunurlar ve oldukça reaktif özellik gösterirler. Normal metabolizmanın ürünleri şeklinde açığa çıkan radikaller, ayrıca organizmanın iyonize edici radyasyona, oksitleyici özellik taşıyan ajanlara (bazı antitümoral ilaçlara) ve ksenobiyotiklere maruz kaldığı durumlarda da meydana gelirler (164). Canlılığın devamının zorunlu bir parçası olan oksijen radikalleri çok sayıda enzimatik reaksi-



yon ve biyolojik fonksiyonları için gereklidirler. Ancak herbir radikalin yapısı ve etkili olduğu yere göre hücrenel hedefler risk altındadır. Bu nedenle radikallerin hücrenel kaynakları, rol oynadıkları reaksiyonlar ve hücrenel savunma mekanizmalarının incelenmesi henüz açıklık getirilememiş bazı klinik durumların patojenezine ışık tutabilir (81).

### **Radikallerin hücre içi kaynakları**

Bir molekül oksijenin tamamen indirgenebilmesi için dört elektron gereklidir. Bu indirgenme eğer tek değerli reaksiyon adımları yoluyla ilerlerse superoksid radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) gibi ara ürünler meydana gelir (50).

Aeorobik hücreler için radikallerin başlıca kaynağı moleküller oksijendir. Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ve aerobik hücrelerde enzimatik oksidasyon sırasında negatif yüklü bir ara ürün olan superoksid radikali açığa çıkar (139). Bu radikalin kendiliğinden ya da enzim katalizli dismutasyonu ile ikinci bir ara ürün olan  $H_2O_2$  oluşur (51).



Superoksid radikalının yer aldığı bir dizi reaksiyon sonucu, özellikle mitokondri içinde hidroksil radikali meydana gelir (135). Normal metabolizmanın yanı sıra hiperoksi, doku iltihabı ve radyasyonla artan oksijen metabolizması  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$  ve  $H_2O_2$  oluşumunu artırır (81). Tedavi amacıyla kullanılan birçok preparat, özellikle antineoplastik ajanlar ve aktiviteleri için kinon grupları ve bazı metaller gereksinim duyan antibiyotikler oksijen radikalleri açığa çıkarabilirler. Bu preparatların kemoterapötik etkilerinin ve sitotoksik yan etkilerinin çoğu oksijeni,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  ve  $OH^{\cdot}$  ye indirgeme özelliklerine bağlanmaktadır (80).

Organizmanın elektromanyetik radyasyona (x ışınları, gama ışınları) ve partiküllü radyasyona (elektronlar, protonlar, nötronlar, alfa ve beta partikülleri) maruz kalması sonucu primer radikaller açığa çıkar. Ayrıca fotokimyasal hava kirleri, hiperoksi, sigara dumanı, anestetikler ve genel olarak aromatik hidrokarbonlar gibi çeşitli çevresel ajanlar da radikallerin meydana gelmesine yol açarlar (113).

#### **Eksojen Kaynaklar**

Antineoplastik ilaçlar (doxorubicin)  
Paraquat  
Alloksan  
Oksidan ilaçlar (parasetamol, CCl<sub>4</sub>)  
Sigara dumanı  
İyonize edici radyasyon  
Güneş ışınları  
Isı şoku  
Glutatyonu oksitleyen maddeler

#### **Endojen Kaynaklar**

Mitokondriyal elektron transport zinciri  
Kloroplast " " "  
Oksidan enzimler  
İndolamin dioksijenaz  
Triptofan dioksijenaz  
Galaktoz oksidaz  
Siklooksijenaz  
Lipoksijenaz  
Monoamin oksidaz  
Fagositik hücreler  
Nötrofiller  
Monositler ve makrofajlar  
Eozinofiller  
Endotelial hücreler  
Otoksidasyon reaksiyonları (Örn: Fe<sup>+2</sup>, epinefrin)

---

Tablo 1. Radikallerin hücre içi kaynakları (27).



Çözünebilir özelliği olan ve nötral sıvı ortamda redoks reaksiyonlarına girebilen hücre bileşenlerinin çoğu hücre içinde radikaller oluştururlar. Bunlar arasında tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler ve tetrahidropterinler bulunur (117,125,9,43). Bu maddelerin tümü dioksijenin indirgenmesini sağlarken primer olarak superoksid radikallerinin meydana gelmesine neden olurlar. Radikal oluşturan enzimlere örnek olarak ksantin oksidaz, flavoprotein dehidrojenaz ve triptofan dioksijenaz verilebilir (52).

İzole edilmiş mitokondrilerle yapılan çalışmalarda, mitokondride meydana gelen radikallerin kaynağının, mitokondri iç membranında yer alan solunum zinciri olduğu anlaşılmıştır.  $O_2^{\cdot-}$  ve bunun dismutasyonundan oluşan  $H_2O_2$ , mitokondriyal oksijen tüketiminin yaklaşık olarak % 1-2 sini oluşturur (38,20). Sağlam mitokondri  $H_2O_2$  yi sitoplazmaya verebilirken  $O_2^{\cdot-}$  için durum farklıdır. Çünkü; mitokondriyal superoksid dismutaz enzimi, mitokondri içi  $O_2^{\cdot-}$  düzeyini düşük konsantrasyonlarda tutar ve bu nedenle mitokondriyal  $O_2^{\cdot-}$  ve  $H_2O_2$  gibi  $OH^{\cdot}$  da mitokondride oluşabilir (118).  $O_2^{\cdot-}$  oluşturan bir sistemin spontan olarak veya SOD enzimi kataliziyle  $H_2O_2$  oluşturması beklenir. Bazı oksidaz enzimler (2-hidroksi asid oksidaz ve ürat oksidazlar) direkt olarak  $H_2O_2$  oluştururlar. Bu yolla  $H_2O_2$  oluşumu birçok türün mitokondri, mikrozom, kloroplastlarında ve fagositoz yapabilen hücrelerinde saptanmıştır (139).

Aerobik hücrelerde oksijen konsantrasyonunun artmasıyla birlikte  $O_2^{\cdot-}$  oluşum hızı da artar (45,134). Fagositoz sırasında oksijen kullanımı arttığından oksijenden,  $O_2^{\cdot-}$  oluşumu ve dolayısıyla  $H_2O_2$  açığa çıkışı da artar (39).  $H_2O_2$ , membranları hemen hemen su molekülü kadar kolay geçebilir. Superoksid radikalleri de transmembran anyon kanalları ile hücre içine ulaşır (83). Fagositlerin oluşturduğu bu radikaller bakteri membranlarını harap ederek bazı bakteri şuşlarının öldürülmesinde etkin rol oynamaktadır (173). Bakteri membranları çok düşük konsantrasyonlarda çok doy-

mamış yağ asitleri içerirler. Bu nedenle burada etkili olan radikal,  $H_2O_2$  den çok yine  $O_2^{\cdot -}$  sisteminde oluşan  $OH^{\cdot}$  dir. Çünkü,  $OH^{\cdot}$  her tip organik molekülle yüksek bir hızda reaksiyona girer (183). Fagositoz sırasında oluşan radikaller, normal olarak hücre dışına bazen de endositik vakuollerin içine salınırlar (8).

Membrana bağlı siklooksijenaz tarafından araşidonik asidin enzimatik oksidasyonu ile radikaller açığa çıkar (112). Siklooksijenazın katalizlediği araşidonik asidin metabolizması sırasında oluşan radikalın  $OH^{\cdot}$  olduğu ve  $PGG_2$  üzerindeki hidroperoksidin parçalanması sonucu açığa çıktığı ileri sürülmektedir (40,79).

Endoplazmik retikulum ve nukleus membranında, membrana bağlı sitokromların oksidasyonu sonucu radikaller meydana gelirler. Oluşan radikaller hem organel içinde ve hem de sitozolde etkisini gösterebilirler. Endoplazmik retikulum ve nukleus membranları sitokrom  $P_{450}$  ve  $b_5$  içerdiklerinden doymamış yağ asitlerini, ksenobiyotikleri oksidleyebilir ve dioksijeni indirgeyebilirler (5,23). Ayrıca, flavoprotein içeren sitokrom redüktazlar da otoksidasyonla  $O_2^{\cdot -}$  ve  $H_2O_2$  oluştururlar (174). Sıçan karaciğer mikrozomlarında da  $OH^{\cdot}$  radikalinin oluştuğu saptanmıştır (81).

Peroksizomlar, hidrojen peroksidin hücredeki en önemli kaynağıdır. Peroksizomlarda bulunan D-aminoasid oksidaz, urat oksidaz, L-alfa hidroksi asid oksidaz enzimleri  $H_2O_2$  açığa çıkarıcı özelliğe sahiptirler (114).

Plazma membranı birçok nedenden dolayı, radikal reaksiyonları için kritik bir yerdir. Membranda bulunan fosfolipidler, glikolipidler, steroller, doymamış yağ asitleri ve kolayca okside olabilen amino asitleri içeren transmembran proteinleri, radikal harabiyetine açıktır. Ayrıca, radikallerin başlattığı lipid peroksidasyonu ya da membran yapısında bulunan proteinlerin oksidasyonu, transmembran iyon gradientinin bozulmasına, salgılama fonksiyonlarının



kaybına ve hücre içi metabolik olayların inhibisyonuna yol açabilir (81).

Radikallerin reaktif özelliği başlıca difüzyon mesafesi ile ilişkilidir. Örneğin;  $\text{OH}^\cdot$  son derece yüksek reaktif özellikte olduğundan, oluştuğu hücre bölümünden daha uzağa difüzyona gerek kalmadan derhal oluştuğu yerde reaksiyona girer. Ancak, bu difüzyon hücre içindeki SOD nin yüksek konsantrasyonları ile sınırlıdır. Böylece hücre içinde  $\text{O}_2^{\cdot -}$  konsantrasyonu  $10^{-11}$ -  $10^{-12}$  M arasında tutulur (138).  $\text{H}_2\text{O}_2$  ise mitokondriyal membranlar, peroksizomal membranlar ve plazma membranından kolayca difüzlenerak, toksik etkisini açığa çıktığı noktadan daha uzak hücre bölümlerinde gösterebilir (81).

### Radikallerin biolojik kaynakları

Radikallerin biolojik reaksiyonlarını genel bir başlık altında incelemek oldukça zordur. Çünkü organizmanın yaşam boyunca karşılaştığı radikal türleri sürekli olarak değişiklik gösterir. Bilindiği gibi bir ya da birden fazla tek sayılı elektron içeren bu radikaller, hücrede geçiş metallerinden oksijen türlerine elektron transferinden açığa çıkarlar. Daha sonra radikal reaksiyon dizileri başlar ki, bunlar atom transferlerini içerirler. Hücre içinde bir diğer önemli radikal reaksiyonu, doymamış bağlara (yağ asitleri ve aromatik halkalara) radikal katılmasıdır. Radikal reaksiyonları ilerleyerek hücre harabiyetle sonuçlanabilir. Bu tür reaksiyonlar bir reaksiyonlar dizisi halinde devam edebileceği gibi, radikal etkisini ortadan giderici moleküller tarafından sona erdirilebilirler(81).

Oksijen radikalleri; amino asitler, proteinler, lipidler, lipoproteinler, karbohidratlar ve nükleik asitler dahil tüm biokimyasal bileşiklere tersinir veya tersinmez olarak hasar verici etkiler yapabilirler. Bu radikaller aynı zamanda membran fonksiyonu, metabo-

lizma ve gen ifadesi gibi hücre aktiviteleri üzerine de etkilerini gösterebilirler (27). Oksijen radikalleri hücreler için ciddi tehdit oluştururlar ve büyük bir olasılıkla hücre ve doku hasarı, DNA modifikasyonu ve birçok hastalığın patojenezinden sorumlu olabilirler (24,27,53).

$\dot{O}_2^-$  radikali ve  $H_2O_2$  oluşumundaki artışlar direkt olarak hücre hasarına neden olabilirler. Bunlar uygun geçiş metalleriyle etkileşime girerek oldukça reaktif özellikte olan  $OH^\bullet$  ve diğer oksidan ürünleri meydana getirirler(37,64). Bu primer hasar NADH , indirgenmiş glutatyon ve ATP nin azalmasına ve sitozolik kalsiyum iyonlarının artmasına ve bunlarda sonuçta hücrede hasara neden olabilir (67).

$H_2O_2$  fazla reaktif özellikte olmamasına rağmen biyolojik membranları kolayca geçebilir. Yüklü olan  $\dot{O}_2^-$  nin membrandan geçebilmesi için membranda anyon kanallarına gereksinim vardır. Aksi takdirde  $\dot{O}_2^-$  nin membrandan geçişi daha yavaş olur (170,104). Eritrosit membranlarında böyle bir kanal olduğu biliniyor. Damar endotel hücrelerinde de  $\dot{O}_2^-$  için anyon kanalları bulunması mümkündür (104).

$H_2O_2$  nin hücreye ve organellere toksik etkisi farklı farklıdır. Bazı bakteriler ve hayvan hücreleri mikromolar düzeyde  $H_2O_2$  den zarar gördükleri halde, diğer bazı bakteriler ve fotosentez yapabilen algler önemli miktarlarda  $H_2O_2$  oluştururlar (139).

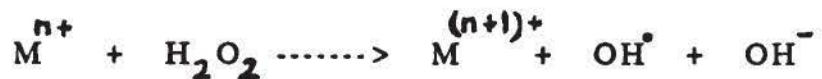
Sulu çözeltilerde  $\dot{O}_2^-$  ve  $H_2O_2$  nin reaktivitelerinin ılımlı olması nedeniyle hücreye hasar verici etkilerinin direkt olarak bunlar tarafından olmadığını düşündürmektedir. Bununla beraber  $\dot{O}_2^-$  nin dihidroasid dehidratazi ve kalp dokusundaki kreatin kinazı inaktive ettiği bildirilmiştir (99).  $H_2O_2$  ispanak kloroplastlarındaki fruktoz-bisfosfatazi inaktive eder ve hücrede ATP sentezi yapan enzimler üzerine bazı direkt etkisi olabilir (65). Bununla beraber genel ola-



rak hücrelere  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$ 'nin hasar yapıcı etkisi onların büyük bir olasılıkla çok daha reaktif ürünlere dönüşümü nedeniyle olmaktadır.  $O_2^-$ 'nin protonlanmasıyla hidroperoksil radikali ( $HO_2^\bullet$ ) oluşur, bunun herhangi bir biyolojik sistemde sitotoksik rolü olduğunu gösteren bir kanıt olmamasına rağmen,  $HO_2^\bullet$ 'nin potansiyel önemi şu iki faktörden ileri gelir: 1-  $HO_2^\bullet$ 'nin polaritesi  $O_2^-$ 'den daha azdır ve bu nedenle biyolojik membranları  $H_2O_2$ 'kadar kolayca geçebilir. 2-  $HO_2^\bullet$ ,  $O_2^-$ 'den daha reaktiftir ve  $O_2^-$ 'den farklı olarak yağ asitleriyle direkt olarak etkileşime girebilir.  $HO_2^\bullet$ 'nin etkisiyle esansiyel amino asitlerin peroksidlere dönüştüğü kanıtlanmıştır (15). Jessup ve arkadaşları tarafından  $HO_2^\bullet$ 'nin, LDL'nin lipid komponentlerinin peroksidasyonunu başlatabileceği önerilmektedir (13).

Su molekülü yüksek enerjili iyonizan ışınlar maruz bırakıldığında  $OH^\bullet$  oluşur.  $OH^\bullet$  oldukça reaktif özellikte olup oluştuğu yerde veya oluştuğu yere yakın kısımlarda hızla reaksiyona girer (156). Bu nedenle hücre hasarının tipi bu radikalın oluşum yerine bağımlı olacaktır. Örneğin; DNA ya yakın  $OH^\bullet$  oluşumu, pürin veya primidinlerin modifikasyonuna veya DNA ipliklerinin kırılmasına neden olur.  $OH^\bullet$ 'nin biyolojik bir molekülle reaksiyonu daha az reaktif özellikte başka bir radikal oluşturabilir. Bunlarda oluşum yerinden daha uzaklara difüzlenerak spesifik biomoleküllerle reaksiyona girebilirler. Örneğin;  $OH^\bullet$  ile ürik asidin reaksiyona girmesi, LDH enzimini  $OH^\bullet$ 'nin inaktive edici etkisine karşı korur fakat maya alkol dehidrojenazının inaktivasyonunu artırır (88).

İyonizan ışınlar aşırı maruz kalınmanın dışında organizmada oluşan  $OH^\bullet$ 'nin çoğu  $H_2O_2$ 'nin metale bağımlı yıkılımıyla oluşur :

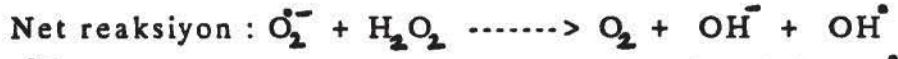
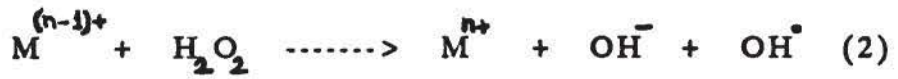
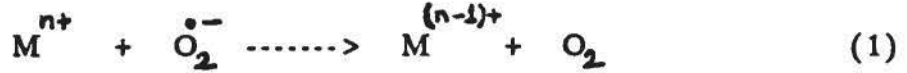


Bu reaksiyonda  $M^{n+}$ , metal iyonu olup titan (III), demir (II) veya kobalt (II) olabilir (62,127). Fe (II) ye bağımlı  $H_2O_2$  yıkılımıyla  $OH^\bullet$  oluşumu Fenton reaksiyonu olarak bilinir (64,68).





Metal iyonları ve kompleksleri tarafından katalizlenen Haber - Weiss reaksiyonu ile  $\text{OH}^\bullet$  oluştuğuna inanılmaktadır (19,31,44,66,97).



$\text{O}_2^{\bullet-}$  nin SOD tarafından dismutasyonu, sitotoksik  $\text{OH}^\bullet$  oluşumu önlenebilmektedir (59).

### Radikal harabiyeti riski altındaki hücre komponentleri

1- Proteinler : Sulu fazda radikal oluşturan sistemlerin proteinler üzerine etkileriyle ilgili çok sayıda literatür yayınlanmıştır (8,33,36,56,158,185,187). Lipid radikallerinin proteinler üzerine hasar yapıcı etkilerinin olabileceği de bilinmektedir (34). Membran bileşenlerinden monoamin oksidaz ve membran transport proteinlerine radikallerin hasar yapıcı etkileri çok önemlidir (36,146). Roger T. Dean ve arkadaşlarının elde ettiği bulgulara göre proteinler üzerine radikallerin etkileri, radikallerin oluşum yerine, hedef moleküllere ve antioksidanlara bağlıdır (35). Örneğin: Lipid peroksidasyonuna yol açan radikaller membranların veya lipoproteinlerin hidrofobik kısımlarının proteinleri üzerine etkili olabilirler (36,77). Hidrofilik radikaller, çözünür haldeki veya membrana bağlı proteinlerin üzerine daha etkilidirler (35). Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin ve sistein gibi amino asitleri içeren proteinler radikallerden kolayca etkilenirler. Gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz gibi aktiviteleri yukarıdaki amino asitlere bağımlı olan enzimler radikaller tarafından inhibe edilirler (21). Sitoplazmik proteinler ve membran proteinleri de oksidan ajanlara maruz

kaldıklarında radikallerle proteinlerin amino asid kalıntıları arasında tersinmez reaksiyonlar meydana gelir. Prolin ve lizin amino asidleri ile protein yapısını oluşturan peptid bağları da oksijen radikallerinden etkilenebilir. Bu radikallerin etkisiyle, prolin ve lizin hidroksilasyonu nonenzimatik olarak meydana gelebilir (178).

Proteinlerin, radikallerin hasar yapıcı etkilerinden ne derecede etkileneceği onların amino asid içeriklerine bağlıdır. Proteinin hücresel lokalizasyonuna ve radikalın sitotoksik gücüne göre protein harabiyetinin boyutları değişebilir (81).

**2- Nükleik asitler ve DNA :** İyonize edici ışınların etkisi ile oluşan radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar (16,19). Sitotoksik etki ya nükleik asitlerdeki bazların modifikasyonuna ya da DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır (179).

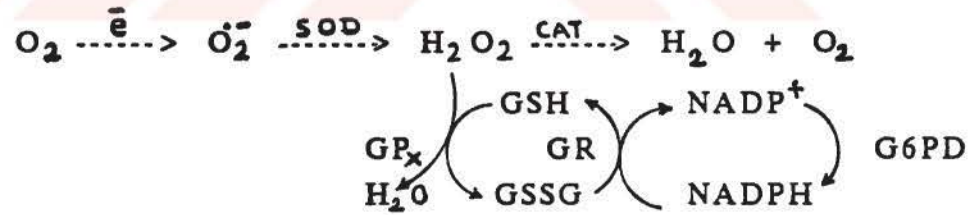
**3- Membran lipidleri :** Membran kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyon oluştururlar. Lipid peroksidasyonu sırasında çok doymamış yağ asitleri hidrojenini kaybeder ve moleküler oksijenle reaksiyona girer. Bazı metallerin varlığında peroksidasyonun şiddeti artırılabilir (168). Membranın hidrofobik çevresinde,  $O_2^-$ 'nin özellikle protonlanmış şekli olan  $HO_2^-$ , lipid peroksidasyonunu başlatarak ciddi hasara yol açar (42). Lipid radikallerinin hidrofobik yapıları nedeniyle reaksiyonlarının önemli kısmı membrana bağlı moleküller ile meydana gelecektir. Lipid peroksidasyon ürünlerinden malondialdehid, membran komponentlerinde çapraz bağlanma ve polimerizasyona yol açarak esneklik, iyon transportu, enzim aktivitesi gibi intrinsik membran özelliklerine sahip olduğu için DNA'nın azotlu bazlarıyla da reaksiyona girebilir. Bu özellikleri ile malondialdehit mutajenik, kültür hücreleri için ise genotoksik ve karsinojendir (128). Plazma membran lipidlerinin peroksidasyonu sonucu hücre permeabilitesinde değişiklikler meydana gelir (162).



**4- Sitozolik moleküller :** Sitozoldeki proteinler radikallerin etkisiyle değişime uğrarlar. Hemoproteinler (Örn: Oksihemoglobin),  $O_2^-$  nin ya da  $H_2O_2$  nin demir (II) ile reaksiyonu sonucu methemoglobine dönüşür (182). Bir diğer önemli sitoplazmik hemoprotein olan katalaz,  $O_2^-$  tarafından inhibe edilir (93).  $O_2^-$  nin dismutasyon ürünü olan  $H_2O_2$ , Cu,ZnSOD enziminin +2 değerli bakırını +1 değerliğe indirgeyerek enzimi inhibe edebilir (72).

### Radikallerin etkilerine karşı hücreyi koruyucu enzimler

Aerob hücrelerin tümünün, serbest radikallerin oluşumunu en az düzeye indirecek ya da alternatif olarak serbest radikaller oluşur oluşmaz bunları hızla parçalayacak koruyucu mekanizmalar geliştirdiklerini biliyoruz (41). Hücreyi radikallerin zararlı etkilerinden koruyan antioksidan enzim sistemi Cu, ZnSOD, MnSOD, katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve glukoz - 6 - fosfat dehidrojenazdan (G6PD) ibaretdir. Bu enzim sisteminin koruyucu fonksiyonu aşağıda gösterilmiştir (164).



**1- Superoksid dismutaz :** SOD (EC 1.15.1.1.) ilk olarak 1969 da McCord ve Fridovich tarafından bulunan bu enzim iki molekül superoksid anyonunu dismute ederek  $H_2O_2$  ve  $O_2$  oluşturur (101,184).



**Şekil 1.** SOD enzimlerinin katalizlediği reaksiyon (101).

SOD enziminin aerob hücrelerin tümünde bulunduğu fakat

anaerobların çoğunda bulunmadığı bilinmektedir (154,120). Çünkü enzimin fizyolojik fonksiyonu aerob metabolizma reaksiyonları yoluyla oluşan superoksit anyonu radikallerinin hasar yapıcı potansiyel etkilerine karşı hücreyi korumaktır (147,100). Fridovich ve arkadaşları SOD enziminin aerob hücrelerin yaşamı için gerekli olduğunu gösteren daha ileri kanıtlar bulmuşlardır (1).

Bugüne kadar SOD enziminin dört farklı izozimi bulunmuştur (48). Bunlardan biri, ökaryotların hücre sitozolünde ve membranlar arası boşlukta bulunan bakır ve çinko içeren SOD enzimi (Cu, ZnSOD) dir (137).

Ekstrasellüler sıvılarda Cu, ZnSOD nin farklı bir formu bulunur ve EC-SOD olarak adlandırılmıştır (109,111).

Mn içeren iki tür SOD enzimi vardır. Bunlardan biri mitokondri matriksinde bulunur ve diğeri E.Coli ve Streptococcus mutans gibi bakterilerin matriksinde bulunur (82,181,189). FeSOD ise aerobik bakterilerin çoğunda bulunur (164). FeSOD ve MnSOD nin amino asit dizilişleri benzerdir. Fakat Cu, ZnSOD ninkinden oldukça farklıdır (10) Cu, ZnSOD enzimi hücrenin daha çok sitoplazmasında bulunur oysa MnSOD enzimi daha çok mitokondri matriksinde bulunur (152).

Prokaryotlarda FeSOD ve MnSOD enzimleri bulunur. Molekül ağırlığı 39 bin olan FeSOD molekül başına +3 değerlikli bir demir iyonu içerir ve birbirine eşit iki alt birimden ibarettir. Matriksde bulunan ve molekül ağırlığı 40 bin olan MnSOD iki alt birim içerir. Genel olarak FeSOD konstitutif bir enzimdir, MnSOD ise indüklenebilir bir enzimdir (164).

Ökaryotlarda Cu, ZnSOD, MnSOD ve EC-SOD enzimleri bulunur. Molekül ağırlığı 32 bin olan Cu, ZnSOD iki alt birimden ibarettir. EC-SOD molekül ağırlığı 135 bin olan, bakır ve çinko içe-



ren bir enzimdir. EC-SOD birbirine nonkovalan olarak bağı birbirinin aynı olan dört alt birimden meydana gelmiştir (110). Ökaryotlardaki mitokondriyal MnSOD enzimi ise her birinin molekül ağırlığı 21.500 Dalton olan ve benzer dört alt birim içeren tetramerdir (159).

İnsanda Cu, ZnSOD ve MnSOD enzimlerini kodlayan genler sırasıyla 21q 21.1 ve 6q 21 numaralı kromozomlarda bulunurlar (115).

SOD enziminin bütün izozimlerinde enzimin aktif merkezindeki metalin kelat yapıcı ajanlar kullanılarak uzaklaştırılması katalitik aktivitenin kaybına yol açmakta, metalin tekrar sağlanmasıyla aktivite yeniden kazanılmaktadır (49).

SOD son derecede stabil bir enzimdir. İzolasyon işlemi sırasında enzim, hemoglobinin denatüre olduğu koşullarda kloroform ve etanolla muamele edildiğinde bozunmamaktadır. İzolasyon işleminin diğer safhasında, dipotasyum fosfat ilave edilerek alkolden zengin faz çözünür. Enzim aktivitesi organik fazda bulunur, bu aktivite asetonla presipitasyon işleminden sonra yeniden kazanılmaktadır. Bu durum enzimin olağanüstü bir çözünürlük özelliği olduğunu göstermektedir (85).

Bovin SOD enzimi 100 °C de 30 saniye tutulursa tamamen inaktive olmaktadır. Oysa, pH'ı 7,8 olan 0.1 mM EDTA içeren fosfat tamponunda 75 °C de 6,5 dakikada enzim aktivitesinin yarısını kaybetmektedir (119).

Cu, ZnSOD enzimi siyanür tarafından inhibe olmaktadır. MnSOD enzimi ise siyanüre karşı dirençlidir (161). FeSOD enzimi daha çok prokaryotlarda bulunur ve siyanüre dirençlidir (32). Doğu ekstraktlarındaki Cu, ZnSOD enzimi aktivitesi, 5 mM siyanür tarafından spesifik olarak inhibe edilebilmektedir (190).

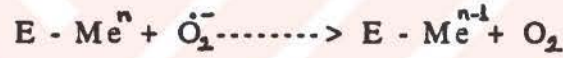


Hidrojen peroksid Cu, ZnSOD enzimi ile FeSOD enzimini inaktive etmektedir fakat MnSOD enzimi üzerine bir etkisi yoktur (4,73,169).

### SOD enzimlerinin etki mekanizmaları

Fridovich ve arkadaşları SOD enzimlerinin farklı metaller içeren metaloproteinler olduklarını göstermişlerdir (101). Cu,Zn-SOD enzimi örnek olarak ele alınırsa, bakır katalitik rol oynar, oysa çinko esas olarak yapısal bir rol oynar (50).

SOD enzimlerinin etki mekanizmalarının Şekil 2'deki gibi olduğu yapılan araştırmalarla gösterilmiştir.



E = Enzim

Me = Metal

### Şekil 2- SOD enzimlerinin etki mekanizmaları (50)

Superoksid radikalinin dismutasyonu reaksiyonunda denge ürün oluşumu yönündedir (96).

Superoksid radikali moleküler oksijen ve hidrojen peroksida göre stabil değildir (50). Sulu ortamda kendiliğinden ve oldukça hızlı bir şekilde dismutasyona uğrayarak oksijen molekülü ve hidrojen peroksid oluşturur. Bu reaksiyon için pH 7,12'de hız sabiti

$$k = 2, 1.10^5 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1} \text{ dir (151).}$$

SOD enzimi varlığında superoksid radikalinin dismutasyonu oldukça hızlıdır ( $k = 2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ ) (89,150). Bu hız sabiti değeri difüzyon limitine yakındır, oldukça düşük bir aktivasyon enerjisi gösterir ve çözgenin viskozitesinin artmasıyla azalır (50).

**2- Katalaz : CAT (EC 1. 11. 1. 6)** bilinen en eski enzimlerdendir. 1901 yılında Loew tarafından bu ad verilmiştir (141). Enzim,  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$  reaksiyonunu katalizler. Aerobik hücrelerin çoğunda katalaz enzimi bulunur. Katalaz hayvanlarda organların çoğunda özellikle de eritrositlerde ve karaciğerde bol bulunur. Hücre alt fraksiyonları düzeyinde katalaz peroksizomlarda % 80 oranında, sitozolde ise yaklaşık % 20 oranında bulunur. Molekül ağırlığı 240 bin olup dört alt birimden ibarettir. Herbir alt birim aktif merkezine bağlı bir hem grubu içerir. Molekülün alt birimlerine ayrılması enzim aktivitesinin kaybına neden olur. İnhibitörler, azid, siyanür, 3-amino- 1,2,4- triazol, indirgenmiş glutatyon (GSH) ve ditiyotreitoldür (165).

Kono ve Fridovich superoksid radikallerinin katalazı inhibe ettiğini bildirmişlerdir (93).  $\text{H}_2\text{O}_2$  nin katalazı inhibe ettiği uzun zamandan beri bilinmektedir. NADPH nın  $\text{H}_2\text{O}_2$  tarafından katalazın inaktivasyonunu önlediği gösterilmiştir (86). İndirgenmiş glutatyonun (GSH) katalazı dozaja bağımlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (165). İnsanda katalazı kodlayan gen 11p 13 numaralı kromozomda bulunur (115).

**3- Glutatyon peroksidaz : GP<sub>x</sub> (EC 1.11. 1.9)** 1957 yılında Mills tarafından bulunmuştur (124). GSH nın GSSG ye oksidasyonunu  $\text{H}_2\text{O}_2$  yi harcayarak katalizler.



Enzimin aktivitesi selenyuma bağımlı olan ve olmayan iki şekli vardır. Selenyuma bağımlı GP<sub>x</sub> ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve organik hidroperok-

sidlere karşı çok yüksek bir aktivite gösteren bir tetramerdir. Aktif merkezde molekül başına bir selenosistein kalıntısı içerir. Sitozolde yaklaşık % 70 oranında, mitokondride ise % 30 oranında bulunur. İnhibitörleri, iodoasetat, siyanür ve  $O_2^-$  dir (17,84). Aktivitesi selenyuma bağımlı olmayan  $GP_x$  enzimleri GSH S-transferazlardır (GST, EC 2.5. 1. 18). Bu enzimler merkapturik asidlerin oluşumunda ilk adımı katalizleyen enzimler olarak saptanmışlardır (18). Molekül ağırlığı 50 bin olan ve yedi farklı alt birim içeren dimerlerdir, enzimin 8 izozimi vardır. Organik hidroperoksidlere karşı düşük aktivite gösterirler fakat  $H_2O_2$  ye karşı hiç aktivite göstermezler. Enzimin birçok fonksiyonu olup en önemlileri ksenobiyotiklerin biotransformasyonu ve karsinojenlerin detoksifikasyonundaki fonksiyonlarıdır (84,160). Hücrenin mitokondri ve sitozolünde bulunur. Aktiviteleri selenyuma bağımlı ve bağımsız  $GP_x$  enzimlerini kodlayan genler insanda sırasıyla 3p 13 - a 12 ve 6p 12.2 numaralı kromozomlarda bulunur (115).

4- Glutatyon redüktaz : GR (EC 1.6.4.2). İlk olarak 1931 de Hopkins ve Elliott tarafından bulunmuştur (74). 1932 de Mann tarafından koyun ve tavşan karaciğerinden izole edilmiştir (107).



reaksiyonunu katalizler. Molekül ağırlığı yaklaşık 120 bin olan ve aktif merkezinin her biri FAD içeren iki alt birimden ibaret bir enzimdir. Sitozol ve mitokondride bulunur. İnhibitörlerinden biri 1,3 - bis - 2 kloroetil - 1 - nitrozüredir (145). İnsanda GR enzimini kodlayan gen 8p 21.1. numaralı kromozom üzerinde bulunur (115).

5- Glukoz - 6 - fosfat dehidrojenaz : G6PD (EC: 1.1.1.49) enzimi :  
Glukoz - 6 - fosfat +  $NADP^+$  -----> 6 - fosfoglukolakton + NADPH +  $H^+$



reaksiyonunu katalizler. Glukoz - 6 - fosfatın oksidasyonu için direkt oksidasyon yolu ilk olarak 1936 da maya ekstraktlarında gösterilmiştir. Oysa G6PD nin saflaştırılması 1961 yılına kadar gerçekleştirilememiştir. pH 7 - 8 de ve iyonik kuvvetin 0,1 olduğu koşullarda insan eritrositlerinde bulunan G6PD enzimi molekül ağırlığı 210 bin olan bir tetramer ile molekül ağırlığı 105 bin olan dimer şekli arasında hızlı bir dengede bulunur. Alt birimlerin yükleri benzerdir. Enzim kelat yapıcı ajanlar (özellikle p - kloromerküri benzoat gibi sülfidril grubu inhibe edici ajanlar) ve steroid hormonlar tarafından inhibe edilir. İnsanda bu enzimi kodlayan gen XQ28 numaralı kromozomda bulunur (115).

### **Radikallere karşı hücrenin antioksidan stratejisi**

Eksojen uyarılara yanıt olarak hücre içinde oksidan özellikte maddelerin oluşumu ve bunların hücre hasarı oluşumundaki rolleri incelenmiştir. Yapılan çalışmalarla endotel hücrelerin  $\dot{O}_2$  ve  $H_2O_2$  oluşturabildiği kanıtlanmıştır (149). Eksojen oksidanların hücreye uygulanmasından önce antioksidan maddeler verilerek çeşitli çalışmalar yapılmıştır (11,12,47). İn vivo ve in vitroda, SOD ve katalaz enzimlerinin fosfolipid veziküller içinde hücre membranlarıyla füzyonu sağlandığında oksidanların indüklediği hasar yapıcı etkiye karşı direncin artmış olduğu saptanmıştır (11,46,47,172). Bu enzimler polietilen glikol ile modifiye edilerek uygulandığında hücre membranlarından SOD ve katalazın alınımı artmış bulunmuştur (11,12). Enzim modifikasyonu işleminin hücre membranının permeabilitesini değiştirebileceği düşünülerek, sıçan pulmoner arter endotel hücreleri modifiye edilmemiş SOD ile inkübe edilmiştir. SOD ile inkübasyon sonucu hiperoksi ve ksantin oksidazın indüklediği hasar yapıcı etkiye karşı hücresel direncin arttığı saptanmıştır (108).

Oksijen radikallerine karşı başlıca iki antioksidan strateji önerilmektedir : 1-  $\dot{O}_2$  ve  $H_2O_2$ ; SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz gi-

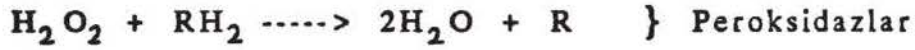
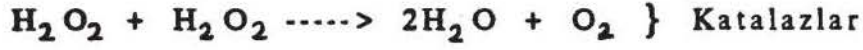
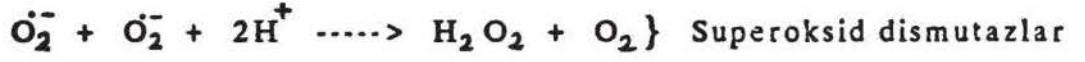
bi enzimlerin in vivoda aktiviteleri artırılarak veya bu enzim dışarıdan verilerek zararsız hale getirilir (46). Örneğin; SOD nin iskemini yol açtığı hasara karşı koruyucu olamamasına rağmen, iskeми sonrası reperfüzyon hasarına karşı koruyucu özelliğini etkili olduğu görülüyor (116). 2- Radikallerin oluşumu önlenir. Örneğin; iskeми-reperfüzyon çalışmalarında ksantin oksidaz allopurinol tarafından inhibe edilerek oksijen radikalleri oluşumu büyük ölçüde engellenmektedir (116,126). Steroid yapıli olmayan bazı antienflamatuar ilaçlar fagositler tarafından oksijen radikali oluşumunu baskılayabilirler (16).

Superoksid radikalinin dismutasyonuyla oluşan hidrojen peroksid, superoksid radikaline göre daha az reaktif bir moleküldür. Fakat hücre için hala toksik etkilidir. Çünkü, hidrojen peroksid, superoksid radikali ile ya da + 2 değerlikli demir iyonlarıyla reaksiyona girerek ileri derecede reaktif olan serbest hidrosil radikali oluşumuna yol açabilir (50). Oluşan hidrojen peroksida karşı ikinci enzimatik savunma sistemi, katalaz ve glutatyon redüktaz : glutatyon peroksidaz enzimleriyle sağlanır (60).

Katalazlar hidrojen peroksidi su ve moleküler oksijene parçalarlar, peroksidazlar ise hidrojen peroksidi indirgeyerek suya dönüştürürler (50). Peroksidazların hidrojen peroksida etki edebilmesi için bir ko-substrata ya da hidrojen vericisine gereksinim vardır. Bu maddeler, glutatyon, askorbik asid ya da sitokrom c gibi fizyolojik indirgenler olabilir (41).

Superoksid dismutazların, katalaz ve peroksidaz enzim sistemleriyle beraber oksijenden türeyen radikallerin toksik etkilerine karşı aerob hücreleri korudukları düşünülmektedir (Şekil 3) (122).





**Şekil 3-** Oksijenin indirgenmesiyle oluşan ara ürünlere karşı enzimatik savunma sistemleri.

Superoksid anyonu ve hidrojen peroksidin etkili bir şekilde hücreden uzaklaştırılması hidroksil radikalinin oluşumunu önleyecektir. Son derece de reaktif bir radikal olan hidroksil radikalinin oluşmasının önlenmesi çok önemlidir. Çünkü, bu radikal birçok madde ile hızla reaksiyona girer, ayrıca hidroksil radikalini uzaklaştırabilecek bir enzimatik savunma sistemi hücrede bulunmamaktadır (50).

### Oksijen radikalleri ve diabet

Tip 1 diabetin patojenezinde pankreas  $\beta$  - hücrelerinin kaybına Langerhans adacıklarına yoğun lenfosit ve monosit infiltrasyonu eşlik eder (İnsulitis). Hayvan modellerinde insulitis önce makrofajların, sonra T lenfositlerin en sonunda da B lenfositlerin infiltrasyonu ile karakterizedir (69). Makrofajlar muhtemelen  $\beta$  - hücrelerin harabiyetine katkıda bulunurlar (69,92). İn vitroda, aktive olmuş makrofajlar adacık hücreleri üzerine sitotoksik etkilidir. Bu bulgular makrofaj ürünleri olan interlökin - 1 ve tümör nekroze edici faktörün beta hücreleri üzerinde hasar yapıcı etkileriyle ilgili raporlarla uyumludur (106,144).

Sumoski ve arkadaşları sitokinlerin sıçan pankreas adacık hücreleri üzerine hasar yapıcı etkilerinin radikallerin etkisini giderici maddeler tarafından inhibe edildiğini göstermişlerdir. Bu araştırmacılar tip 1 diabette adacık hücrelerine infiltre olan makrofaj

ve lenfositlerin sitokin ürünlerinin, adacık hücrelerinde oksijen radikalleri oluşumunu indüklemesinin  $\beta$  - hücrelerindeki hasara katkıda bulunabileceğini öneriyorlar (163) Nerup ve arkadaşları interleokin-1'in sitotoksik bir ajan olduğunu ve bu ajanın etkisinin  $\beta$  - hücrelerinde endojen oksijen radikalleri oluşturması yoluyla olduğunu öneriyorlar (132). Prowse ve arkadaşları da immunolojik bir enfeksiyon prosesi yoluyla olan otoimmün adacık hasarında, adacıkların harabiyetinin primer nedeninin  $\text{OH}^\bullet$  etkisiyle olduğunu öneriyorlar (143).

Iancu ve arkadaşları radikallerin etkisini nonenzimatik bir yolla giderici özelliği olan 3 - aminobenzamid, N -asetil - DL - homosistein tiolakton ve ebselen gibi bazı eksojen ajanları yüksek dozlarda vererek beta hücrelerini immun harabiyetten kurtarabileceklerini düşünerek yaptıkları çalışmalardan olumlu bir sonuç alamamışlardır (42).  $\beta$  - hücrelerinin radikallerin etkisini giderebilme kapasitesinin düşük olmasının bu hücrelerin STZ ve alloksanın toksik etkilerine ve de makrofajların etkisine karşı hassas olmasına neden olduğu ileri sürülüyor (105).

STZ ve alloksan deneysel diabet çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Çünkü bu ajanlar nisbeten seçimli olarak pankreasın  $\beta$ -hücrelerini tahrip ederler. Bu ajanların  $\beta$  - hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin superoksid radikalleri oluşturması yoluyla olduğu alloksan için açık bir şekilde gösterilmiştir (25). Elde edilen sonuçlar alloksan ve STZ nin  $\beta$  - hücreleri üzerine toksik etkisinin oksijen radikalleri yoluyla olduğu ve oksijen radikallerinin hasar yapıcı etkisinden özellikle  $\beta$ -hücrelerinin etkilenebileceği hipotezlerini desteklemektedir (54). Alloksan, oksijen radikalleri yoluyla adacık hücrelerini harap edici etkisine ek olarak adacık hücreleri dahil diğer dokulardaki Cu,ZnSOD aktivitesini de inhibe edebilir (29).



## Superoksid dismutaz ve diabet

Glukoz nonenzimatik olarak proteinlerin amino gruplarıyla yavaşça kondanse olarak önce bir Schiff bazı oluşturur. Daha sonra Amadori ürünü meydana gelir. Amadori ürününden  $\alpha$ -keto aldehid bileşikleri olan 1 - ve 3 - deoksiglukozonlar meydana gelir. Bu sekonder bileşikler proteinlere karşı esas monosakkarid molekülünden daha fazla reaktif özelliktedir ve proteinlerle çapraz bağlar oluşturarak ileri glikasyon son ürünleri meydana getirirler (121,133).

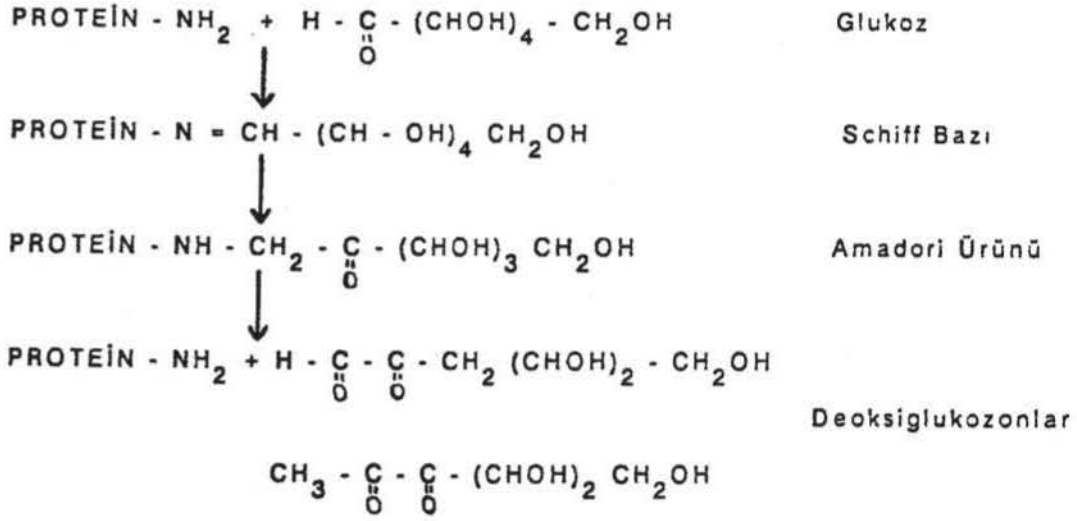
Nonenzimatik protein glikasyonu bir posttranslasyonel protein modifikasyon reaksiyonudur (2). Nonenzimatik glikasyon sonucu proteinlerin büyüklük, şekil, viskozite, yük durumu, çözünürlük, molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlanma, ısı ve enzimlere karşı dayanıklılık gibi yapısal özelliklerinin ve fonksiyonlarının değişime uğradığı in vivo ve in vitro çalışmalar ile saptanmıştır (87).

Proteinlerin çoğu in vitro da glukozla inkübe edildiğinde modifiye olurlar. Örneğin albumin, konformasyonel değişime uğrar ve ligand bağlayıcı özelliği azalır. Benzer şekilde SOD, in vitro da glukozla maruz bırakıldığında aktivitesini kaybeder (2,3).

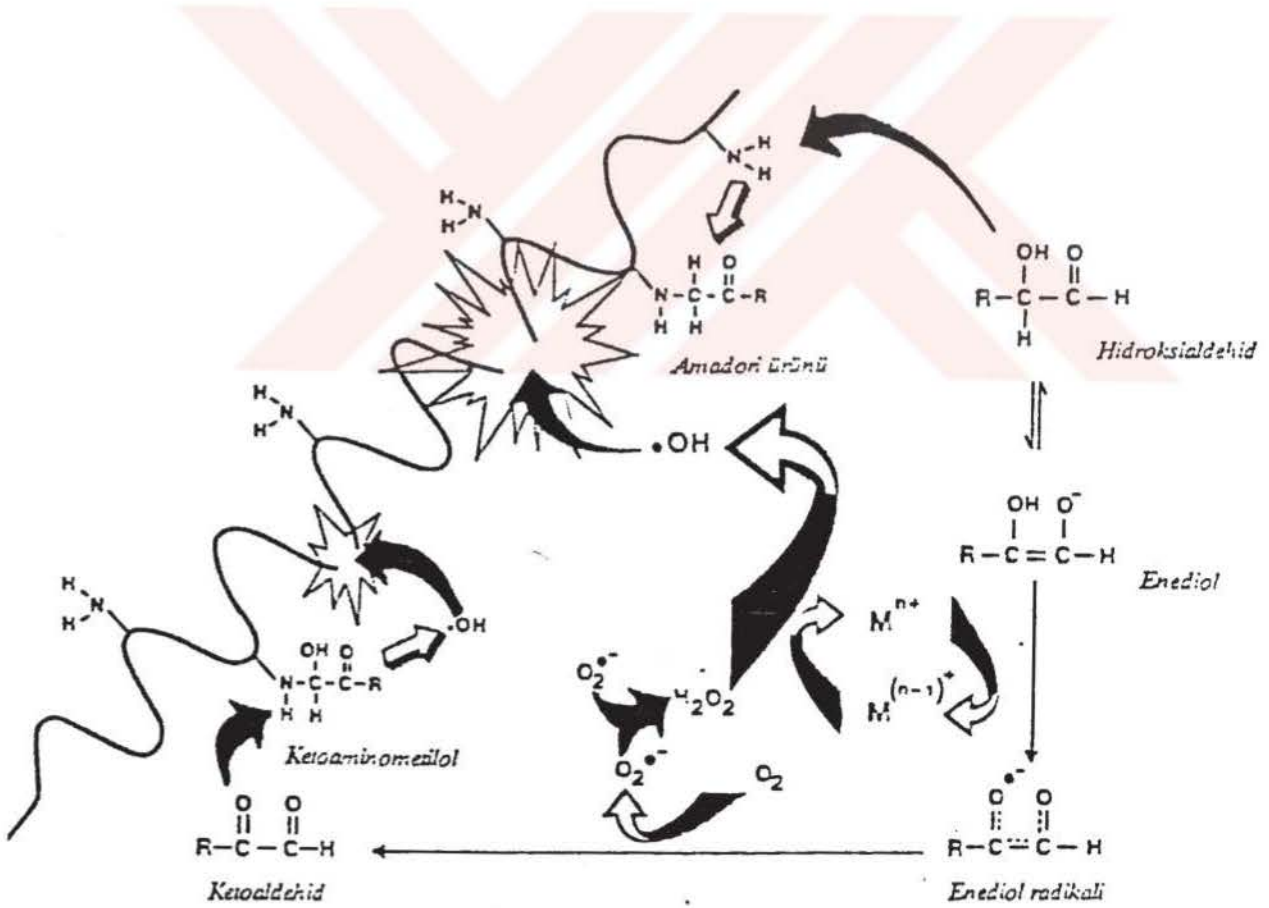
Bazı D - şekerler L - Lizin veya L - Argininle 10 gün boyunca inkübe edildiğinde oluşan bileşiklerin nitrobluetetrazoliumu (NBT) indirgemesi ve bunun SOD tarafından engellenmesi inkübasyon sonucu oluşan Amadori bileşikleri tarafından superoksid radikalleri oluşumunu göstermektedir (6).

İnsan eritrositlerinde Cu,ZnSOD nin glike ve glike olmamış formlarının var olduğu gösterilmiştir (1,2). Yaşlı eritrositlerde ve diabette Cu,ZnSOD nin glike formunun yüzdesi,enzimin glike olmamış formuna göre daha yüksek bulunmuştur (1,2,3). Glike Cu,ZnSOD yüzdesi özellikle diabetin komplikasyonlarının ortaya çıkmış





Şekil 4. Proteinlerin nonenzimatik glikasyonu reaksiyonu (188).



Şekil 5. Glukozun otoksidasyonunun ve hidroksil radikali oluşumunun glukozun indüklediği protein hasarına katkısı (75).



olduğu hastalarda yüksek bulunmuştur (171).

Boronat afinite kromatografi kolonunun yıkanmasıyla elde edilen glike olmamış Cu,ZnSOD in vitroda radyoaktif D-glukozla veya radyoaktif olmayan D-glukozla inkübe edildiği zaman, D-glukozun enzimin glikasyonuna neden olduğu ve bunun da enzim aktivitesinde azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. SOD nin glikasyona uğradığı kısımların zıt fazlı yüksek performans sıvı kromatografisinden sonra amino asid analiziyle identifikasyonu yapılmıştır (1).

Cu,ZnSOD, in vitro ve in vivo glikasyonla Amadori bileşikleri oluşturarak aktivitesini kaybeder. Cu,ZnSOD nin lizin kalıntılarından Lys - 122 ve Lys - 128 molekülün yüzeyinde lokalize olmuş primer glikasyon kısımlarıdır. Bu kısımlar enzim aktivitesinde esas rol oynayan ligand bağlayan aktif kısım üzerinde lokalize olmuştur (171). Tip 1 diabetik çocukların eritrositlerinde SOD, peroksidaz ve katalaz enzimlerinin aktiviteleri ölçülerek, sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre hastalığın süresinin genel olarak SOD aktivitesini etkilediği, katalaz aktivitesini çok az etkilediği, peroksidaz aktivitesini ise etkilemediği görülmüştür. Ayrıca eritrosit SOD aktivitesinde azalma, katalaz ve peroksidaz aktivitelerinde ise genel olarak bir artış saptanmıştır. Watala C. ve arkadaşları peroksidaz aktivitesindeki artışın, eritrosit SOD aktivitesindeki azalmayı kompanse etme mekanizmasının artması nedeniyle olabileceğini ileri sürmektedirler (180). Tip 2 diabetiklerin eritrositlerinde de SOD aktivitesinde ileri derecede anlamlı bir azalma olduğu ve bu azalmanın radikal aktivitesindeki artışla uyumlu olduğu gösterilmiştir (70).

Araştırmacılar diabetik hastaların eritrositlerinde SOD aktivitesinin genel olarak normale göre oldukça azalmış olduğunu, iyi kontrol edilmemiş diabette aktivitenin daha düşük olduğunu göstermişlerdir (26,70,153,176). Tho LL. ve arkadaşları tarafından eritrosit SOD aktivitesinin uzun süreli diabetin patofizyolojisi için ek



bir marker olduğu ileri sürülmektedir (176).

$\beta$  - hücreleri pankreasın diğer hücrelerine göre çok daha fazla SOD içerirler (28,55). Bu durum SOD nin  $\beta$  - hücrelerinin homeostazında önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (54). Langerhans adacıklarının Cu,ZnSOD bakımından nisbeten zengin olduğu bildirilmiştir ve insan  $\beta$  - hücrelerinde bu enzimin seçimli lokalizasyonu gösterilmiştir (29,55). Cu,ZnSOD nin aksine Mn SOD nin adacık hücrelerini koruyucu rolü yoktur (22).

Superoksid radikalleri tarafından indüklenen hücre harabiyeti yapıcı etkiye pankreasın  $\beta$  - hücrelerinin çok yatkın olduğu gösterilmiştir ve bu hasara karşı koruyucu etki in vitro ve in vivo da superoksid dismutazla sağlanmaktadır (14).

Diabetojenik ilaçlardan alloksan, STZ ve Vacor in vivo ve in vitro da Cu,ZnSOD nın biyolojik aktivitesinin kısmen inhibisyonuna neden olur. Fakat Mn SOD nın aktivitesi üzerine inhibe edici etkisi yoktur. In vitro inhibisyon adacıklardan ve eritrositlerden ekstrakte edilen enzimler kullanılarak gösterilmiştir. In vivo inhibisyon nisbeten dokuya spesifiktir ve STZ veya alloksan enjeksiyonundan sonra sıçanların eritrositlerinde ve retinada gözlendiği halde çalışılan diğer dokularda gözlenmemiştir (30).

Bazı araştırmacılar oksijen radikallerinin etkisini giderici SOD dahil kimyasal maddelerle izole pankreas adacık hücrelerinin inkübasyonunun, alloksanın toksik etkisine karşı adacıkları koruyucu etkisini göstermişlerdir (61). Robins ve arkadaşları STZ öncesi i. v. SOD uygulamasının STZ nin indüklediği diabete karşı koruyucu olduğunu bildirmişlerdir (148). Eksojen olarak Cu,ZnSOD verilmesi pankreas  $\beta$  hücrelerinin morfolojik özelliklerini alloksanın hasar yapıcı etkisine karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir. İyot-125 ile işaretlenmiş Cu,ZnSOD normal sıçanlara verildiğinde enzimin adacık hücrelerine girdiğine ilişkin kanıt bulunamaması enzimin al-

loksana karşı hücre dışında koruyucu etkisi olduğunu düşündürüyor (175). STZ nin indüklediği diabeti önlemede SOD nin potansiyel etkisi in vivoda sıçanlarda incelenmiştir. STZ uygulanmasından 10 saniye veya 50 dakika önce SOD enjekte edildiğinde diabet oluşumunun önlendiği veya çok daha hafif bir diabet geliştiği görülmüştür. SOD ve STZ nin aynı anda enjekte edilmesi çok daha az etkilidir, Mn SOD ise etkisizdir. SOD nin STZ uygulamasından 12 veya 24 saat önce uygulanmasının koruyucu etkisi yoktur (54).

Spontan olarak diabetik olan farelere 7 kez 2000 ünite SOD ve 7 kez 40 000 ünite katalaz enzimi enjeksiyonunun diabetin yeniden ortaya çıkmasını engellediği in vivo çalışmalarla gösterilmiştir. Bu enzimler yalnız başlarına uygulandığında da benzer etkiler gözlenmiştir. Bu etkiler doza bağımlıdır ve enzimlerin dozu 1/4 oranında azaltıldığında enzimin diabete karşı koruyucu gücü azalmaktadır. Bu sonuçlar oksijen metabolitlerinden özellikle superoksit ve hidrojen peroksidin otoimmün diabetin patojeneziyle direkt olarak ilgili olduğunu göstermektedir (136).

BB sıçanlarda spontan olarak gelişen diabet Wistar sıçanlarda düşük dozda birkaç defa STZ verilmesiyle indüklenen diabete benzer, her ikisi de pankreas adacık hücrelerine lenfo - monositik infiltrasyonla karakterizedir (insulitis). BB sıçanlarda adacık hücrelerinde SOD aktivitesinin daha düşük olması diabetin sendromlarının gelişimine yol açacak bir faktör olabilir (142).

Hücrel savunma mekanizmasıyla ilgili olan SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon düzeylerinin STZ ile diabetik yapılan sıçanlarda değiştiği bulunmuştur. Diabetin ortaya çıkmasından sonra sıçanlar 15 gün 0,3 mg/ml sodyum ortovanadatla tedavi edilmişlerdir. Tedavi sonunda SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz aktiviteleri ve glutatyon düzeyleri hemen hemen normal değerlere yaklaşmıştır. Ayrıca lipid peroksidleri, glikoproteinler ve eritrosit membran fosfolipidleri de vanadat uygulamasından sonra normal



değerlere yaklaşmıştır. Bu sonuçlar deneysel diabette vanadatın antioksidan potansiyelini açıkça göstermektedir (157).

Diabetin oksidatif stresi artırdığı ileri sürülmektedir (76,155). Diabetin komplikasyonlarından mikroanjyopati ve aterosklerozun oksidatif hücre hasarı yoluyla geliştiğine ilişkin birçok kanıtlar vardır (102). Hiramatsu K. ve arkadaşları tarafından diabet ve hipertrigliseridemi olanlarda mononükleer hücreler tarafından superoksit oluşumu artmış bulunmuştur (71). Diabetiklerin polimorfonükleer lökositlerinde normal kişilere göre superoksit anyonu düzeyi artmış bulunmuştur. Bu artışın nedeninin mitokondriyal SOD aktivitelerinde ve daha çokda sitoplazmik SOD aktivitelerinde anlamlı azalmalar olduğu düşünülüyor (131). Kohtaro ve arkadaşları  $H_2O_2$  oluşumunun oksidatif strese katkısı olup olmadığını araştırmak amacıyla  $H_2O_2$  metabolize edici enzimlerden katalaz ve glutatyon peroksidazı ve lipid peroksidlerini ölçmüşlerdir. Diabetik sıçanda (Sprague-Dawley) böbrek ve karaciğerde katalaz aktivitesi azalmış, kalpde ise artmış bulunmuştur. Glutatyon peroksidaz aktivitesi ise böbreklerde karaciğer ve kalbe göre daha fazla artmış bulunmuştur (91).



## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### GEREÇLER

Braun Melsungen AG 5449 model teflon uçlu homojenizatör, Schott CG 840 pH metre, Shimadzu Libror AEU-210 hassas terazî, Christ II KS soğutmalı santrifüj, MSE sonikasyon cihazı, MSE Superspeed 75 ultrasantrifüj, Shimadzu UV-1201 spektrofotometre.

### Kimyasal Maddeler

Sodyum klorür, potasyum dihidrojen fosfat, dipotasyum hidrojen fosfat, sodyum karbonat (anhidr), amonyum sülfat, bakır sülfat, sodyum-potasyum tartarat, sodyum hidroksid, sodyum tungstat, sodyum molibdat, o-fosforik asid, derişik hidroklorik asid, brom, lityum sülfat (MERCK).

Streptozosin, superoksit dismutaz, ksantin, ksantin oksidaz, NBT (Nitrobluetetrazolium), DETAPAC (Dietilentriamin-pentaasetik asid), bakır 2 klorür, bovin serum albumini (SIGMA).

BCS (Bathokuproindisülfonik asid) (ALDRICH). Enzimatik kan şekeri analizi kiti (BIOTROL).

### Kimyasal Çözeltiler

% 0,9 NaCl, 0,05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,05 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2 M Amonyum sülfat, 167 U/L Ksantin oksidaz, 0,3 mM Ksantin, 12 mM DETAPAC, 3 mM BCS, 150  $\mu\text{M}$  NBT, 1 g/L Bovin serum albumini, 0,4 M Sodyum karbonat (anhidr). 0,8 mM  $\text{CuCl}_2$ , Superoksid dismutaz çalışma standartları.

**Alkali tartarat stok çözeltisi:** 20 gram sodyum karbonat ve 0,5 gram sodyum-potasyum tartarat karışımı, 0,1 N 1 lt sodyum hidroksid içinde eritilir.

**Alkali tartarat çalışma çözeltisi:** 45 ml stok alkali tartarat çözeltisi, 5 ml % 0,1'lik bakır sülfat çözeltisi ile karıştırılır. Her çalışmada taze hazırlanmalıdır.

**Folin-Ciocalteu fenol çözeltisi:** 2 litrelik balona 100 gram  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 25 gram  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ve 700 ml distile su konur, karıştırılır. Maddeler eriyince üzerine 50 ml % 85 o-fosforik asid ve 100 ml der. HCl ilave edilir. Karışım geri soğutuculu balonda en az 10 saat kaynatılır. Karışım soğuyunca üzerine 150 gram  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , 50 ml distile su ve 2-3 damla brom ilave edilir. 15 dakika daha kaynatılır. Karışımın rengi sarı olmalıdır. Çözelti buzdolabında saklanır.

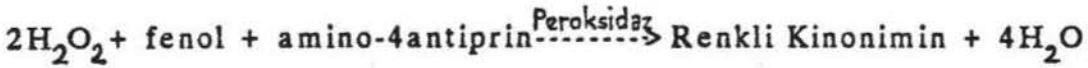
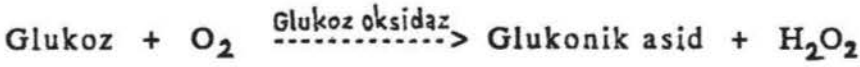
**Dilue fenol çözeltisi:** Folin-Ciocalteu fenol çözeltisi distile su ile 1/2 oranında dilue edilir. Çözelti taze hazırlanmalıdır.

### Y Ö N T E M L E R

İ.Ü. DETAM'dan temin ettiğimiz Sprague Dawley straini erişkin erkek sıçanlar normal ve diabetik olmak üzere iki gruba ay-

rılır. Başlangıçtaki ağırlıkları ölçülerek kaydedilir. Sıçanlardan eter anestezisi altında kuyruk ucu kesme tekniğiyle heparinli ependorf tüplerine kan alınır. Kan örnekleri 2000 rpm de 5 dakika santrifüj edilir ve Biotrolün kiti kullanılarak plazmadan açlık kan şekerleri tayin edilir.

### Kan Şekeri Tayini



	Test ml	Standart ml	Blank ml
Plazma	0,01	-	-
Standart	-	0,01	-
Reaktif	1	1	1

İyice karıştırılır. 37 °C de 10 dakika inkübe edilir. Blank tübüne karşı 500 nm de absorbanslar okunur.

$$\text{Hesap: \% mg Glukoz} = \frac{A_t}{A_{st}} \times 100$$

Diabetik yapılacak gruba penis veninden 65 mg/kg streptozosin enjekte edilir (78). Normal gruba aynı miktarda penis veninden serum fizyolojik enjekte edilir. İçinde % 21 protein bulunan fare yemi (Yem Sanayi-Topkapı) ile ad libidum beslenen ve taze çeşme suyu verilen sıçanların düzenli olarak hergün bakımları yapılır. Bir ayın sonunda yine eter anestezisi altında sıçanlar sakrifiye



edilmeden önce ağırlıkları kaydedilir, açlık kan şekerleri analizi için kan alınır ve sıçanların beyni en kısa zamanda çıkarılır. Sıçan beyinleri serum fizyolojikle iyice yıkandıktan sonra enzim analizinin yapılacağı zamana kadar  $-70^{\circ}\text{C}$  de muhafaza edilir. Beynin sağ yarım küresi alınarak ak ve gri maddeler birbirinden ayrılır ve teflon uçlu homojenizatör kullanılarak 0,05 M fosfat tamponu içerisinde buzda homojenize edilir. MSE model sonikatör kullanılarak soğukta, 15 saniye ara ile üç defa sonikasyon yapılır. MSE superspeed 75 model ultrasantrifüjde 15.000 rpm de 15 dakika santrifüj edildikten sonra homojenatda SOD enzimi analizi yapılır.

### SOD Aktivitesinin Tayini

Yöntemin esası ksantin-ksantin oksidazla oluşturulan superoksid anyonlarının nitroblue tetrazoliumu indirgemesinin SOD tarafından inhibisyonuna dayanır (166,167).

Reaksiyon karışımı için 200 ml lik bir behere

40 mL	0,3 mM	Ksantin
10 mL	12 mM	DETAPAC
10 mL	3 mM	BCS
20 mL	150 $\mu\text{M}$	NBT
12 mL	400 mM	Sodyum karbonat
6 mL	1 g/L	Bovin serum albumini

konur, pH = 10,2 ye getirilir.

Blank tübüne konulacak homojenatdaki SOD enzimi önceden  $100^{\circ}\text{C}$  kaynar su banyosunda yaklaşık 30 saniye tutularak inaktif hale getirilir.

	Blank (mL)	Standart (mL)	Test (mL)
Reaksiyon karışımı	2,45	2,45	2,45
İnaktif enzim	0,5	-	-
Standart	-	0,5	-
Homojenat	-	-	0,5
Ksantin oksidaz	0,05	0,05	0,05

İyice karıştırılır. 25°C de 20 dakika inkübe edilir. Reaksiyonu durdurmak amacıyla 1 mL 0,8 mM CuCl<sub>2</sub> ilave edilir. 560 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorban değerleri reaksiyon karışımına karşı okunarak yüzde inhibisyon değerleri hesaplanır. Protein tayini Folin - Lowry yöntemine göre yapılarak superoksit dismutaz enzimi standart grafiğinden yararlanılarak sonuçlar ünite/ mg protein olarak verilir.

### Protein Tayini

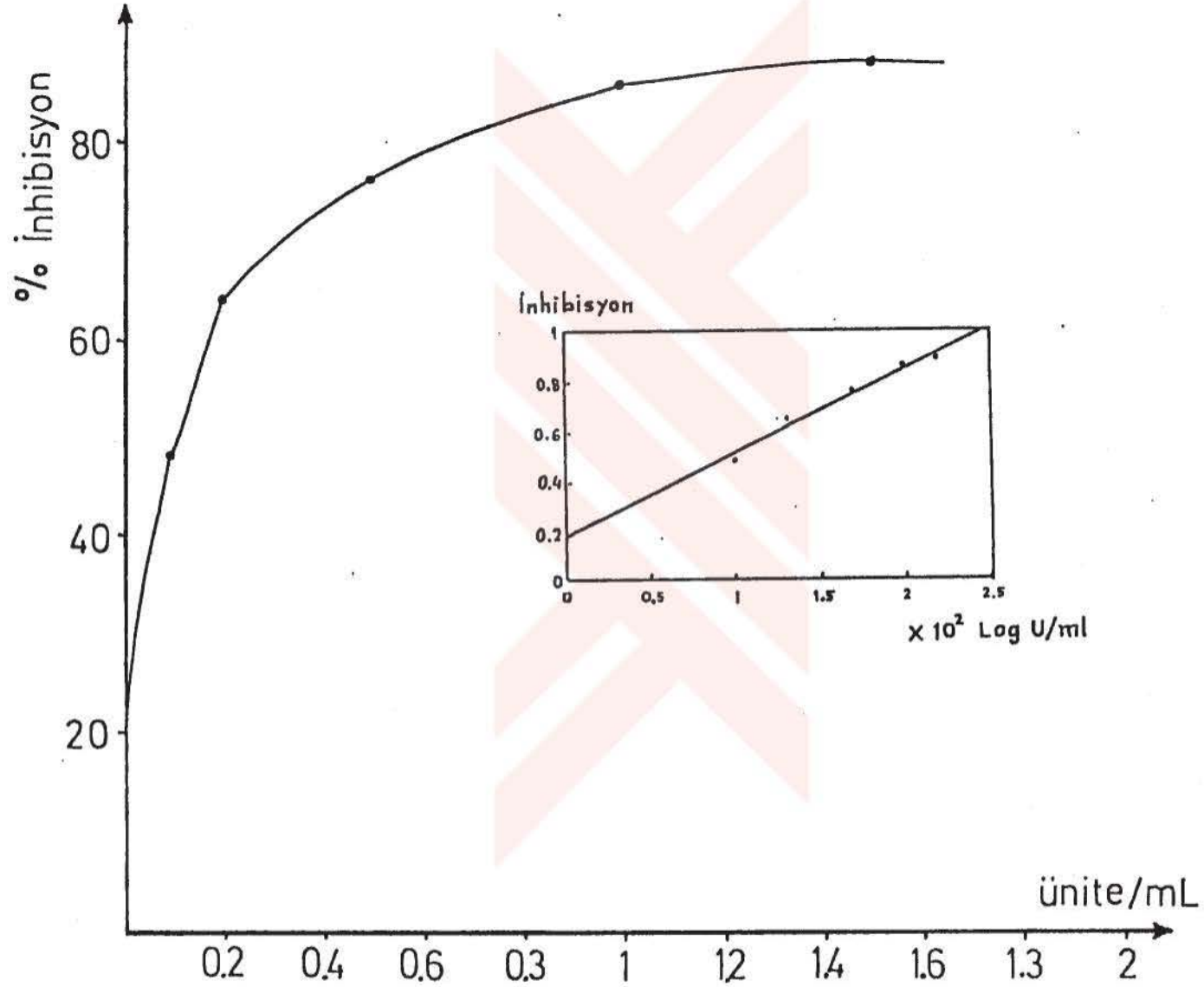
Protein tayini Folin - Lowry yöntemine göre yapıldı (103).

	Blank ml	Standart ml	Test ml
Distile su	0,2	-	-
Homojenat	-	-	0,2
Protein standardı	-	0,2	-
Alkali tartarat çalışma çözeltisi	10	10	10

Bütün tüpler 15 dakika oda sıcaklığında bekletilir. Dilue fenol çözeltisinden her tübe birer ml konur ve derhal karıştırılır. 30 dakika sonra 750 nm dalga boyunda blanka karşı absorban değerleri okunur. Oluşan renk birkaç saat stabildir.

$$\text{Hesap : } \% \text{mg protein} = \frac{A_{\text{test}}}{A_{\text{standart}}} \times 0,2$$

Şekil 7. SOD enzimi standart grafiği.

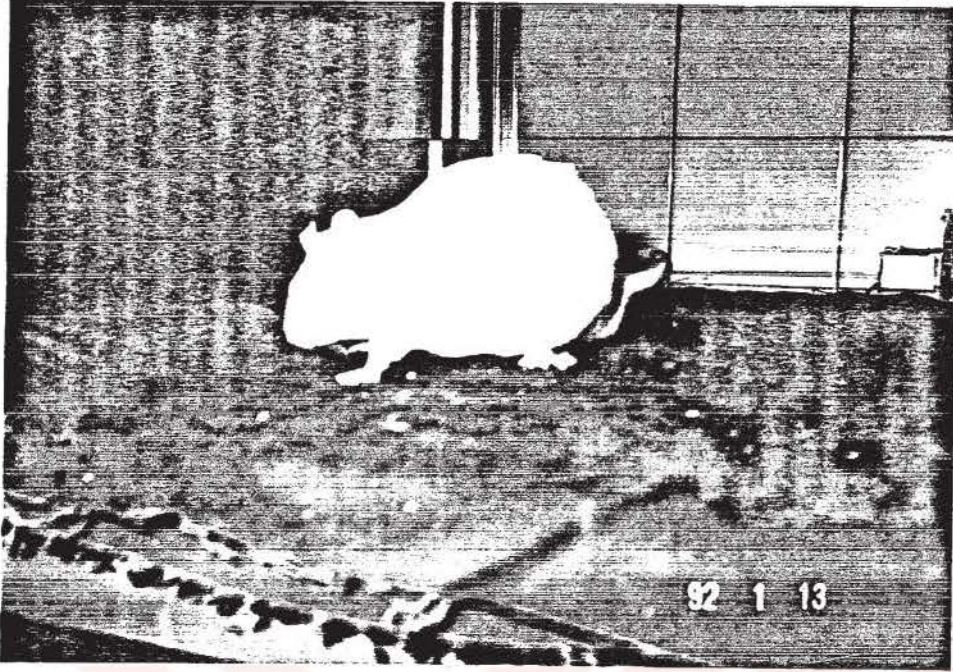




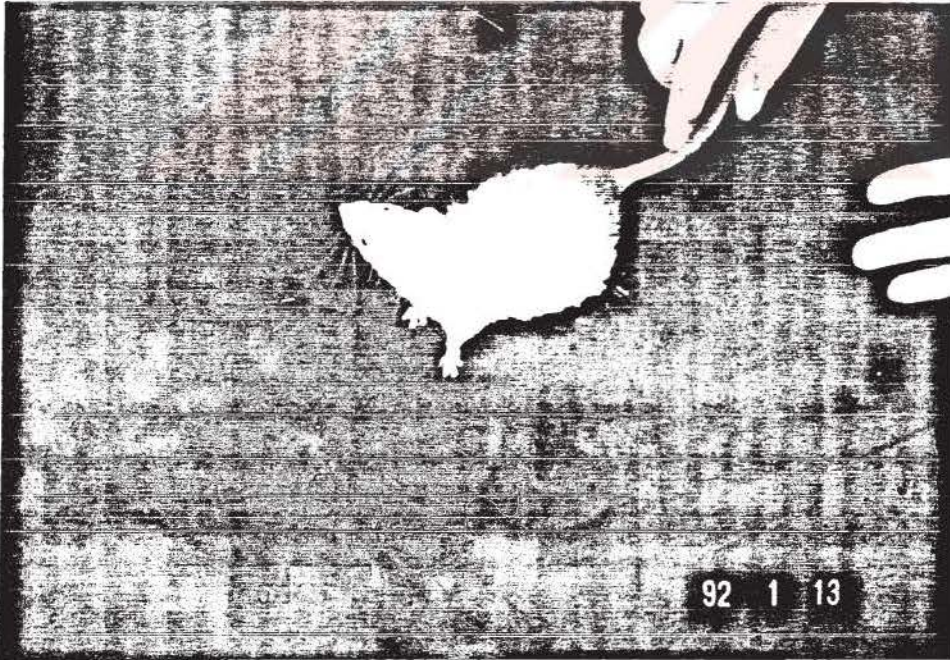
## B U L G U L A R

Elde ettiğimiz bulgular Pearson regresyon - korelasyon analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde ak maddenin SOD aktiviteleri ile açlık kan şekerleri arasında ters yönde çok kuvvetli bir korelasyon ( $r = -0,9433$ ) bulunmuştur. Gri maddenin SOD aktiviteleri ile açlık kan şekerleri arasında da benzer şekilde bir korelasyon ( $r = -0,9778$ ) bulunmuştur.

Student's t testi uygulanarak diabetik grubun verileri normal grubunkilerle karşılaştırıldığında, AKŞ değerlerinde ileri derecede anlamlı bir artış ( $p < 0,001$ ), ak ve gri maddelerin SOD enzimi aktivitelerinde ise ileri derecede anlamlı bir azalma ( $p < 0,001$ ) saptanmıştır.



Resim 1. Sprague Dawley straini erişkin normal erkek sıçan.



Resim 2. Sprague Dawley straini erişkin diabetik erkek sıçan.

## Bulgular

Ağırlıklar (gram)		Açlık kan şekerleri (% mg)	
İLK	SON	İLK	SON
218	228	122	115
204	220	106	108
218	234	112	111
222	262	96	112
230	274	107	119
216	241	108	115
202	216	123	98
195	208	115	94
200	210	104	117
218	232	110	114

Tablo 2. Normal sıçanların ilk ve son ağırlıkları ve açlık kan şekeri değerleri.

Ağırlıklar (gram)		Açlık kan şekerleri (% mg)	
İLK	SON	İLK	SON
220	236	102	379
150	150	119	332
250	242	87	344
200	160	91	385
210	216	106	341
225	184	103	368
234	202	119	388
210	210	105	350
200	184	97	342

Tablo 3. Diabetik sıçanların ilk ve son ağırlıkları ve açlık kan şekeri değerleri

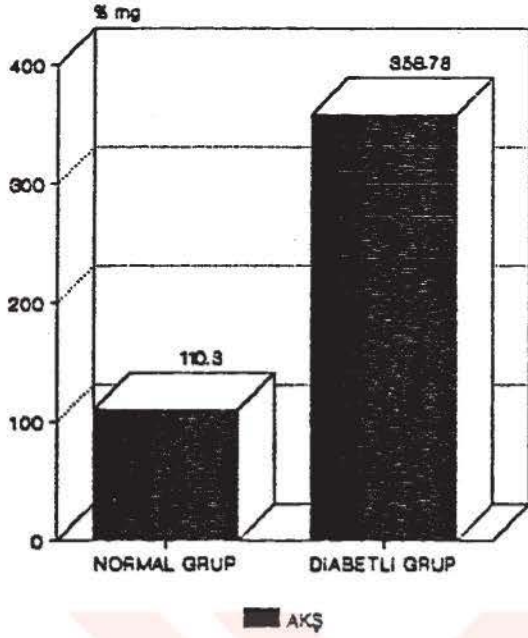


Açlık kan şekeri (%mg)	Ak madde SOD aktivitesi (ü/mg protein)	Gri madde SOD aktivitesi (ü/mg protein)
115	15,10	12,30
108	11,45	10,63
111	13,77	11,58
112	15,10	11,73
119	12,29	11,21
115	13,46	11,38
98	18,96	9,65
94	17,30	9,05
117	12,53	9,94
114	9,50	9,50
n = 10		
$\bar{x} \pm SD = 110,3 \pm 8,19$	$13,95 \pm 2,79$	$10,70 \pm 1,10$

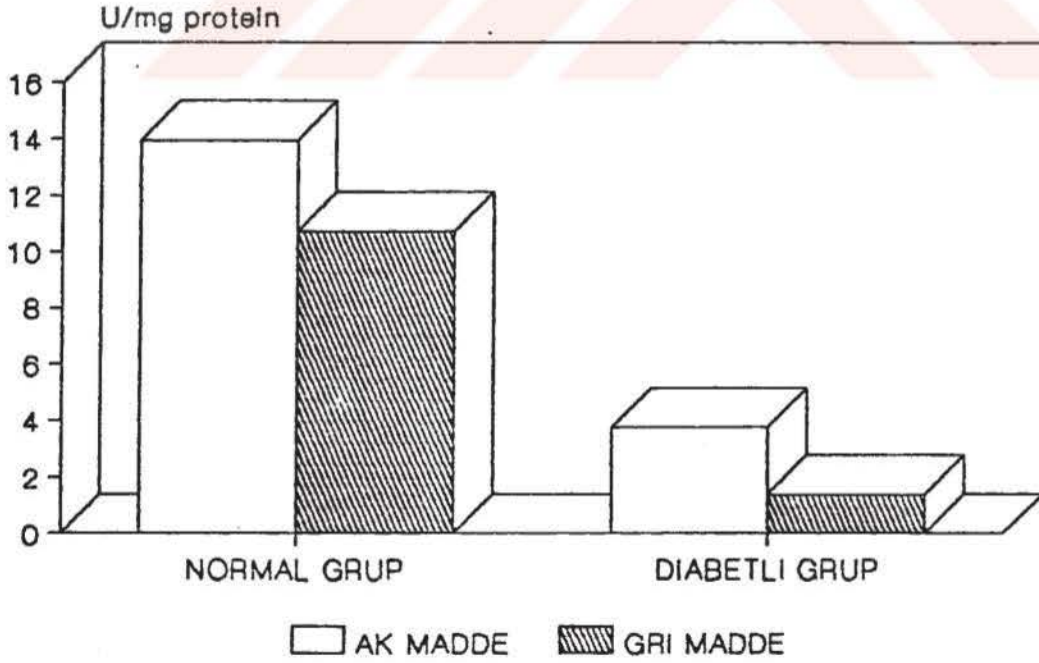
Tablo 4. Normal sıçan beyinlerinin ak ve gri maddelerinde SOD enzimi aktivitelerinin dağılımı

Açlık kan şekeri (%mg)	Ak madde SOD aktivitesi (ü/mg protein)	Gri madde SOD aktivitesi (ü/mg protein)
379	3,15	1,49
332	4,56	1,79
344	3,77	1,15
385	3,15	0,82
341	3,87	1,44
368	3,77	1,20
388	3,72	1,20
350	3,99	1,58
342	3,79	1,73
n = 9		
$\bar{x} \pm SD = 358,78 \pm 21,35$	$3,75 \pm 0,43$	$1,38 \pm 0,31$

Tablo 5. Diabetik sıçan beyinlerinin ak ve gri maddelerinde SOD enzimi aktivitelerinin dağılımı.



Şekil 8. Normal ve diabetik grubun açlık kan şekerlerinin dağılımı.



Şekil 9. Normal ve diabetik grubun ak ve gri maddelerinde SOD enzimi aktivitelerinin dağılımı.

## TARTIŞMA

$O_2^-$ ,  $H_2O_2$  ve  $OH^\cdot$  gibi oksidan ürünler birçok hastalığın patojenezinde önemlidir (27,63). Bunların doku hasarına mı yol açtığı, yoksa doku hasarı sırasında mı oluştuğunu belirlemek oldukça güçtür (63). Oksijen radikallerinin doku hasarındaki direkt ilişkisini göstermek, bu radikallerin yarı ömürleri oldukça kısa olduğundan teknik olarak zordur (130).

Proteinlerin nonenzimatik glikasyonu sırasında oluşan Amadori ürünleri tarafından organizmada oksijen radikalleri oluşturulmasının, diabetin kronik komplikasyonlarının ortaya çıkmasında katkısı olan bir faktör olarak gözönüne alınması önerilmektedir (6,7). SOD enziminin de nonenzimatik olarak glikasyona uğradığı gerek in vivo ve gerekse in vitro çalışmalarla gösterilmiştir. Glikasyon SOD enziminin inaktivasyonuna yol açmaktadır. Diabet gelişiminde ve komplikasyonlarının ortaya çıkmasında oksijen radikalleriyle birlikte, SOD enziminin inaktivasyonu da önemli roller oynayabilir (70).



Glike proteinlerin moleküler oksijenle reaksiyonuyla oksijen radikalleri oluşabilir. Diabetik hastaların dokularında glike proteinlerin miktarı arttığı zaman bu mekanizmanın işleyeceği hipotezi Gillery P. ve arkadaşları tarafından ileri sürülmektedir. Oksijen radikallerinin membran yapısında bulunan çok doymamış yağ asidlerine, proteinlere, karbohidratlara ve DNA üzerine zararlı etkileri vardır. Diabetin en önemli komplikasyonları olan polinörit, retinopati, mikroanjyopati, perfore ülserler ve yara iyileşmesinin gecikmesi glike proteinler tarafından aşırı miktarda oksijen radikalleri oluşumuna bağlı olabilir.(57).

Glike proteinler tarafından oluşturulan radikaller, linoleik asid / araşidonik asid kapsayan veziküllerin membranlarının peroksidasyonunu kontrol grubuna göre iki kat artırmıştır. Bu durum radikallerin damar duvarlarında lipidlerin peroksidasyonunu artırabileceğini düşündürmektedir (129).

Diabetik insan eritrositlerinde, alloksan ve STZ ile oluşturulan diabet modellerindeki eritrositlerde anti oksidan enzimlerin değişimleri incelendiğinde birbirine benzer sonuçlar alınmıştır. Lipid peroksidasyonunun indirekt bir göstergesi olarak malondialdehid oluşumu artmış bulunmuştur. Eritrosit membran lipidlerinin oksidasyona yatkınlığı diabetin komplikasyonlarının şiddetiyle paralel bulunmuştur. Oksidatif aktivitenin artması, kronik diabetin komplikasyonlarının patojenezinde önemli bir rol oynayabilir (58).

Dokularda indirgenme reaksiyonları sırasında aerob hücreler tarafından çok sayıda oksidan molekül meydana getirilmektedir. Bu oksidanlar indirgenmediği sürece oksidatif hasar ve hücre ölümü meydana gelecektir. Plazma membran lipidlerinin oksidasyo-

nu otokatalitik zincir reaksiyonlarına, bu da sonuç olarak hücre permeabilitesinde değişikliğe neden olur (162).

Beyin veya omurilik travması, demire bağımlı radikal reaksiyonları sonucu, dokuda dejenerasyona yol açabilir. Beyin iskemisi veya iskemi sonrası reperfüzyon büyük bir olasılıkla hasar gören hücrelerden metal iyonlarının salınımı nedeniyle radikal reaksiyonlarını stimule edebilir (90,98,123). Bazı araştırmacılar SOD, desferrioksamın veya diğer demir kelatörlerinin deney hayvanlarında iskemi /reperfüzyon çalışmalarında beyin veya omurilik hasarını asgari düzeye indireceğini bildirmişlerdir (90,98,123,140). İskemik beyin hücrelerinin yeniden oksijenlenmesi radikal oluşumunda artışa yol açarak antioksidan savunma mekanizmasını olumsuz yönde etkiler. Oksijen radikalleri serebral vazoreaktivitede ve damar duvarında hasarda rol oynayabilir (94). Tip 1 diabette vasküler komplikasyonların gelişiminde radikallerin aktivitesinin önemli olduğu gösterilmiştir (26).

STZ nin invitro da SOD enzimi aktivitesini etkilediği gösterilmiştir (30). Bu çalışmamızda STZ nin SOD aktivitesi üzerine olası bir akut etkisinden sakınmak amacıyla diabet süresini bir ay olarak belirledik.

Hemoproteinler, örneğin oksihemoglobin superoksid radikallerinin veya hidrojen peroksidin demirle reaksiyonu sonucunda methemoglobine dönüşür (182). Diabette gerek oksijen radikallerinin artışının neden olduğu methemoglobin oluşumu ve gerekse glike hemoglobin düzeyinin artması hemoglobinin oksijen taşıma kapasitesinin azalmasına yol açacaktır. Diabette bir taraftan proteinlerin nonenzimatik glikasyonu sırasında hücrede oksijen radikalleri-

nin miktarı çoğalırken, SOD aktivitesinde ileri derecede anlamlı azalma nedeniyle radikallerin yeterince etkisiz hale getirilememesi, diğer taraftan dokuların yeterince oksijenlenememesi hücre yapılarında önemli hasarlara ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Beyin hücrelerinin ölümü irreversibl bir olay olduğundan diabette beynin ak ve gri maddelerinin SOD aktivitelerindeki azalmaların uzun sürede mikroangiopati, serebral infarkt ve demans gelişimine katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz.





## Ö Z E T

Hücrede meydana gelen biokimyasal reaksiyonların çoğunda oksijen radikalleri oluşmaktadır. Superoksid dismutaz (SOD) enzimi hücreyi bu radikallerin zararlı etkilerinden koruyan en önemli enzimlerden biridir. Bu çalışmada, diabetes mellitusun beyin dokusundaki ak ve gri maddelerin SOD aktivitesi üzerine etkisini incelemek ve SOD aktiviteleri ile açlık kan-şekerleri düzeyleri arasında herhangi bir korelasyon olup olmadığını saptamak amaçlandı. Bunun için Sprague Dawley straini erkek sıçanlar intrapenal olarak 65 mg/kg streptozotocin verilerek diabetik yapıldı. Bir aylık sürenin sonunda, diabetik beyin dokularınının ak ve gri maddelerinde SOD aktiviteleri normallere göre azalmış bulundu ( $P < 0,001$ ). Aynı zamanda açlık kan şekeri düzeyleri ile SOD aktiviteleri arasında da negatif yönde kuvvetli bir korelasyon bulundu ( $P < 0,001$ ). Diabetes mellitusda proteinlerin nonenzimatik glikasyonunun artması sonucunda SOD aktiviteleri ve hemoglobinin oksijen taşıma kapasitesi azalmaktadır. Bu durum, hücre bileşenlerinin hasarına ve hatta hücre ölümüne neden olabilir. Diabette beyin dokusunda SOD aktivitesinde azalma, mikroanjiopati, serebral infarkt ve demans gelişimine katkısı olan bir faktör olarak düşünülebilir.

## S U M M A R Y

Oxygen radicals are formed in many biochemical reactions occurring in the cell. Superoxide dismutase (SOD) is one of the most important enzymes protecting the cell from the hazardous effects of these radicals. This study aimed to investigate the effect of diabetes mellitus to the SOD activity found in the white and gray matters of brain tissue and to find out whether any correlation between the SOD activities and the fasting blood glucose levels existed. In the process, male Sprague Dawley rats were injected intraperitoneal 65 mg/kg with streptozotocin in order to develop diabetes mellitus. By the end of one month period, it is found that the SOD activities were reduced in the white and gray matters of diabetic brain tissues as compared to the normal ones ( $p < 0,001$ ). There was also a fairly strong negative correlation found between the SOD activities and fasting blood glucose levels ( $p < 0,001$ ). In diabetes mellitus, as a result of the increase in nonenzymatic glycation of proteins, there is a decrease in the SOD activities and the oxygen carrying capacity of hemoglobin. This may cause the destruction of cell components and also cell death. In diabetes the decrease in SOD activity of brain tissue may be considered as a contributing factor to the development of microangiopathy, cerebral infarct and dementia.

## K A Y N A K L A R

1- Arai K : Biochemical study on nonenzymatic glycosylation of human erythrocyte Cu-Zn-superoxide dismutase. Hokkaido Igaku Zasshi 63 : 925-937, 1988

2- Arai K, Iizuka S, Tada Y, Oikawa K, Taniguchi N : Increase in the glycosylated form of erythrocyte Cu-Zn-superoxide dismutase in diabetes and close association of the non-enzymatic glycosylation with the enzyme activity. Biochim Biophys Acta 924 : 292-296, 1987

3- Arai K, Maguchi S, Fujii, S, Ishibashi H, Oikawa K, Taniguchi N: Glycation and inactivation of human Cu-Zn-superoxide dismutase. J Biol Chem 262 : 16969-16972, 1987

4- Asada K, Yoshikawa K, Takahashi M : Superoxide dismutases from a blue-green alga, *Plectonema boryanum*. J Biol Chem 250 : 2801-2807, 1975

5- Aust SD, Roering DL : Evidence for superoxide generation by NADPH - cytochrome c reductase of rat liver microsomes. Biochem Biophys Res Commun 47 : 1133-1137, 1972

6- Azevedo M, Falcao J, Raposo J, Manso C : Superoxide radical generation by Amadori compounds. Free Radic Res Commun 4 : 331-335, 1988



7- Azevedo MS, Raposo J, Falcau J, Fontes G, Manso C : Oxygen radical generation by Maillard compounds. *J Diabetic Complications* 2 : 19-21, 1988

8- Badwey JA, Karnowsky ML : Production of superoxide by phagocytic leukocytes : a paradigm for stimulus - response phenomena. *Curr Topics Cellul Regul* 28 : 183-208, 1986

9- Ballou D, Palmer G, Massey V : Direct demonstration of superoxide anion production during the oxidation of reduced flavin and of its catalytic decomposition by erythrocyte cytochrome b<sub>5</sub>. *Biochem Biophys Res Commun* 36 : 898-904, 1969

10- Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G : Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem* 22 : 111-180, 1987

11- Beckman JS, Minor RL Jr, Freeman BA : Augmentation of antioxidant enzymes in vascular endothelium. *Free Radic Biol Med* 2 : 359-365, 1986

12- Beckman JS, Minor RL Jr, White CW, Repine JE, Rosen GM, Freeman BA : Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. *J Biol Chem* 263 : 6884-6892, 1988

13- Bedwell S, Dean RT, Jessup W : The action of defined oxygen centered free radicals on human low - density lipoprotein. *Biochem J* 262 : 707-712, 1989

14- Berglund O, Grankvist K, Albiin C, Marklund SL : No effect of superoxide dismutase on spontaneous development of diabetes in db/db mice. Acta Endocrinol (Copenh) 117 : 99-102, 1988

15- Bielski BH, Arudi RL, Sutherland MW : A Study of the reactivity of  $\text{HO}_2^\cdot / \text{O}_2^-$  with unsaturated fatty acids. J Biol Chem 258 : 4759-4761, 1983

16- Biemond P, Swaak AJG, Penders JMA, Beindorff CM, Koster JF : Superoxide production by polymorphonuclear leukocytes in rheumatoid arthritis and osteo arthritis in vivo inhibition by the antirheumatic drug piroxicam due to interference with the activation of the NADPH - Oxidase. Ann Rheum Dis 45 : 249-255, 1986

17- Blum J, Fridovich I : Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. Arch Biochem Biophys 240 : 500-508, 1985

18- Booth J, Boyland E, Sims P : An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. Biochem J 79 : 516-524, 1961

19- Borg DC, Schaich KM, Elmore JJ, Bell JA : Cytotoxic reactions of free radicals of oxygen. Photochem Photobiol 28 : 889-907, 1978

20- Boveris A : Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. Adv Exp Med Biol 78 : 67-82, 1977

21- Buchanan JD, Armstrong DA : The radiolysis of glyceraldehyde -3phosphate dehydrogenase. *Int J Radiat Biol* 33 : 409-418, 1978

22- Buse MG, Gandy SE, Crouch RK : SOD protects B - cells against diabetogenic drugs in rats and isolated canine islets, In : RA Greenwald, G Cohen (eds) *Oxy radicals and their scavengers, Vol II. Cellular and medical aspects*, Elsevier, North Holland, Amsterdam, pp 119-124, 1983

23- Capdevila J, Parhill L, Chacos N, Okita R, Masters BS, Estabrook RW : The oxidative metabolism of arachidonic acid by purified cytochromes  $P_{450}$  *Biochem Biophys Res Commun* 101 : 1357-1363, 1981

24- Chance B, Sies H, Boveris A : Hydrogen peroxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59 : 527-605, 1979

25- Cohen G, Heikkila RE : The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6- hydroxy - dopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J Biol Chem* 249 : 2447-2452, 1974

26- Collier A, Wilson R, Bradley H, Thomson JA, Small M: Free radical activity in type 2 diabetes. *Diabetic Med* 7 : 27-30, 1990

27- Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D : Oxygen radicals and human disease. *Ann Int Med* 107 : 526-545, 1987



28- Crouch RK, Gandy S, Patrick J, Reynolds S, Buse MG, Simson JAV : Localization of copper - zinc superoxide dismutase in the endocrine pancreas. *Exp Mol Pathol* 41 : 377-383, 1984

29- Crouch RK, Gandy SE, Kimsey G, Galbraith RA, Galbraith GMC, Buse MG : The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes* 30 : 235-241, 1981

30- Crouch R, Kimsey G, Priest DG, Sarda A, Buse MG : Effect of streptozotocin on erythrocyte and retinal superoxide dismutase. *Diabetologia* 15 : 53-57, 1978

31- Czapski G, Ilan Y : On the generation of the hydroxyl agent from superoxide radical : can the Haber - Weiss reaction be the source of  $\text{OH}^\bullet$  radical ? *Photochem Photobiol* 28 : 651-653, 1978

32- Danh HC, Benedetti MS, Dostert P : Differential changes in superoxide dismutase activity in brain and liver of old rats and mice. *J Neurochem* 40 : 1003-1007, 1983

33- Davies KJA : Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defenses : an hypothesis. *Free Radic Biol Med* 2 : 155-173, 1986

34- Dean RT, Cheeseman KH : Restriction of free radical attack on monoamine oxidase in the mitochondrial membrane by vitamin E. *Biochem Biophys Res Commun* 148 : 1277-1282, 1987

35- Dean RT, Hunt JV, Grant AJ, Yamamoto Y, Niki E : Free radical damage to proteins : The influence of the relative localization of radical generation, antioxidants and target proteins. *Free Radic Biol Med* 11 : 161-168, 1991

36- Dean RT, Thomas SM, Garner AC : Free radical mediated fragmentation of monoamine oxidase in the mitochondrial membrane. Roles for lipid radicals. *Biochem J* 240 : 489-494, 1986

37- DiGuisseppe J, Fridovich I : The toxicology of molecular oxygen. *CRC Crit Rev Toxicol* 12 : 315-342, 1984

38- Dionisi O, Galeotti T, Terranova T, Azzi A : Superoxide radicals and hydrogen peroxide formation in mitochondria from normal and neoplastic tissues. *Biochim Biophys Acta* 403 : 292-300, 1975

39- Edwards SW, Hallett MB, Lloyd D, Campbell AK : Decrease in apparent Km for oxygen after stimulation of respiration of rat polymorphonuclear leukocytes. *FEBS Lett* 161 : 60-64, 1983

40- Egan RW, Paxton J, Kuehl FA : Mechanism for irreversible self-deactivation of prostaglandin synthetase. *J Biol Chem* 251 : 7329-7335, 1976

41- Feeney L, Berman ER : Oxygen toxicity : Membrane damage by free radicals. *Invest Ophtal* 15 : 789-792, 1976

42- Flechner I, Maruta K, Burkart V, Kawai K, Kolb H, Kiesel U : Effects of radical scavengers on the development of experimental diabetes. *Diabetes Res* 13 : 67-73, 1990

43- Fisher DB, Kaufman S : Tetrahydropterin oxidation without hydroxylation catalyzed by rat liver phenylalanine hydroxylase. *J Biol Chem* 248 : 4300-4304, 1973

44- Fong KL, McCay PB, Poyer JL, Misra HP, Keele BB : Evidence for superoxide - dependent reduction of Fe and its role in enzyme - generated hydroxyl radical formation. *Chem Biol Interact* 15 : 77-89, 1976

45- Freeman BA, Crapo JD : Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem* 256 : 10986-10992, 1981

46- Freeman BA, Turrens JF, Mirza Z, Crapo JD, Young SL : Modulation of oxidant lung injury by using liposome - entrapped superoxide dismutase and catalase. *Fed Proc* 44 : 2591-2595, 1985

47- Freeman BA, Young SL, Crapo JD : Liposome - mediated augmentation of superoxide dismutase in endothelial cells prevents oxygen injury. *J Biol Chem* 258 : 12534-12542, 1983

48- Fridovich I : Superoxide dismutases. *Adv Enzymol* 41 : 35-97, 1974

49- Fridovich I : Superoxide dismutases. *Adv Enzymol* 58 : 61-97, 1986

50- Fridovich I : The biology of oxygen radicals : The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity ; superoxide dismutases provide an important defense. *Science* 201 : 875-880, 1978



51- Fridovich I : Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 44 : 147-159, 1975

52- Fridovich I : Quantitative aspect of production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 245 : 4035-4037, 1970

53- Fridovich I : Superoxide radical : an endogenous toxicant. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 23 : 239-257, 1983

54- Gandy SE, Buse MG, Crouch RK : Protective role of superoxide dismutase against diabetogenic drugs. *J Clin Invest* 70 : 650-658, 1982

55- Gandy SE, Galbraith RA, Crouch RK, Buse MG, Galbraith GMP : Superoxide dismutase in human islets of Langerhans. *N Eng J Med* 304 : 1547-1548, 1981

56- Garrison WM : Radiation chemistry of organo -nitrogen compounds. *Curr Top Radiat Res* 4 : 43-94, 1968

57- Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP : Does oxygen free radical increased formation explain long term complication of diabetes mellitus ? *Med Hypotheses* 29 : 47-50, 1989

58- Godin DV, Wohaieb SA, Garnett ME, Goumeniouk AD: Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes. *Mol Cell Biochem* 84 : 223-231, 1988

59- Goldstein S, Michel C, Bors W, Saran M, Czapski G : A critical reevaluation of some assay methods for superoxide dismutase activity. *Free Radic Biol Med* 4 : 295-303, 1988

60- Gonzales R, Auclair C, Voisin E, Gautero H, Dhermy D, Boivin P : Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in red blood cells from patients with malignant diseases. *Cancer Res* 44 : 4137-4139, 1984

61- Grankvist K, Marklund S, Sehlin J, Taljedal IB : Superoxide dismutase, catalase and scavengers of hydroxyl radical protect against the toxic action of alloxan on pancreatic islet cells in vitro. *Biochem J* 182 : 17-25, 1979

62- Gutteridge JM : Antioxidant properties of caeruloplasmin towards iron - and copper - dependent oxygen radical formation. *FEBS Lett* 157 : 37-40, 1983

63- Halliwell B : Oxidants and human disease : some new concepts. *FASEB J* 1 : 358-364, 1987

64- Halliwell B, Gutteridge JM : The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med* 8 : 89-193, 1985

65- Halliwell B : Use of desferrioxamine as a probe for iron -dependent formation of hydroxyl radicals. Evidence for a direct reaction between desferal and the superoxide radical. *Biochem Pharmacol* 34 : 229-233, 1985

66- Halliwell B : Superoxide dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron in degradation of hyaluronic acid by superoxide generating system. *FEBS Lett* 96 : 238-242, 1978

67- Halliwell B, Grootveld M : The measurement of free radical reactions in humans : some thoughts for future experimentation. FEBS Lett 213 : 9-14, 1987

68- Halliwell B, Gutteridge JM : Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine : some problems and concepts. Arch Biochem Biophys 246 : 501-514, 1986

69- Hanenberg H, Kolb -Bachofen V, Kantwerk - Funke G, Kolb H : Macrophage infiltration precedes and is a prerequisite for lymphocytic insulinitis in pancreatic islets of prediabetic BB rats. Diabetologia 32 : 126-134, 1989

70- Hayakawa M, Kuzuya F : Free radicals and diabetes mellitus. Nippon Ronen Igakkai Zasshi 27 : 149-154, 1990

71- Hiramatsu K, Arimori S : Increased superoxide production by mononuclear cells of patients with hypertriglyceridemia and diabetes. Diabetes 37 : 832-837, 1988

72- Hodgson EK, Fridovich I : The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide : Inactivation of the enzyme. Biochemistry 14 : 5294-5299, 1974

73- Hodgson EK, Fridovich I : The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide : Chemiluminescence and peroxidation. Biochemistry 14 : 5299-5303, 1975

74- Hopkin FG, Elliott KAC : The relation of glutathione to cell respiration with special reference to hepatic tissue. Proc Roy Soc 109 : 58-88, 1931



75- Hunt JV, Dean RT, Wolff SP : Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation : Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J* 256 : 205-212, 1988

76- Jain SK, McVie R, Duett J, Herbst JJ : Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes* 38 : 1539-1543, 1989

77- Jessup W, Bedwell S, Kwok K, Dean RT : Oxidative modification of low - density lipoproteins : initiation by free radicals and protection by antioxidants. *Agent and Actions, Supplement 26*: 241-246, 1989

78- Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R: Studies of diabetogenic action of STZ. *Proc Soc Exp Biol Med* 126 : 201-205, 1967

79- Kalyanaraman B, Mason RP, Tainer B, Eling TE : The free radical formed during the hydroperoxide - mediated deactivation of rat seminal vesicles is hemoprotein - derived. *J Biol Chem* 257 : 4764-4768, 1982

80- Kalyanaraman B, Perez - Reyes E, Mason RP : Spin trapping and direct electron spin resonance investigations of the redox metabolism of Quinone anti - cancer drugs. *Biochim Biophys Acta* 630 : 119-130, 1980

81- Kavas G : Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri* 9 : 1-8, 1989

82- Keele BB, McCord JM, Fridovich I : Superoxide dismutase from *Escherichia Coli* B. : A new manganese - containing enzyme. *J Biol Chem* 245 : 6176-6181, 1972

83- Kellog EW, Fridovich I : Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymatically generated superoxide and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 252 : 6721-6728, 1977

84- Ketterer B, Tan KH, Meyer DJ, Coles B : Glutathione transferases : a possible role in the detoxification of DNA and lipid hydroperoxides, In : TJ Mantle, CB Pickett, JD Hayes (eds) *Glutathione S-transferases and carcinogenesis*. Taylor & Francis, New York, pp 149-163, 1987

85- King E, Mason HS, Morrison M : Oxidase and related redox systems. Baltimore, University Park Press 51, 1973

86- Kirkman HN, Galiano S, Gaetani GF : The function of catalase bound NADPH. *J Biol Chem* 262 : 660-666, 1987

87- Kirschenbaum DM : Glycosylation of proteins : Its implications in diabetic control and complications. *Pediatr Clin North Am* 31 : 611-621, 1984

88- Kittridge KJ, Willson RL : Uric acid substantially enhances the free radical - induced inactivation of alcohol dehydrogenase. *FEBS Lett* 170 : 162-164, 1984

89- Klug D, Rabani J, Fridovich I : A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. *J Biol Chem* 247 : 4839-4842, 1972

90- Kogure K, Arai H, Abe K, Nakano M : Free radical damage of the brain following ischemia. *Prog Brain Res* 63 : 237-259, 1985

91- Kohtaro A, Yokota S, Kato K : Peroxisomal oxidases in various tissues of diabetic rats. *Diabetes Res Clin Prac* 11 : 89-94, 1991

92- Kolb - Bachofen V, Epstein S, Kiesel U, Kolb H : Low - dose streptozotocin - induced diabetes in mice : Electron microscopy reveals single cell insulinitis prior to diabetes onset. *Diabetes* 37 : 21-27, 1988

93- Kono K, Fridovich I : Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 257 : 5751-5754, 1982

94- Kontos HA : Oxygen radicals in cerebral vascular injury. *Circ Res* 57 : 508-516, 1985

95- Koppenol WH : What is in a name ? Rules for radicals. *Free Radic Biol Med* 9 : 225-227, 1990

96- Koppenol WH, Butler J : Mechanism of reactions involving singlet oxygen and the superoxide anion. *FEBS Lett* 83 : 1-6, 1977

97- Koppenol WH, Butler J, van Leeuwen JW : The Haber-Weiss cycle. *Photochem Photobiol* 28 : 655-660, 1978

98- Krause GS, White BC, Aust SD, Nayini NR, Kumar K : Brain cell death following ischemia and reperfusion : a proposed biochemical consequence. *Crit Care Med* 16 : 714-726, 1988



99- Kuo CF, Mashino T, Fridovich I : Alpha, beta - dihydroxyisovalerate dehydratase. A superoxide - sensitive enzyme. J Biol Chem 262 : 4724-4727, 1987

100- Kuthan H, Haussmann HJ, Werringloer J : A spectrophotometric assay for superoxide dismutase activities in crude tissue fractions. Biochem J : 237 : 175-180, 1986

101- Lavelle F, Michelson AM, Dimitrijevic L : Biological protection by superoxide dismutase. Biochem Biophys Res Commun 55 : 350-357, 1973

102- Ledwozyw A, Michalak J, Stepien A, Kadziolka A : The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. Clin Chim Acta 155 : 275-284, 1986

103- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ : Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chem 193 : 265-275, 1951

104- Lynch RE, Fridovich I : Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical. J Biol Chem 253 : 4697-4699, 1978

105- Malaisse WJ, Malaisse - Lagae F, Sener A, Pipeleers DG : Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic B cell. Proc Natl Acad Sci 79 : 927-930, 1982

106- Mandrup - Poulsen T, Spinas GA, Prowse SJ, Hansen BS, Jorgensen DW, Bendtzen K, Nielsen JH, Nerup J : Islet cytotoxicity of interleukin 1. Influence of culture conditions and islet donor characteristics. *Diabetes* 36 : 641-647, 1987

107- Mann PJG : The reduction of glutathione by a liver system. *Biochem J* 26 : 785-790, 1932

108- Markey BA, Phan SH, Varani J, Ryan US, Ward PA : Inhibition of cytotoxicity by intracellular superoxide dismutase supplementation. *Free Radic Biol Med* 9 : 307-314, 1990

109- Marklund SL, Holme E, Hellner L : Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chim Acta* 126 : 41-51, 1982

110- Marklund SL : Human copper - containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci* 79 : 7634-7638, 1982

111- Marklund SL : Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J Clin Invest* 74 : 1398-1403, 1984

112- Mason RP, Kalvanaraman B, Tainer BE, Eling TE : A carbon-centered free radical intermediate in the prostaglandin synthetase oxidation of arachidonic acid : Spin trapping and oxygen uptake studies. *J Biol Chem* 255 : 5019-5022, 1980

113- Mason RP, Chingnell CF : Free radicals in pharmacology and toxicology - selected topics. *Pharmacol Rev* 33 : 189-211, 1982

114- Masters C, Holmes R : Peroxisomes : New aspects of cell physiology and biochemistry. *Physiol Rev* 57 : 816-882, 1977

115- McAlpine PJ, Boucheix C, Pakstis AJ, Stranc LC, Berent TG, Shows TB : The 1988 catalog of mapped genes and report of the nomenclature committee. *Cytogenet Cell Genet* 49 : 4-38, 1988

116- McCord JM : Oxygen - derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Eng J Med* 312 : 159-163, 1985

117- McCord JM, Fridovich I : The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. *J Biol Chem* 245 : 1374-1377, 1970

118- McCord JM, Day ED : Superoxide -dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron - EDTA complex. *FEBS Lett* 86 : 139-142, 1978

119- McCord JM, Fridovich I : The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide and oxygen. *J Biol Chem* 244 : 6056-6063, 1969

120- McCord JM, Keele BB, Fridovich I : An enzyme based theory of obligate anaerobiosis : The physiological function of superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci* 68 : 1024-1027, 1971

121- McLaughlin A, Pethig R, Szent - Gyorgyi A : Studies of the methylglyoxal - protein adduct. *Proc Natl Acad Sci* 77 : 949-951, 1980



122- McMahon S, Stern A : The interrelationship of superoxide dismutase and peroxidatic enzymes in the red blood cells. *Biochem Biophys Acta* 566 : 253-258, 1979

123- Mickel HS, Vaishnav YN, Kempinski O, von Lubitz D, Weiss JF, Feuerstein G : Breathing 100 % oxygen after global brain ischemia in Mongolian Gerbils results in increased lipid peroxidation and increased mortality. *Stroke* 18 : 426-430, 1987

124- Mills GC : Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem* 229 : 189-197, 1957

125- Misra HP, Fridovich I : The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a single assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247 : 3170-3175, 1972

126- Moorhouse PC, Grootveld M, Halliwell B, Quinlan JG, Gutteridge JMC : Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS Lett* 213 : 23-8, 1987

127- Moorhouse PC, Halliwell B, Grootveld M, Gutteridge JM : Cobalt (II) ion as a promoter of hydroxyl radical and possible "crypto-hydroxyl" radical formation under physiological conditions. Differential aspects of hydroxyl radical scavengers. *Biochim Biophys Acta* 843 : 261-268, 1985

128- Mukai FH, Goldstein BD : Mutagenicity of malonaldehyde a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acids. *Science* 191 : 868-869, 1976

129- Mullarkey CJ, Edelstein D, Brownlee M : Free radical generation by early glycation products : a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 173 : 932-939, 1990

130- Nahum A, Wood LDH, Sznajder JI : Measurement of hydrogen peroxide in plasma and blood. *Free Radic Biol Med* 6 : 479-484, 1989

131- Nath N, Chari SN, Rathi AB : Superoxide dismutase in diabetic polymorphonuclear leukocytes. *Diabetes* 33 : 586-589, 1984

132- Nerup J, Mandrup-Poulsen T, Molvig J : Effector mechanisms in Type I diabetes mellitus. *Ann Inst Pasteur/Immunol* 137 D : 463-468, 1986

133- Njorge FG, Sayre LM, Monnier VM : Detection of D-glucose derived pyrrole compounds during Maillard reaction under physiological conditions. *Carbohydr Res* 167 : 211-220, 1987

134- Nohl H, Hegner D, Summer KH : The mechanism of toxic action of hyperbaric oxygenation on the mitochondria of rat heart cells. *Biochem Pharmacol* 30 : 1753-1757, 1981

135- Nohl H, Jordan W, Hegner D : Identification of free hydroxyl radicals in respiring rat heart mitochondria by spin trapping with the nitron DMPO. *FEBS Lett* 123 : 241-244, 1981

136- Nomikos IN, Wang Y, Lafferty KJ : Involvement of O<sub>2</sub> radicals in autoimmune diabetes. *Immunol Cell Biol* 67 : 85-87, 1989

137- Oberley LW, Buettner GR : Role of superoxide dismutase in cancer : A review. *Cancer Res* 39 : 1141-1149, 1979

138- Oshino N, Chance B, Sies H, Bucher T : The role of hydrogen peroxide generation in perfused rat liver and the reaction of catalase Compound I and hydrogen donors. *Arch Biochem Biophys* 154 : 117-131, 1973

139- Packer L, Glazer AN : Oxygen radicals in biological system. *Methods Enzymol* 186 : 1-21, 1990

140- Patt A, Harken AH, Burton LK, Rodell TC, Piermattei D, Schorr WJ, Parker NB, Berger EM, Horesh IR, Terada LS, Linas SL, Cheronis JC, Repine JE : Xanthine oxidase - derived hydrogen peroxide contributes to ischemia reperfusion - induced edema in gerbil brains. *J Clin Invest* 81 : 1556-1562, 1988

141- Percy ME : Catalase : an old enzyme with a new role. A review. *Can J Biochem Cell Biol* 62 : 1006-1014, 1984

142- Pisanti FA, Frascators S, Papaccio G : Superoxide dismutase activity in the BB rat : a dynamic time - course study. *Life Sci* 43 : 1625-1632, 1988

143- Prowse SJ, Lafferty J, Nomikos JN, Carotenuto P : The pathogenesis of spontaneous diabetes. *Ann Inst Pasteur/Immunol* 137 D : 459-462, 1986



144- Pukel C, Baqueriza H, Rabinovitch A : Destruction of rat islet cell monolayers by cytokines : synergistic interactions of gamma interferon, tumor necrosis factor, lymphotoxin and interleukin 1. *Diabetes* 37 : 133-136, 1988

145- Ray LE, Prescott JM : Isolation and some characteristics of glutathione reductase from rabbit erythrocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 148 : 402-409, 1975

146- Richards DCH, Jessup W, Dean RT : Cell surface proteins may be the primary target during free radical - mediated catalysis. *Biochim Biophys Acta* 946 : 281-288, 1988

147- Rister M, Baehner RL : A comparative study of superoxide dismutase activity in polymorphonuclear leukocytes, monocytes and alveolar macrophages of the Guinea pig. *J Cell Physiol* 87 : 345-355, 1976

148- Robbins MJ, Sharp RA, Slonim AE, Burr IM : Protection against streptozotocin - induced diabetes by superoxide dismutase. *Diabetologia* 18 : 55-58, 1980

149- Rosen GM, Freeman BA : Detection of superoxide generated by endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 23 : 7269-7273, 1984

150- Rotilio G, Bray RC, Fielden EM : A pulse radiolysis study of superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta* 268 : 605-609, 1972

151- Rotilio G, Calabrese L, Agro AF, Argento - Ceru MP, Autori F, Mondovi B : Intracellular localization of superoxide dismutase and its relation to the distribution and mechanism of hydrogen peroxide - producing enzymes. *Biochim Biophys Acta* 321 : 98-102, 1973

152- Saik LA, Hsieh HL, Baricos WH, Shapira E : Enzymatic and immunologic quantitation of erythrocyte superoxide dismutase in adults and in neonates of different gestational ages. *Pediatr Res* 16 : 933-937, 1982

153- Sal'nikova LA, Musatova NV : Activity of antioxidative enzymes of children with diabetes mellitus. *Vopr Med Khim* 36: 39-41, 1990

154- Saltzman HA, Fridovich I : Oxygen toxicity. Introduction to a protective enzyme : Superoxide dismutase. *Circulation* 48: 921-923, 1973

155- Sato Y, Hotta N, Sakamoto N : Lipid peroxide levels of plasma of diabetic patients. *Biochem Med* 21 : 104-107, 1979

156- Scholes G : Radiation effects on DNA. The Silvanus Thompson Memorial Lecture. *Br J Radiol* 56 : 221-231, 1983

157- Sekar N, Kanthasamy A, William S, Balasubramanian N, Govindasamy S : Antioxidant effect of vanadate on experimental diabetic rats. *Acta Diabetol Lat* 27 : 285-293, 1990

158- Slater TF : Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 222 : 1-13, 1984

159- Slot JW, Geuze HJ, Freeman BA, Crapo JD : Intracellular localization of the copper - zinc and manganese superoxide dismutases in rat liver parenchymal cells. *Lab Invest* 55 : 363-371, 1986

160- Smith GT Ohl VS, Litwack G : Ligandin, the glutathione S - transferases, and chemically induced hepatocarcinogenesis: a review. *Cancer Res* 37 : 8-14, 1977

161- Soltero RA : Superoxide dismutase activity and zinc - copper and manganese concentrations in leukocytes. *Clin Chem* 31: 1094-1095, 1985

162- Srivastava SK, Ansari NH, Liu S, Izban A, Das B, Szabo G, Bhatnagar A : The effect of oxidants on biomembranes and cellular metabolism. *Mol Cell Biochem* 91 : 149-157, 1989

163- Sumoski W, Baquerizo H, Rabinovitch A : Oxygen free radical scavengers protect rat islet cells from damage by cytokines. *Diabetologia* 32 : 792-796, 1989

164- Sun Y : Free Radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. Review Article. *Free Radic Biol Med* 8 : 583-599, 1990

165- Sun Y, Oberley LW : The inhibition of catalase by glutathione. *Free Radic Biol Med* 7 : 595-602, 1989

166- Sun Y, Oberley LW, Li Y : A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 34 : 497-500, 1988



167- Sun Y, Peterson TE, McCormick ML, Oberley LW, Osborne JW : Improved superoxide dismutase assay for clinical use. Clin Chem 35 : 1265-1266, 1989

168- Svingen BA, Buege JA O'Neal FO, Aust SD : The mechanism of NADPH - dependent lipid peroxidation. J Biol Chem 254: 5892-5899, 1979

169- Symonyan MA, Nalbandyan RM : Interaction of hydrogen peroxide with superoxide dismutase from erythrocytes. FEBS Lett 28 : 22-24, 1972

170- Takahashi MA, Asada K : Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. Arch Biochem Biophys 226 : 558-566, 1983

171- Taniguchi N : Superoxide dismutases : significances in aging, diabetes, ischemia and cancer. Rinsho Byori 38 : 876-881, 1990

172- Tanswell AK, Freeman BA : Liposome - entrapped antioxidant enzymes prevent lethal O<sub>2</sub> toxicity in the newborn rat. Am J Physiol 63 : 347-352, 1987

173- Tauber AI, Borregaard N, Simons E, Wright J : Chronic granulomatous disease : a syndrome of phagocyte oxidase deficiencies. Medicine 62 : 286-309, 1983

174- Terelius Y, Ingelman - Sundberg M : Cytochrome P<sub>450</sub>-dependent oxidase activity and hydroxyl radical production in micellar and membranous types of reconstituted systems. Biochem Pharmacol 37 : 1383-1389, 1988

175- Thaete LG, Crouch RK, Buse MG, Spicer SS : The protective role of copper - zinc superoxide dismutase against alloxan - induced diabetes : morphological aspects. *Diabetologia* 28 : 677-682, 1985

176- Tho LL, Candlish JK, Thai AC : Correlates of diabetes markers with erythrocytic enzymes decomposing reactive oxygen species. *Ann Clin Biochem* 25 : 426-431, 1988

177- Traynham JG : A short guide to nomenclature of radicals, radical ions, ion - oxygen complexes and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv Free Radic Biol Med* 2 : 191-209, 1986

178- Trelstadt RL, Lawley KR, Holmes LB : Nonenzymatic hydroxylations of proline and lysine by reduced oxygen derivatives. *Nature* 289 : 310-312, 1981

179- Ward JF : Some biochemical consequences of the spatial distribution of ionizing radiation - produced free radicals. *Radiat Res* 86 : 185-195, 1981

180- Watala C, Bryszewska M, Stefaniak B, Nowak S : Peroxide metabolism enzymes in diabetic children : relationship to duration and control of diabetes. *Cytobios* 47 : 101-105, 1986

181- Weisiger RA, Fridovich I : Superoxide dismutase : organelle specificity. *J Biol Chem* 248 : 3582-3591, 1971

182- Weiss SJ : Neutrophil - mediated methemoglobin formation in the erythrocyte. The role of superoxide and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 257 : 2947-2953, 1982

183- Weiss SJ, LoBuglio, AF : Phagocyte - generated oxygen metabolites and cellular injury. Lab Invest 47 : 5-18, 1982

184- Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrell RW : The estimation of red cell superoxide dismutase activity. J Lab Clin Med 85 : 337-341, 1975

185- Wolff SP, Dean RT : Fragmentation of polypeptides by free radicals and its effect on susceptibility to proteolysis. Biochem J 234 : 399-403, 1986

186- Wolff SP, Dean RT : Glucose autoxidation and protein oxidation : The role of autoxidative glycosylation in diabetes mellitus and ageing. Biochem J 245 : 243-250, 1987

187- Wolff SP, Garner A, Dean RT : Free radicals, lipids and protein breakdown. Trends in Biochemical Science 11 : 27-31, 1986

188- Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV : Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. Review Article. Free Radic Biol Med 10 : 339-352, 1991

189- Vance PG, Keele BB, Rajayopalan KV : Superoxide dismutase from streptococcus mutans. J Biol Chem 247 : 4782-4786, 1972

190- Ysebeart VM, Vanneste WH : Qualitative resolution of Cu, Zn - and Mn - Superoxide dismutase activities. Anal Biochem 107 : 86-95, 1980



## Ö Z G E Ç M İ Ş

1960 yılında Afyon'da doğdum. Aydın Kuyucak İlkokulu, Aydın Pamukören Ortaokulu ve Ankara Yenişehir Sağlık Meslek Lisesi'nden mezun oldum. 1983 yılında Ege Üni. Fen Fak. Biokimya Anabilim Dalı'ndan mezun oldum. Aynı yıl Boğaziçi Üni. Biomedikal Müh. bölümünde yüksek lisans programını kazandım ve aynı üniversitenin Yabancı Diller Yüksekokulu'nda bir yıl hazırlık sınıfına devam ettim. Askerlik hizmetimi tamamladıktan sonra İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Biokimya Anabilim Dalı'nda 1985 yılında uzmanlık öğrencisi olarak çalışmaya başladım. 1988 yılında uzmanlık eğitimimi tamamladıktan sonra Arş. Grv. olarak doktora eğitimimi sürdürüyorum.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM  
DOKÜMANTASYONU