

70363

T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TİP II DİABETES MELLİTUSLU HASTALARDA
ERİTROSİT İÇİ SÜPEROKSİT DİSMUTAZ, KATALAZ
VE GLUTATYON PEROKSİDAZ DÜZEYLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet KÖSE
Biyokimya Anabilim Dalı

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Yusuf TÜRKÖZ

MALATYA
1997

TEŞEKKÜR

Eğitim s¼remiz boyunca bizden bilimsel desteklerini esirgemeyen ve yoğun çalışmaları arasında tezimin danıŐmanlık g¼revini üstlenen Sayın Yrd. Doç. Dr. Yusuf T¼RKÖZ'e, ayrıca Doç. Dr. Ömer AKYOL'a, aileme ve Hacer ERDOĞAN'a teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	v
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Serbest Radikaller	3
2.1.1. Tanımı	3
2.1.2. Moleküler Oksijen.....	4
2.2. Serbest Oksijen Radikalleri.....	4
2.2.1. Süperoksit Radikali	4
2.2.2. Singlet Oksijen.....	7
2.2.3. Hidroksil Radikali.....	8
2.2.4. Hidrojen Peroksit.....	11
2.3. Serbest Radikallerin Kaynakları.....	13
2.3.1. Biyolojik Kaynaklar.....	13
2.3.2. İntrasellüler Kaynaklar.....	13
2.4. Serbest Radikallerin Etkileri.....	16
2.4.1. Membran Lipitlerine Etkileri.....	16
2.4.2. Proteinlere Etkileri.....	18
2.4.3. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri.....	19
2.4.4. Karbonhidratlara Etkileri	20
2.5. Diabette Serbest Radikallerin Rolü.....	21
2.5.1. Diabette Oksidasyon.....	21
2.5.2. Diabet ve Hızlanmış Yaşlanma.....	23
2.5.3. Glukozun Otooksidasyon ve Amodori Ürünleri.....	23

2.5.4. Diabetik Hasarın Belirleyicileri Olan Pentozidin ve Diğer Floroforlar	24
2.6. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	24
2.6.1. Enzimatik Antioksidanlar.....	26
2.6.1.1. Süperoksit Dismutaz.....	26
2.6.1.2. Glutasyon Peroksidaz.....	28
2.6.1.3. Katalaz.....	29
2.6.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	30
2.6.2.1. Vitaminler.....	30
3. MATERYAL VE METOD	38
3.1. Materyal.....	38
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar Maddeler.....	38
3.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	38
3.2. Metodlar.....	38
3.2.1. Eritrosit Hemolizatlarının Hazırlanması.....	38
3.2.2. Hemoglobın Tayini.....	39
3.2.3. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Tayini.....	40
3.2.4. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Hesaplanması.....	41
3.2.5. Katalaz Aktivitesinin Tayini.....	42
3.2.6. Katalaz Aktivitesinin Hesaplanması.....	43
3.2.7. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Tayini.....	43
3.2.8. GSH-Px Aktivitesinin Hesaplanması.....	45
4. BULGULAR.....	46
5. TARTIŞMA	53
6. ÖZET.....	58
7. SUMMARY.....	59
8. KAYNAKLAR	60

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1: Askorbik asit ve dehidroaskorbik asit	32
Şekil 2: α -tokoferol	34
Şekil 3: Tokoferoksil radikali	36



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1: Tip II Diabetes Mellitus Hastalarda Eritrosit İçi SOD, CAT, GSH-Px Aktiviteleri	46
Tablo 2: Kontrol Grubu Eritrosit içi SOD, CAT, GSH-Px Aktiviteleri	48
Tablo 3: Kontrol ve hasta grubunun ortalama SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri	50
Tablo 4: Kontrol ve hasta grubunun kadınlarda SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri	50
Tablo 5: Kontrol ve hasta grubunun erkeklerde SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri	51
Tablo 6: Kontrol ve Diabet Mellituslu hastaların eritrosit SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinin istatistiksel olarak karşılaştırılmaları (Mann Withney U testi)	52

1. GİRİŞ

Diabetes mellitus, toplumda insidansı yüksek olan bir hastalıktır. Hastalık, insülin salınımının kısmen ya da tamamen aksaması veya insülin reseptörlerinin defekti ile karakterizedir. Diabet, klinik olarak iki grupta toplanmaktadır. Birinci grup İnsüline bağımlı (IDDM) yada tip I diabetes mellitus olarak bilinmekte ve daha çok çocukluk döneminde ortaya çıkmaktadır. İkinci grup ise insüline bağımsız (NIDDM) veya tip II diabetes mellitus olarak tanımlanmakta ve genellikle yetişkinlerde görülmektedir.

Her iki tip diabette de hastalığın iyi kontrol edilememesi ve kronikleşmesi; böbrek yetmezliği, körlük, organ amputasyonları, koroner kalp hastalığı ve iskemik beyin hasarı gibi önemli komplikasyonlara yol açmaktadır. Bu hastalarda karbonhidrat, lipid, protein ve eser element metabolizmasında da önemli değişiklikler meydana gelmektedir.

Serbest radikaller, normal hücre metabolizması sonucu oluşan ve stabil olmayan reaktif moleküllerdir. Fizyolojik şartlarda hücre içinde oluşan serbest radikaller enzimatik (Süperoksit dismutaz, Katalaz, Glutatyon peroksidaz gibi) ve nonenzimatik (vitamin E, A, C, redükte glutatyon gibi) antioksidan mekanizmalar tarafından ortadan kaldırılarak zararsız hale getirilmektedir. Ancak hücrede aşırı serbest radikal oluşumu yani oksidatif stres durumunda antioksidan mekanizmalar yetersiz kalmakta ve zararlı etkiler ortaya çıkmaktadır (1).

Serbest radikaller, tüm hücre komponentleri ile özellikle sülfidril içeren aminoasit ve polidoymamış yağ asitleri ile etkileşerek, proteinlerin denatürasyonuna, polisakkaritlerin depolimerizasyonuna, kollojen sentezinin bozulmasına, deoksiribonükleotidlerin yıkılmasına, yapısal proteinlerin oksitlenmesi ve çapraz bağlanmaları oluşmasına, antiproteazların inhibisyonu sonucu proteolitik enzimlerin aktivasyonuna, hücre membran lipidlerinin peroksidasyonuna yol açmaktadır. Özellikle membran fosfolipidlerinin peroksidasyonu membran akışkanlığının ve geçirgenliğinin azalması, membran bütünlüğünün bozulması sonucu hücre hasarına yol açar. Tüm bu etkiler, serbest radikallerin kanser, romatoid artrit, ateroskleroz, koroner kalp hastalığı gibi ciddi

patolojik durumların da sayılabileceği pek çok hastalığın patogenezinde rol alabileceğini göstermektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, diabetin kronikleştiği durumlarda oksidatif stresin arttığını ve hastalarda nefropati, körlük ve ateroskleroz gibi komplikasyonların meydana geldiğini ortaya koymuştur.

Bu alışma hiç bir kronik komplikasyonu olmayan tip II diabetes mellituslu hastalarda eritrosit içi süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz düzeylerindeki değişimi incelemek amacı ile yapılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. SERBEST RADİKALLER

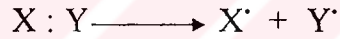
2.1.1. Tanımı:

Serbest radikaller, hücre metabolizması sırasında cereyan eden biyokimyasal reaksiyonlar ile ortaya çıkan, dış yörüngelerinde çiftlenmemiş elektron içeren ve stabil olmayan moleküllerdir (2). Çiftlenmemiş elektron taşıyan bu yapılar kısa sürede daha stabil bir forma dönüşme eğilimi gösterirler.

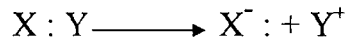
Radikal terimi, kaynağını Yunancada kök anlamına gelen “radiks” kelimesinden alır.

Serbest radikaller 3 yolla meydana gelir.

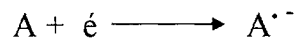
1- Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan biri kalacak şekilde homolitik bölünmesi



2- Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomların birinde kalır. Böylece serbest radikaller değil, iyonlar meydana gelir.



3- Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi



Biyolojik sistemlerde serbest radikaller çoğunlukla elektron transferi sonucu meydana gelmektedir. Serbest radikaller; pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler. Organik ve inorganik moleküller şeklinde bulunabilirler (3).

2.1.2. MOLEKÜLER OKSİJEN

Moleküler oksijen bütün canlılar için gereklidir. Atmosfer oksijen değerinin % 20 artması toksititeye yol açar. Canlılar; moleküler oksijene olan ihtiyaçları ve toleranslarına göre aeroplara, anaeroplara ve fakültatif anaeroplara olmak üzere üç sınıfa ayrılırlar: Aerop canlılar, yaşamlarını devam ettirebilmek için şiddetle oksijene ihtiyaç duyarlar. Bu canlılar için oksijen, elektron taşıyan ve enerji üreten sistemin efektif çalışması için gerekli bir moleküldür.

Zorunlu anaerobik canlılar, moleküler oksijenin varlığına tolerans göstermezler. Fakültatif anaeroplara ise oksijenli ortamlarda yaşayabilseler bile ya oksijeni hiç kullanmazlar veya oksijeni sınırlı bir düzeye kadar metabolize ederler. Fakat hiçbir zaman oksido-redüksiyon tepkimelerinde oksijeni son elektron alıcısı olarak kullanmazlar (4).

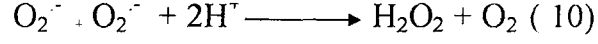
Oksijenin bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlar. Radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girer. Oksijen en son suya indirgenir. Serbest oksijen radikalleri, hem çevresel etkenler hem de organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle kolaylıkla oluşan radikallerdir.

2.2.SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ

2.2.1. Süperoksit radikali (O_2^-):

Moleküller oksijenin bir elektron alıp indirgenmesi ile süperoksit anyon radikali (O_2^-) oluşur. İki elektron alması ile de peroksi anyonu (O_2^{2-}) oluşur (5). Süperoksit, organik çözücülerde kuvvetli bir baz ve nükleofildir. Sulu solüsyon içinde aşırı hidratedir. Sulu solüsyonlardaki süperoksitin orta derecede kimyasal reaktivitesine rağmen, kimyasal ya da enzimatik yolla süperoksit üretiminin biyolojik sistemlerde önemli derecede hasar yaptığı gözlenmiştir. Süperoksit radikali bir oksitleyici gibi davranarak bir elektron daha alabilir, böylece oluşan peroksit anyonu ortamdan iki proton alarak hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturabilir

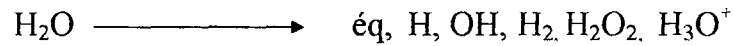
veya süperoksit radikali aldığı elektronu başka bir elektron alıcıya vererek tekrar oksijene oksitlenebilir. Böylece bir indirgeyici (redüktör) olarak davranabilir. Hatta iki süperoksit radikali birbiri ile etkileşerek biri oksitlenirken diğeri ise indirgenir, böylece H₂O₂ ve O₂ meydana gelir (4).



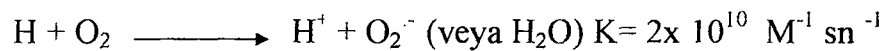
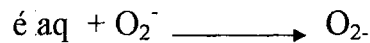
Süperoksit radikallerinin ortamdan temizlendiği reaksiyona, dismutasyon tepkimesi adı verilir. Dismutasyon ya spontan olarak ya da SOD katalizi ile gerçekleşir.

Canlılarda süperoksit radikallerinin oluşumuna neden olan olay ve etkileri iki grupta toplamak mümkündür:

1- Çevrenin etkileriyle süperoksit radikalleri oluşur. Çeşitli kimyasal bileşikler ve fiziksel etkenler süperoksit radikali oluşumuna neden olurlar. Bazı koşullarda görünür bölge ışınları da dahil olmak üzere, özellikle bütün yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar her oksijenli ortamda süperoksit radikalleri oluştururlar. Yüksek enerjili ışınlardan, özellikle beta, gama ve x ışınları süperoksit radikalinin yanı sıra, doğrudan diğer radikallerin oluşumunu da sağlarlar. Böyle bir dalga, sulu ortamdan geçince suyun radyolitik parçalanmasına neden olmaktadır (6).



Sulu ortam oksijen içeriyorsa aşağıdaki tepkimelerle süperoksit radikali kolaylıkla oluşabilir.



Organik moleküllerin bulunduğu sulu ve oksijenli ortamda radikal oluşumu iki kat daha artar (7).

2- Canlı organizmalar, radikal oluşumuna neden olan çevre koşullarından tümüyle yalıtılsalar bile, eğer moleküler oksijeni metabolize ediyorlar ise organizmalardaki pek çok tepkimelerle O_2^- üretirler. Canlılarda süperoksit anyonu üreten başlıca tepkimeler şunlardır.

- a) Hidrokinonların, lökoflavinlerin ve katekolaminlerin, tiollerin, indirgenmiş boya­ların, tetrahidropteridin, ferrodoksin ve hemoproteinlerin otooksidasyon tepkimelerinde süperoksit radikali üretilebilir.
- b) Çeşitli enzimatik tepkimelerde süperoksit radikali oluşabilir. Bu enzimlere ksantin oksidaz, dihidrooratat dehidrogenaz ve bir grup flavoprotein dehidrogenazlar örnek verilebilir.
- c) Bazı oksidaz ve hidroksilaz enzimleri de katalitik etkileri sırasında ara ürün olarak süperoksit radikali üretirler. Bunlara mikrozomal hidroksilazlar, triptofan dioksijenaz, galaktoz oksidaz örnek verilebilir.
- d) Canlılarda süperoksit radikallerinin üretildiği bölgelerin başında mitokondri gelir. Moleküler oksijenin en önemli kullanım yerinin mitokondri iç zarındaki elektron transport sistemi olduğu hatırlanırsa, radikal üretimi beklenen bir neticedir (6, 8). Mitokondrideki oksijen tüketiminin çok büyük bir kısımdan elektron transport sistemi sorumludur, ve sistemdeki son elektron alıcısı oksijendir. Mitokondri elektron transport sisteminde O_2^- üreten iki bölgenin bulunduğu gösterilmiştir. Bunlardan birincisi bir flavoprotein olan NADH dehidrogenazdır. Mitokondri zarında üretilen süperoksit radikallerinin üçte biri bu bölgeden kaynaklanmaktadır. İkinci bölge ise koenzim Q-sitokrom b bölgesi olup ubikinonun otooksidasyonu ile elektron transport sisteminde üretilen

süperoksit radikallerinin üçte ikisini oluştururlar. Elektron transport sisteminde kullanılan oksijenin % 1-5'i süperoksit oluşumu ile sonuçlanır.

e) Önemli ölçüde süperoksit radikalleri fagositoz sırasında fagositoz yapan hücreler tarafından (nötrofil, eozinofil ve makrofajlar) enzimatik olarak üretilirler (8).

2.2.2. Singlet Oksijen (1O_2)

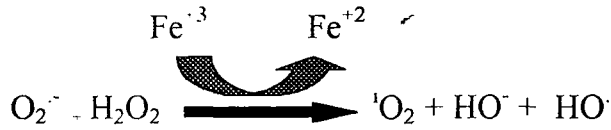
Moleküler oksijenin dış iki orbitalinde paralel spinlere sahip olan iki elektrondan birinde salınım sınırlamalarının kalkması sonucu, moleküler oksijenin iki elektronu ayrı ayrı veya aynı orbitali işgal edebilir. Oksijenin uyarılmış bu iki formuna singlet oksijen (1O_2) denir (2).

Bu iki formu olan singlet oksijenin bir tanesi çok kısa ömürlü olan “sigma singlet oksijen”, diğeri ise biyolojik olarak daha uzun olan “delta singlet oksijen” formudur. Singlet oksijenin delta formunda ($^1\Delta_gO_2$) iki elektron aynı orbitalde bulunur ve spinleri birbirine zıttır, diğeri orbital boştur. Singlet oksijeninin sigma formunda ($^1\Sigma_gO_2$) ise iki elektron ayrı ayrı orbitallerdedir. Ve spinler kendi enerjilerini birbirlerine enerjisini ışık enerjisi halinde vererek eski durumlarına dönebilirler.

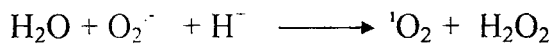
Singlet oksijenin oluşumuna neden olan bazı mekanizmalar şunlardır.

a) Dioksijen üzerinde pigment aracılı ışık aktivitesi ile,

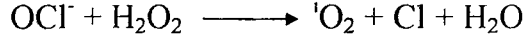
b) Fe katalizli Haber-Weiss reaksiyonu ile,



c) Süperoksitin spontan dismutasyonu ile,



d) Fagositoz yapan hücrelerde fagositoz sırasında H_2O_2 ve halojen bağımlı myeloperoksidaz enzimi ile,



e) O_2^- ile OH^- etkileşmesi ile,

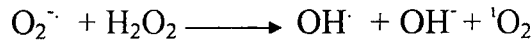


f) Süperoksit radikallerinin diaçilperoksitlerle tepkimesinde singlet oksijen oluşmaktadır.

Karotenler, bilirubin, histidin, methionin ve bazı kimyasal bileşikler singlet oksijeni temizleyerek, singlet oksijen bağımlı tepkimeleri inhibe ederler. Bu inhibitör bileşikler olay sırasında oksitlenmezler ve tüketilmezler (9).

2.2.3. Hidroksil Radikali (OH^-)

Haber ve Weiss, 1934 yılında hidrojen peroksidin O_2^- ile indirgenmesiyle hidroksil radikali oluşabileceğini göstermişlerdir.



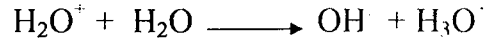
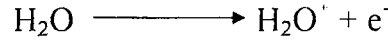
Araştırmacılar canlılarda fizyolojik olarak önemli miktarda HO^- üretilmediğine inanıyorlardı. Çünkü O_2^- nin H_2O_2 ile etkileşiminin hız sabitinin süperoksit radikallerinin kendiliğinden dismutasyonu ile yarışamayacağını kabul ediyorlardı.

1978 yılında redoks katalizörü olarak görev yapan bir metal, örneğin şelat yapmış demir varlığında Haber-Weiss tepkimesinin biyolojik sistemlerde de çalıştığı ve önemli miktarda HO^- üretildiği gösterildi.

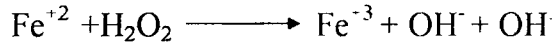
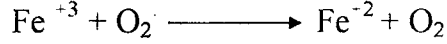
İnvivo olarak hidroksil radikali yapımına neden olabilen önemli tepkimeler şunlardır:

1- İyonlaştırıcı radyasyonun suya etkisi ile,

$h\nu$



2- Fenton tepkimesi ile,



Fenton tepkimesi belirli bir liganta bağlı demir kompleksi ile meydana gelir (5).

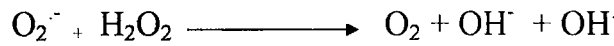
3- Ozona elektron transferi ile OH^\cdot oluşabilir. Ozon toksisitesinde OH^\cdot 'nin rolü olduğu bilinmektedir.

4- Hidrojen peroksitin fotolizisi ile,

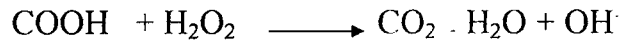


5- Haber- Weiss tepkimesi ile,

Fe- kompleksi

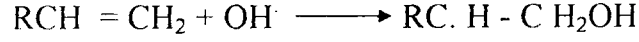


6- Radikal tepkimeleri ile oluşabilen bir organik radikal, H_2O_2 ile tepkimeye girerek hidroksil radikali üretebilir.

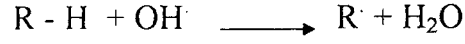


Oksijen radikalleri içinde en reaktif olanı, reaktivitesinden dolayı da en toksik olanı hidroksil radikaldır. Hidroksil radikali üretildiği yerde hemen her tür molekül ile tepkimeye girebilir ve radikal tepkimelerini başlatabilir. Hidroksil radikalının katıldığı başlıca tepkimeler 5 grupta toplanabilir.

1- OH[·] ekleme reaksiyonları;



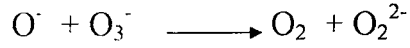
2- Hidrojen çıkarma reaksiyonları;



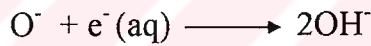
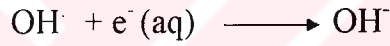
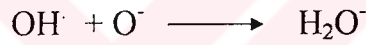
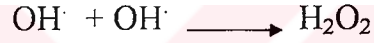
3- Elektron nakil reaksiyonları;



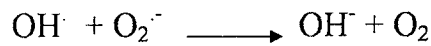
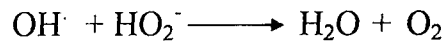
4- Atom ve yük nakli reaksiyonları;



5- a) Radikal - Radikal reaksiyonları;

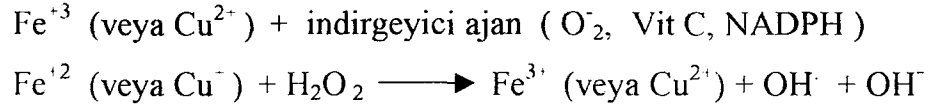


b) Dismutasyon reaksiyonları;



Hidroksil radikalının yüksek reaktivitesi nedeniyle istenmeyen toksik etkilerinin yanısıra, üretimleri normal biyolojik fonksiyon içinde gereklidir. Fagositoz ve pek çok enzimatik katalizin zorunlu bir parçası olarak OH[·] üretilir ve kataliz olayına doğrudan katılır (10).

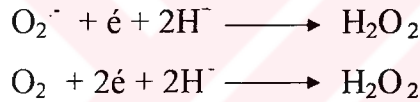
Bazı kimyasal bileşikler, canlıda radikal yapımına neden oldukları için toksik etkilidirler. Hidroksil radikalının yapım mekanizması esas olarak şöyledir.



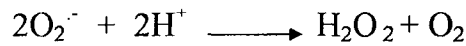
Görüldüğü gibi süperoksit radikalinin elektron verici olduğu tepkime (Haber-Weiss tepkimesi) dışında da biyolojik moleküller metal iyonlarını indirgeyerek, H₂O₂ varlığında OH⁻ yapımını sağlamaktadır (11).

2.2.4. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksitin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü 2 hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksiti (H₂O₂) meydana getirir. H₂O₂ membranlardan kolayca geçebilen, uzun ömürlü bir oksidandır (12,13).



Ancak, biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin asıl üretimi süperoksitin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü iki proton olarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden buna dismutasyon reaksiyonu adı verilir.

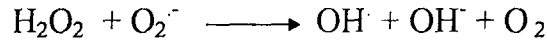


Bu dismutasyon ya spontandır ya da süperoksit dismutaz enzimi tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyon pH 4.8'de minimal düzeyle gerçekleşir. Bu pH'da protonlanmış ve protonlanmamış radikal konsantrasyonları eşittir. Fakat, hem protonlanmış radikalın arttığı daha asit pH'da hem de süperoksit iyonunun fazla olduğu alkali pH'da bu hız belirgin şekilde düşüktür (14). Süperoksitin süperoksit dismutaz tarafından dismutasyonu ise daha geniş bir pH aralığında

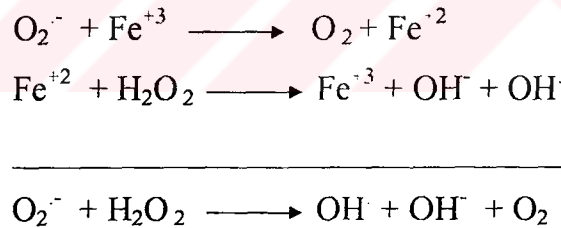
katalizlenir. Özellikle spontan dismutasyonun nisbeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH'da enzimatik dismutasyon daha belirgindir.

Hidrojen peroksit, açığa süperoksit çıkmadan oksijenin direkt divalen reaksiyonu ile de oluşabilir.

Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli rol oynar. Çünkü süperoksit ile reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir.



Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir. Haber-Weiss reaksiyonu ya katalizör varlığında ya da katalizörsüz cereyan edebilir. Fakat, katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Demirle katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır. Bu reaksiyonda önce ferri demir (Fe^{+3}) indirgenir (15, 7). Sonra bu ferro demir kullanılarak "fenton reaksiyonu" ile hidrojen peroksitten OH^\cdot ve OH^- üretilir. Reaksiyon mekanizması aşağıdaki şekildedir.



Görüldüğü gibi süperoksit, hem hidrojen peroksit kaynağı hem de geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisidir. İndirgenmiş geçiş metalleri (demir ve bakır gibi) okside şekillerine göre hidrojen peroksitle daha reaktiftirler.

EDTA gibi bazı şelatör ajanlar hidroksil radikal oluşumunu, Haber-Weiss reaksiyonu yoluyla stimüle ederken, dietilentriamin pentaasetik asit (DTPA) gibi bazıları ise inhibe ederler. EDTA, demir iyonlarının lipit peroksitler ile reaksiyon hızını düşürür (16).

2.3. SERBEST RADİKALLERİN KAYNAKLARI

2.3.1 Biyolojik Kaynaklar

- a) Aktive olmuş fagositler (Respiratory Burst),
- b) Antineoplastik ajanlar (Nitrofurantoin, bleomisin, doxorubicine ve adriamicine)
- c) Radyasyon,
- d) Alışkanlık yapan maddeler: Alkol ve uyuşturucular,
- e) Çevresel ajanlar, (hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, hiperoksi pestisidler, sigara dumanı, solventler, aneztezükler, aromatik hidrokarbonlar)
- f) Stres: Streste katekolamin düzeyi artar. Katekolaminlerin oksidasyonu ise serbest radikal kaynağıdır. Bu olay stresin hastalıkların patogenezindeki rolünün serbest radikal üretimiyle ilgili olabileceğini göstermesi bakımından önemlidir (17).

2.3.2. İntrasellüler kaynaklar

- Küçük moleküllerin otooksidasyonu:Tioller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidroproteinler, antibiyotikler.
- Enzimler ve proteinler: Ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, hemoglobin
- Mitokondrial elektron transportu.
- Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri (sitokrom p-450, sitokrom b₅).
- Peroksizomlar: oksidazlar, flevoproteinler.
- Plazma membranı: Lipoksijenaz, prostaglandin sentetaz, fagositlerde NADPH oksidaz, lipit peroksitasyonu
- Oksidatif stres yapıcı durumlar : iskemi, travma, intoksikasyonlar (18, 17).

İyonizan radyasyonun etkisi gibi nadir durumlar dışında, serbest radikaller genellikle hücrelerde elektron transfer reaksiyonlarıyla meydana gelirler. Bu

reaksiyonlar ya enzimlerin etkisiyle ya da nonenzimatik geçiş metal iyonlarının redoks kimyası aracılığı ile cereyan eder.

Normalde hücreserde en büyük serbest radikal kaynağı, elektron transport zincirinden elektron sızıntısıdır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondrial süperoksit radikal üretimi artar. Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda ise serbest radikal üretimi membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır.

Bir çok enzimin katalitik siklusları sırasında da serbest radikaller açığa çıkar. Bu enzimlerden biri ksantin oksidaz olup normalde NAD- bağımlı dehidrogenaz olarak görev yapar ve herhangi bir serbest radikal üretimine sebep olmaz. Fakat, invivo olarak oluşturulan iskemi, enzimin dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüşmesine ve süperoksit radikalinin üretimine neden olur (13, 19).

Aldehit oksidaz yapı itibariyle ksantin oksidaza benzer ve substratlarının çoğu aynı olup, süperoksit radikali üretir. Benzer şekilde dihidroorotat dehidrogenaz, flavoprotein dehidrogenaz, amino asit oksidaz ve triptofan dioksijenaz gibi enzimler de radikal oluşmasına sebep olur.

Aktive olmuş fagositler, bakterisidal rollerinin sonucu olarak süperoksit üretirler.

Peroksizomlar, çok önemli hücre içi H₂O₂ kaynağıdırlar. Bu organeldeki D-amino asit oksidaz, urat oksidaz, L-hidroksil asit oksidaz ve yağ asiti açıl-CoA oksidaz gibi oksidazlar süperoksit üretmeden, bol miktarda H₂O₂ üretimine sebep olurlar. Ancak, peroksizomlarda katalaz aktivitesi de çok yüksek olduğu için bu organelden sitozole ne kadar H₂O₂ geçtiği bilinmemektedir.

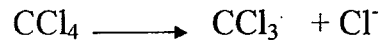
Hayvan hücrelerinde süperoksitin bir başka kaynağı da, askorbik asit, tioller (glutasyon, sistein gibi) adrenalın ve flavin koenzimleri gibi bazı bileşiklerin otooksidasyonudur (20).

Hücreserde serbest radikal üretimi, bazı yabancı toksik maddeler tarafından da büyük oranda arttırılabilir. Bu maddeler ya doğrudan serbest radikal üretirler veya antioksidan aktiviteyi düşürürler (9). Bu tip maddeler dört grupta toplanabilirler.

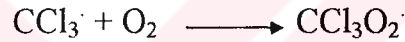
1- Toksinin kendisi bir serbest radikaldir. Kirli havanın koyu rengini veren azot dioksit (NO_2) gazı böyle bir maddedir. Azotdioksit lipid peroksidasyonunu tetikleyen bir radikaldir.



2- Toksin bir serbest radikale metabolize olur. Mesela, toksik bir madde olan karbontetraklorür karaciğerde sitokrom p-450 tarafından triklorometil serbest radikale dönüştürülür.



Bu radikalın oksijenle reaksiyonu sonucu meydana gelen peroksil radikali de kuvvetli bir lipid peroksidasyonu başlatıcısıdır.



Böylece, reaktif serbest radikal üretimi, karaciğerde antioksidan savunmaları aşar. Bu da selüler membranların oksidatif yıkımı ve ciddi doku hasarı ile sonuçlanır.

3- Toksinin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelir. Bunun tipik bir örneği paraquatdır. Özellikle karaciğerde biriken paraquat, bir serbest radikale indirgendikten sonra tekrar yükseltgenerek rejenere edilirken beraberinde oksijen indirgenir. Böylece bol miktarda süperoksit üretilmiş olur. Diabetik bir ajan olan alloksan da paraquat gibi etki eder.

Yine antikanserojen bir madde olan doxorubicin, DNA replikasyonunu inhibe ederken muhtemelen önemli miktarda süperoksit ve hidroksil radikali üretimine sebep olur.

4- Toksin, antioksidan aktiviteyi düşürür. Meselâ, parasetamolün karaciğerde sitokrom p-450 tarafından metabolizması glutatyonla reaksiyona giren ve miktarını azaltan bir ürün meydana getirir (21).

Bir heme proteini olan sitokrom p-450, bir çok endojen bileşiğin ve ksenobiyotiğin (xenobiotic) hidroksilasyonunu katalize eder.

Bu reaksiyonlarda oksijen kaynağı olarak moleküler oksijen kullandığı gibi peroksitleri (ROOH) de kullanılabilir. Böylece bir peroksidaz gibi etki eder. Ancak, alkol ve asetonla indüksiyonda olduğu gibi bazı hallerde, sitokrom p-450 aşırı miktarda süperoksit üreten bir izoenzime dönüşür.

2.4. SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ

Serbest radikaller, hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Mitokondrideki aerobik solunumu ve kapiller permeabilityyi bozar, hücrenin potasyum kaybını ve trombosit agregasyonunu artırır.

Proteaz, fosfolipaz, elastaz, siklooksijenaz, ksantin oksidaz, lipooksijenaz, triptofan dioksijenaz ve galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktifleştirirken alfa-1-antitripsin gibi bazı savunma sistemlerini inaktive ederler (22). Serbest radikallerin bu etkileri aşağıda başlıklar halinde açıklanmıştır.

2.4.1 MEMBRAN LİPİTLERİNE ETKİLERİ (LİPİD PEROKSİDASYONU)

Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştuğu zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları serbest radikaller tarafından etkilenirler, fakat lipidler en hassas olanlarıdır.

Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansature yağ asitleri (poly unsaturated fatty acid-PUFA)'nın oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü, kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür (8).

Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan poliansature yağ asiti zincirinden bir hidrojen atomu

uzaklaştırılması ile başlar. Bunun sonucu yağ asiti zinciri bir lipid radikali niteliği kazanır. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle konjugatlar ve daha sonra lipid radikalinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksil radikali meydana gelir. Lipid peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer poliansature yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlere dönüşürler. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder.

Lipid peroksidasyonu ya toplayıcı reaksiyonlarla sonlandırılır ya da otokatalitik yayılma reaksiyonlarıyla devam eder.

Plazma membranı ve organel lipid peroksidasyonu, daha önce bahsedilen serbest radikal peroksidasyonu, serbest radikal kaynaklarının hepsiyle stimüle edilebilir ve metallerin varlığında artar.

Bu metaller redoks katalizli olarak görev yaparlar ve hidrojen peroksitin daha güçlü oksidanlara dönüşümünü katalizlerler (22).

Lipidlerden, araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine “enzimatik lipid peroksidasyonu”, diğer radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna ise “non-enzimatik lipid peroksidasyonu” adı verilir.

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksitlerinin yıkımı, geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Lipid hidroperoksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehidler oluşurlar. Bu bileşikler, ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine yayılarak hasar yaparlar. Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiobarbütirik asitle ölçülebilen malondialdehit (MDA) meydana gelir. Bu metod lipid peroksit seviyelerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır. MDA, yağ asiti oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir. Fakat lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir (23).

Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehidler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece, bir çok hastalığa ve doku hasarına sebep olur (24).

Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması yüzünden reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerde meydana gelir. Membran permeabilitesi ve mikroviskositesi ciddi şekilde etkilenir. Peroksidasyonla oluşan malondialdehid, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler, malondialdehitin niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar (25).

2.4.2. PROTEİNLERE ETKİLERİ

Proteinler serbest radikallerin etkisine karşı, PUFA'dan daha hassastırlar. Ancak, başlayan zarar verici zincir reaksiyonlarının ilerleme ihtimali daha azdır. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme dereceleri amino asit kompozisyonlarına bağlı olarak değişir.

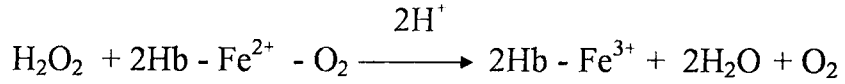
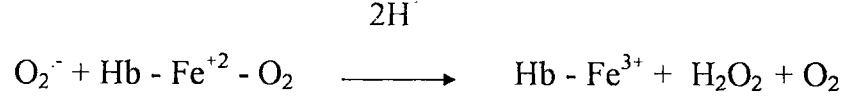
Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler (26). Özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana gelir. Bu reaksiyonlar sonucu immünglobulin G ve albumin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozular. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Nitekim, serum proteinlerinde, kataraktlı lens proteinlerinde ve inflamatuvar eklem hastalığı olan kişilerin sinoviyal sıvı IgG'lerin de serbest radikal hasarı tespit edilmiştir.

Yine, serbest radikallerle muamele edilen IgG'lerin romatoid faktör antikorları ile bağlanmalarının arttığı görülmüştür. Serbest radikal ve immün kompleks oluşumu arasındaki bu karşılıklı etkileşme, romatoid artritteki inflamasyonun bazı özelliklerini kısmen açıklamaktadır.

Sitoplazmik ve membran proteinleri ozon ve protoporfirin IX gibi okside edici ajanlara maruz kaldıktan sonra çapraz bağlanarak dimerleşir veya daha büyük agregatlara dönüşürler. Prolin ve lizin, süperoksit radikali üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler. Proteinler üzerine

olan serbest radikal hasarı birikmişse ya da belirgin proteinlerin spesifik bölgesi üzerinde yoğunlaşmışsa hücrenin canlılığı bakımından zararlı etki yapabilir (27).

Heme proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin O_2^- veya H_2O_2 ile reaksiyonu methemoglobin oluşumuna sebep olur.



2.4.3. NÜKLEİK ASİTLER VE DNA'YA ETKİLERİ

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Sitotoksikite, büyük oranda, nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçer ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Bu yüzden DNA, serbest radikallerden kolay etkilenen bir yapıdır ve önemli bir hedefdir (28). Asite maruz kalan DNA molekülleri hayvanlara enjekte edildiklerinde daha fazla antijenik özellik gösterirler ki bu oldukça önemli bir etkidir. Çünkü otoimmün bir hastalık olan sistemik lupus eritematozis (SLE)'de ve romatoid artrit (RA)'de dolaşımda anti-DNA antikörleri bulunur. SLE'li hastaların supressor hücrelerinde bir kusur bulunduğu kaydedilmiştir. Aynı durum, RA'lı hastaların sinoviyal sıvılarındaki (periferik kanda değil) supressor hücreler için de geçerlidir.

T lenfositler genelde serbest radikal saldırısına karşı daha hassastır. İn vitro deneylerde serbest oksijen radikallerinin, T-supressor hücreleri için T-helper hücrelerine göre daha sitotoksik oldukları gösterilmiştir. Bu bulgular, serbest

radikal reaksiyonlarının, immün supressor hücrelerin otoimmün reaksiyonları kontrol etmelerini engelleyebilecekleri tarzındaki görüşleri desteklemektedir.

2.4.4. KARBONHİDRATLARA ETKİLERİ

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Monosakkaridlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehidler meydana gelir. Bunlar diabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklar gibi patolojik proseslerde önemli rol oynarlar (29).

Okzoaldehidler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece, kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar.

PUFA ve karbonhidrat oksidasyonunun bir ürünü olan glyoxal'in hücre bölünmesini inhibe ettiği kaydedilmiştir.

Bağ dokusunun önemli bir mukopolisakkaridi olan hyalüorik asit, sinoviyal sıvıda bol bulunur. İnflamatuvar eklem hastalıklarında sinoviyol sıvıya çok sayıda polimorf hücreler geçer ve muhtemelen immün komplekslerle aktivasyonları sonucu ekstraselüler sıvıya H_2O_2 ve O_2^- salgırlarlar. Bu radikallerin invitro şartlarda hyalüronik asiti parçaladıkları gösterilmiştir. Hyalüronik asit parçalanması inflamatuvar eklem hastalıklarında sinoviyal sıvının karakteristik bir özelliğidir.

Gözün vitreous humour'unda da bol miktarda hyalüorik asit bulunur. Bunun da oksidatif hasarı katarakt oluşumuna katkıda bulunur (8).

Serbest radikaller, bu kabil etkilerinden dolayı çok çeşitli hastalıkların patogenezinde önemli rol oynarlar. Diabet ve diabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, psoriasis, romatoid artrit, behçet hastalığı, çeşitli deri, kas ve göz hastalıkları, kanser ve yaşlılık gibi bir çok hastalıkta serbest radikal üretiminin arttığı ve antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir. Ancak, bu hastalıkların çoğunda serbest radikallerin hastalığın sebebi mi yoksa bir sonucu olarak mı meydana geldikleri tam olarak bilinmemektedir (9).

2.5. DİABETTE SERBEST RADİKALLERİN ROLÜ

2.5.1. DİABETTE OKSİDASYON

Oksidatif stres, diabet ve diabetin daha sonraki komplikasyonlarının patogeneğinde önemli bir rol oynar. Nonenzimatik glikozilasyon, otooksidatif glikozilasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yolu aktivitesi, inflamatuvar mediatörlerinin düzeyleri ile antioksidan savunma sistemindeki değişiklikler, hipoksi ve iskemik reperfüzyon hasarı sonucu oluşan lokalize doku hasarı, diabette oksidatif stresi arttıran mekanizmalardır.

Diabetli kişilerde plazma ve doku lipid peroksitasyon ürünlerinin aynı yaştaki sağlıklı kişilerden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Retinopatili ve anjiopatili NIDDM'li hastalarda da TBA reaktivitesinde (lipid peroksidasyonu ürünlerinde) artış görülmüştür (30).

Diabette, özellikle vasküler komplikasyonları olan hastalarda lipid metabolizmasında belirgin değişiklikler oluşmaktadır. Özellikle LDL'nin oksidasyona eğilimi artar. Bu kişilerde, plazma lipoproteinleri ile hücre membranındaki lipid oksidasyonuna, yaygın vasküler hastalıklar eşlik eder. Bununla beraber, yapılan epidemiyolojik çalışmalara göre, plazma lipid peroksit düzeyi diabetten çok doğrudan vasküler hastalığın kendisi ve hipertrigliseridemi ile ilgilidir.

Hiperlipidemik diabetik ratlarda lipid peroksidasyonu oranının yüksek olduğu bulunmuştur. Fakat, lipofilik bir antioksidan olan probukol, hem lipid peroksidasyonu hem de okside lipidlerin toksisitesini inhibe ettiği halde hiperlipidemiye etki etmez. Probukol non-diabetik hiperlipidemik tavşanlarda da ateroskleroz gelişimini inhibe eder. Bu bulgular, diabet ve hiperlipideminin vasküler hastalığa sebep olmada yalnız başına yeterli olmadığını, oksidatif stresin, vasküler hastalığın gelişiminde bağımsız bir risk faktörü olabileceğini göstermektedir (31).

Diabette; plazma lipoproteinlerinde, eritrosit membran lipidlerinde ve çeşitli dokularda lipid peroksidasyonunun arttığına dair çok sayıda çalışma bulunmakla

beraber bu artışa enzimatik (araşidonik asit yolu) ve nonenzimatik (otooksidatif) lipid peroksidasyonundan hangisinin daha çok sorumlu olduğu bilinmemektedir. Ancak, hem lipoksijenaz yolu ile prostaglandinlerden hem de süperoksit ve hidrojen peroksit etkisi sonucu nonenzimatik yolla diğer lipidlerden lipid peroksidlerinin meydana geldiği sanılmaktadır. Lipoksijenaz yolu, yaygın vasküler inflamasyon sonucu aktifleşir. Süperoksit ve hidrojen peroksit metal iyonlarının etkisi sonucunda da dolaşımında, ekstrasvasküler boşlukta veya endotelyal ve fagositik hücrelerinin membranlarında bulunan lipidlerden nonenzimatik yolla lipid peroksitleri meydana getirebilirler. Daha sonra lipoksijenaz yolu ürünleri non-enzimatik yolu, non-enzimatik yol ürünleri de lipoksijenaz yolunu aktive ederek lipid peroksitlerinin üretimini arttırmaları. Sonuçta, her iki yol karşılıklı olarak birbirlerini etkilemiş olmaktadır.

Aspirin verilmesinden sonra birkaç saat içinde tavşan plazmasında total lipid peroksitlerinde belirgin azalma olduğu gösterilmiştir. Benzer deneyler insanlarda yapılmamış olmakla beraber, bu bilgiler diabette hem enzimatik hem de nonenzimatik yolla lipid peroksidasyonunun meydana geldiğini ve lipid peroksidasyonunun antiinflamatuvar ajanlara karşı hassas olduğunu göstermektedir. Öte yandan, diabet komplikasyonlarında lipidlere ilaveten protein oksidasyonu da artar. Özellikle, ekstraselüler proteinlerden kollajen, elastin laminin, kristalin ve myelin kılıfındaki proteinlerde meydana gelen değişiklikler katarakt, mikroanjyopati, ateroskleroz ve nefropati gibi diabetik komplikasyonlarda önemli rol oynar.

Artmış lipid peroksidasyonunun, diabet komplikasyonlarının bir sonucu ya da sebebi olup olmadığı tam olarak bilinmemektedir. Ancak, lipid peroksidasyonunun, devamlı bir siklus olan oksidatif stres ve hasarın bir parçası olduğuna inanılmaktadır. Yani, lipid peroksidasyonu doku hasarını doku hasarı da lipid peroksidasyonunu artırır (32).

Lipid peroksidatif hasarı sadece lipid kısmıyla sınırlı değildir. Çünkü lipid peroksitleri kollajende de değişikliklere ve proteinlerde floresans gelişimine sebep olur. Öte yandan, diabette kollajen ve plazma proteinlerinin artmış glikozilasyonu (glikasyonu) da lipidlerin oksidasyonunu stimüle edebilir. Bu da, hem şekerlerin otooksidasyonunu hem de dolaşımdaki ve damar duvarındaki protein ve lipid

hasarını arttırır. Böylece, oksidatif stres ve doku hasarındaki karşılıklı etkileşme artarak devam eder (25).

2.5.2. DİABET VE HIZLANMIŞ YAŞLANMA

Diabette arterler ve eklemler erken sertleşir. Akciğerlerin hem vital kapasitesi hem de elastikliği erken azalır. Kollajenden kaynaklanan floresans yaşla arttığı gibi diabetle daha da artar. Komplikasyonu olan hastalarda bu artış hızlanır. Hiperglisemili hasta kanı invitro şartlarda kollajenle inkübe edildiğinde, kollegenin rengi esmerleşir, floresans olur, yapısında çapraz bağlar meydana gelir, ve gerilme özellikleri değişir. Bu olaylarda geçiş metallerinin katalizlediği oksidatif reaksiyonlar önemli rol oynarlar.

2.5.3. GLUKOZUN OTOOKSİDASYONU VE AMADORİ ÜRÜNLERİ

Çalışmalar, glukozun, proteinlerdeki amino grublarıyla reaksiyona girdiğini göstermektedir. Bu reaksiyonda önce bir Schiff bazı oluşur, sonra Amadori düzenlenmesi ile stabil ürünler meydana gelir. Böylece proteinin yükü ve konformasyonu değişir. Bundan başka, glukoz diğer a-hidroksialdehidler gibi enolize olarak ve fizyolojik şartlarda geçiş metallerinin katalizörlüğünde moleküler oksijeni indirgeyerek ketoaldehid ve okside edici ara ürünler oluşturur. Glukozun otooksidasyonu yavaş bir şekilde meydana gelen serbest radikaller ve hidrojen peroksitin invitro şartlarda glukozla muamele edilmesi ile proteinlerde yapısal hasar meydana gelmektedir. Mesela, invitro fizyolojik şartlar altında glukozla maruz kalan sığır serum albumininde meydana gelen konformasyonel değişiklikler metal şelatlayıcı ajanlar (diethylentriaminpenta asetik asit gibi) ve hidroksil radikal toplayıcıları tarafından inhibe edilir. Bundan dolayı oksidatif reaksiyonlar, glukozla bağlı protein değişikliklerinin oluşmasında önemlidirler. LDL'nin in vitro glukozla maruz kaldığında yoğun şekilde peroksidasyona uğradığı gösterilmiştir (33).

Amadori ürününün kendisi de okside olarak, eritronik asit salgısına ve karboksimetillenmiş lizin kalıntılarının (CML) oluşumuna sebep olur. CML düzeyi,

diabetiklerin deri kollageninde diabetik olmayanlardan iki kat daha yüksektir ve retinopati ve nefropati varlığı ile pozitif korelasyon gösterir. CML, çok düşük konsantrasyonlarda olmasına rağmen (total lizin grublarının % 1'inden daha az) geçiş metallerinin katalizlediği reaksiyonların in vivo şartlarda meydana geldiği hipotezinin güçlü bir göstergesidir. Bu yüzden CML birikimi, hem okside olabilen bir substratın birikimini (diabette ve yaşlanmada Amadori ürününün birikmesi gibi) hem de oksidasyonu katalizleyebilir formdaki geçiş metali düzeyindeki artışı gösterir (34).

2.5.4. DİABETİK HASARIN BELİRLEYİCİLERİ OLAN PENTOZİDİN VE DİĞER FLOROFORLAR

Pentozidin; pentoz, arginin ve lizinden kollagen üzerinde oluşan yüksek derecede floresans gösteren çapraz bağlı bir bileşiktir. Bu bileşik, ribozdan başka, geçiş metalinin katalizlediği bir dizi oksidasyon ve dekarboksilasyon reaksiyonları sonucu, glukoz, fruktoz ve hatta askorbattan da oluşabilir. Pentozidin yaşla arttığı gibi, diabette daha da artar. Fakat yine de çok düşük miktarlarda bulunur. Bu düşük miktarlarına rağmen, diabetik hastalarda deri kollagen pentozidini retinopati ve nefropati varlığı ile pozitif korelasyon gösterir ve lensdeki nontriptofan floresansın yaklaşık % 40'ını oluşturur (30).

2.6. ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar “antioksidan savunma mekanizmaları” veya kısaca “antioksidanlar” olarak bilinirler. Antioksidanlar, peroksitasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksitasyonunu inhibe ederler. Antioksidanlar, doğal (endojen kaynaklı) ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilirdiği gibi serbest radikalın meydana gelişini

önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde de ikiye ayrılabilirler. Ayrıca enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılırlar. Hücrelerin hem sıvı hem de membran kısımlarında bulunabilirler (32).

DOĞAL (ENDOJEN) ANTIOKSİDANLAR

Enzimler

- Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi
- Süperoksit dismutaz
- Katalaz
- Glutasyon Peroksitaz
- Glutasyon- S-transferaz
- Hidroperoksitaz

Enzim olmayanlar

a- Lipid fazda bulunanlar

α - tokoferol (E-vitamini)

β - karoten

b- Sıvı fazda (hücre sitozolünde veya kan plazmasında) bulunanlar

askorbik asit

melatonin

Ürat

Sistein

Seruloplazmin

Transferin

Laktoferrin

Miyogloblin

Hemogloblin

Ferritin

Metionin

Albumin

Bilirubin

Glutasyon

ANTIÖKSİDAN ETKİ TİPLERİ

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler:

- 1- Toplayıcı etki (scavenging etki)
- 2- Bastırıcı etki (quencher etki)
- 3- Onarıcı etki (repair etki)
- 4- Zincir kırıcı (chain breaking etki)

Serbest oksijen radikallerinin etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine toplayıcı etki denir. Antioksidan enzimler, trakeo-bronşial mukus ve küçük moleküller bu tip bir etki gösterirler.

Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren olaya bastırıcı etki adı verilir. Vitaminler, flavanoidler, trimetazidin ve antisiyanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

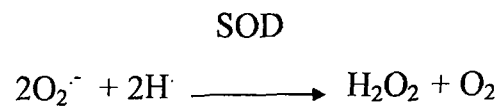
Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye zincir kırıcı etki denir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.

Antioksidanların lipid peroksitasyon basamaklarındaki etkileri göstermiştir (35).

2.6.1. ENZİMATİK ANTIÖKSİDANLAR

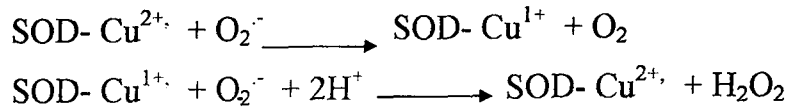
2.6.1.1. Süperoksit Dismutaz

İlk olarak 1968 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanan süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1, SOD) enzimi süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Sellüler bölmelerdeki süperoksit düzeylerini kontrol etmede önemli bir rol oynar (36).



SOD'nin katalize ettiği reaksiyonun hızı spontan reaksiyonun yaklaşık 4000 katıdır. İnsanda SOD'nin iki tipi bulunmaktadır. Bunlar, sitozolde bulunan dimerik, Cu ve Zn ihtiva eden izomer (Cu-Zn SOD) ile mitokondride bulunan tetramerik Mn ihtiva eden izomerdirler (MnSOD). Genel olarak hücrede en bol bulunan izomer sitozolik Cu-Zn SOD'dir. Cu-Zn SOD 21 nolu kromozomda, Mn-SOD 6 nolu kromozomda lokalizedir. Sitozolik Cu-Zn SOD siyanidle inhibe edilirken, mitokondrial Mn SOD inhibe olmaz. Her iki SOD'nin katalizlediği reaksiyon aynıdır. Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe etmektedir. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku PO₂ artışı ile artar. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit üretimi olmasına rağmen bu enzim sayesinde intraselüler süperoksit düzeyleri düşük tutulur. SOD'nin ekstraselüler aktivitesi çok düşüktür (29).

Süperoksit dismutazın, süperoksit anyonuna olan etkisi şu şekildedir. Süperoksit anyonu, Cu²⁺ ve bir arginin rezidüsünün guanido grubuna bağlanır. Bu bağlanma sonucunda süperoksitden bir elektron Cu²⁺ a transfer olurken Cu¹⁺ ve moleküler oksijen meydana gelir. İkinci bir süperoksit anyonu Cu¹⁺ dan bir elektron, bağlanma ortağından ise iki proton alarak hidrojen peroksiti oluştururken, enzim tekrar Cu²⁺ formuna dönüşmüş olur (37).



SOD, fagosite edilmiş bakterilerin intraselüler ortamda öldürülmesinde de rol oynar. Bu yüzden SOD, granülosit fonksiyonu için çok önemlidir. Lenfositlerde de granülositlerden daha fazla miktarda SOD bulunmaktadır. SOD aktivitesindeki genetik ya da sonradan meydana gelmiş değişiklikler ile hastalığa karşı hassasiyet ya da direncin birbiriyle ilişkili olabileceği kaydedilmiştir.

Romatoid artrit, diabetik hipertrigliseridemik hastalarda ve behçet hastalığında da süperoksit üretimi ile süperoksit toplayıcı aktivite arasında negatif

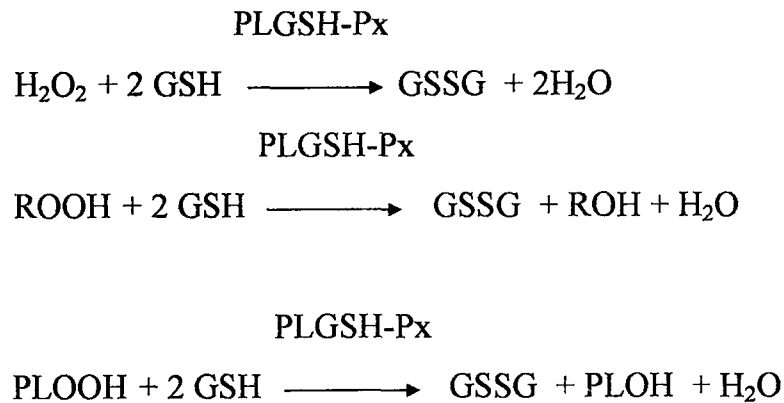
bir korelasyon bulunmuştur. Antifagositik aktivitesi olan kolşisinin, PMNL’de süperoksit üretimini bloke ettiği, süperoksit toplayıcı aktivitenin azalmasını önlediği gözlenmiştir. Cu-Zn SOD’nin spesifik aktivitesi Down sendromlu hastaların eritrositlerinde yüksek, prematurelerin ve yaşlıların eritrositlerinde ve psoriasisli hastaların lökositlerinde düşük bulunmuştur (38).

2.6.1.2. Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon peroksitaz, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. GSH-Px (EC 1.11.1.9 glutasyon: H₂O₂ oksidoredüktaz,)’in molekül ağırlığı yaklaşık olarak 85000 Daltondur. Tetramerik, 4 selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. GSH-Px aşağıdaki reaksiyonları katalizler.



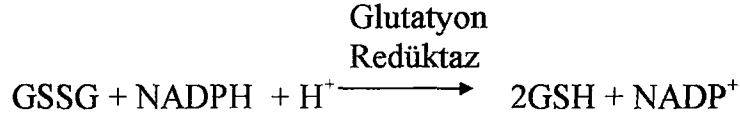
Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksitaz (PLGSH-Px) molekül ağırlığı 20.000 dalton olan, monomerik, selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Membran fosfolipid hidroperoksitlerini, alkollere indirger (40).



Hücre membranının vitamin E konsantrasyonunun düştüğü durumlarda PLGSH-Px, membranın peroksitasyona karşı korunmasını sağlar (41).

GSH-Px'in selenolat formu (E-Se) peroksit substratını alkole indirgerken, kendisi okside selenik asite dönüşür (E-Se-OH). Glutasyon, bu evrede reaksiyona katılarak selenosülfite bağlanması ile enzim, aktif formu olan selenolat formuna dönerken, glutasyon okside hale dönüşür.

Hidroperoksitlerin redükte edilmesi sonucu meydana gelen GSSG, glutasyon redüktazın katalizlediği reaksiyon ile tekrar GSH dönüşür.

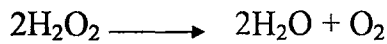


GSH-Px'in fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında oluşan serbest radikal peroksitasyonundan fagositik hücrelerin zarar görmelerini engeller. GSH-Px aktivitesi düşük olan makrofajlarda zimosanla başlatılan solunum patlamasını takiben, hidrojen peroksit salınımının arttığı gösterilmiştir. Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksitin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar (42).

Eritrosit GSH-Px aktivitesi yaşlılarda ve Down sendromunda yüksek, prematürelere düşük, lökosit GSH-Px aktivitesi yaşlılarda ve hipertansiyonlu hastalarda yüksek bulunmuştur.

2.6.1.3. Katalaz (CAT)

Katalaz, 4 "hem" grubu içeren bir hemoproteindir. Peroksitaz aktivitesine sahip oluşuna ek olarak, bu enzim bir molekül H_2O_2 'i elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir. İn vivo birçok durumda, katalazın peroksitaz aktivitesi tercih edilmektedir.



Katalaz, kanda, kemik iliğinde, mukoz membranlarda böbrek ve karaciğerde bulunur. Görevinin dismutaz etkisi ile oluşan hidrojen peroksitin yıkımı olduğu

sanılmaktadır. Mikro yapılar veya peroksizomlar, karaciğer dahil birçok dokuda bulunur. Bunlar oksidazlar ve katalazlar açısından zengindirler. Peroksizomal enzimlere ek olarak, ksantin oksidaz ve mitokondrial ve mikrozomal elektron transport sistemleri H_2O_2 kaynakları olarak değerlendirilmelidirler

2.6.2. ENZİMATİK OLMAYAN ANTİOKSİDANLAR

2.6.2.1. VİTAMİNLER

C VİTAMİNİ

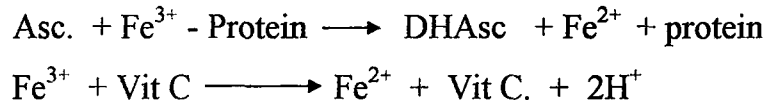
C vitamini (askorbik asit), kapalı formülü $C_6H_8O_6$ olan bir ketolaktondur. Suda eriyebilir vitaminlerden olan askorbik asit, özellikle yeşil renkli taze sebze, meyve ve turunçgillerde bol miktarda bulunur. İnce barsaklardan kolayca emilir. Isıtmaya dayanıksız, dondurulmaya ise dayanıklıdır. Plazma konsantrasyonu 0.5-1.5 mg/dl kadardır (43).

C vitamini organizmada birçok hidrosilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. Kollajen sentezinde lizin ve prolin hidrosilasyonu için gereklidir. Tirozinden epinefrin sentezinin dopamin β -hidrosilaz basamağında, tirozin yıkılımında p-hidroksi-fenil pirüvatın homogentisata oksidasyonunda, safra asitleri sentezi 7- α -hidrosilaz başlangıç basamağında ve lizinden karnitin sentezinde rol alır. Katekolamin sentezinde dopamin β -monooksijenaz reaksiyonunda kofaktör olarak etkilidir. Demirin emiliminde enzimatik olmayan bir yol ile indirgeyici rol oynar. Midede ferri demiri ferro demire indirgeyerek emiliminde görev alır. İmmunite ve yara iyileşmesinde de etkilidir (44).

Çok güçlü bir indirgeyici ajan olan askorbik asit semidehidroaskorbat radikal ara ürünü üzerinden kolaylıkla dehidroaskorbik asite okside olur Şekil 1. Güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Süperoksit ve hidrosil radikali ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. Semidehidroaskorbat da antioksidan etki gösterir. C vitamini ayrıca antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller, tokoferoksil radikalinin, α -tokoferole redüklenmesini sağlar. C vitamininin bitkisel ve hayvansal yağları, balık,

margarin ve süt gibi yağ ihtiva eden yiyecekleri oksidatif bozulmaya karşı koruduğu bilinmektedir (43).

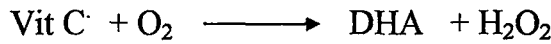
C vitaminin diğer bir özelliği, antioksidan etkisi yanında oksidan etki de göstermesidir. Çünkü C vitamini, ferri demiri, ferro demire indirgeyen süperoksit radikali dışındaki tek selüler ajandır. Bu yolla askorbat, proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan ferri demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye uygun olan ferro demire dönüştürür. Yani süperoksit üretimine katkıda bulunur. Bu özelliğinden dolayı C vitamini, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalisti veya bir pro-oksidanı olarak değerlendirilir.



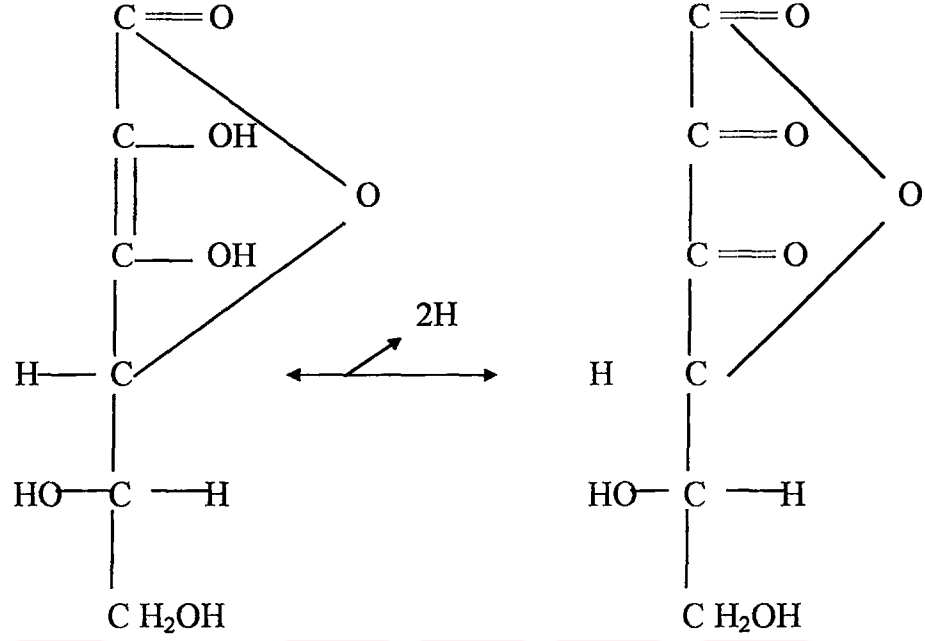
Görüldüğü gibi, C vitaminin ferri demirle doğrudan reaksiyonunda C vitamini radikali (dehidroaskorbat radikal anyonu, Vit C.) meydana gelmektedir. Bu şekilde meydana gelen C vitamini radikali pek reaktif değildir. Ya NADH redüktaz tarafından indirgenir veya iki proton alarak serbest radikal reaksiyonlarının ilerlemesini durdurur (45).



Ancak, aynı radikal başka bir ferri demiri indirgeyerek kendisi dehidroaskorbata dönüşürken bu arada yine Fenton reaksiyonu için gerekli olan ferro demiri açığa çıkarabilir.



Böylece C vitamini tarafından hem H_2O_2 hem de ferro demir sentezi Fenton reaksiyonuna, yani radikal üretimine katkıda bulunur. Ancak, bu tip etkisinin sadece düşük konsantrasyonlarda (0,2 mM'dan az) görüldüğü daha yüksek konsantrasyonlarda ise güçlü bir antioksidan olarak etki ettiği kaydedilmiştir (46).



Şekil 1: Askorbik asit ve dehidroaskorbik asit

C vitamininin fagositoz için de önemli olduğu gösterilmiştir. Oksidatif stres patlaması sırasında nötrofiller C vitamini alırlar ve aktivasyonu takiben C vitamini konsantrasyonunu azaltırlar. C vitamini eksikliği olan kobayların lökositlerindeki kemotaksis ve bakterisidal aktivitenin deprese olduğu gösterilmiştir. Sağlıklı kişilerde C vitamini verilmesi kemotaktik cevabı arttırmaktadır.

Aşırı oksidatif stres sırasında, reaktif moleküller çevreye yayılarak mutasyonlara, hücre hasarına, inflamasyona, koruyucu enzimlerin inaktivasyonuna ve lenfosit proliferasyonunun inhibisyonuna sebep olurlar. C vitamini, reaktif bakterisidal moleküllerin intraselüler konsantrasyonlarında azalmaya sebep olmadan oksidatif parçalanma ürünlerinin zarar verici etkilerini engeller (41, 47).

Askorbik asit düzeyinin düşük olması, tüm kronik inflamatuvar hastalıklarda ve lipid peroksidasyonunun artmış olduğu durumlarda önemli rol oynamaktadır. Sigara içenlerde, koroner arter hastalığı olanlarda ve kanserli hastalarda plazma askorbat düzeyinin normalden daha düşük olduğu kaydedilmiştir.

Diyetle C vitamini alınmasının akut sigara içimi ile oluşan LDL oksidasyonunu azalttığı tesbit edilmiştir. Romatoid artritli hastalarda plazma askorbik asit düzeylerinin düşük olduğu uzun süredir bilinmektedir. Kronik

inflamasyonlarda C vitamininin katabolizması artar. Çünkü bu sırada normal metabolizma sürekli oksidatif stres altındadır. İn vivo olarak glutatyon, askorbatın indirgenmiş durumunu sürdürmek için gereklidir. Askorbik asitin bu koruyucu mekanizmasının etkinliği, glutatyon redüktazın etkinliğine bağlıdır. Kronik inflamatuvar durumlarda intraselüler glutatyonun da azaldığına dair bulgular vardır (42).

Sağlıklı kişilerde, lökosit askorbat seviyesinin, C vitamini alımının yeterli olup olmadığı gösteren önemli bir indeks olduğu bildirilmektedir. Çünkü, plazma konsantrasyonları askorbatın metabolik turnoverının ya da en son diyetle alımının bir göstergesi iken, lökosit konsantrasyonları vitaminin doku depolarını yansıtır. Lökosit askorbik asit düzeyleri plazma düzeyinden 25-80 kat daha yüksektir. Mononükleer hücrelerde ise en yüksek miktarda bulunur. Bu hücrelerde granülositlerden yaklaşık olarak 2-3 kat daha fazla C vitamini bulunur (48).

C vitamini çoğu dokuda ve plazmada askorbat şeklinde bulunur. Dehidroaskorbat, fizyolojik pH'da glutatyonla ya da enzimatik olarak glutatyon: dehidroaskorbat oksidoredüktaz tarafından askorbata indirgenir.

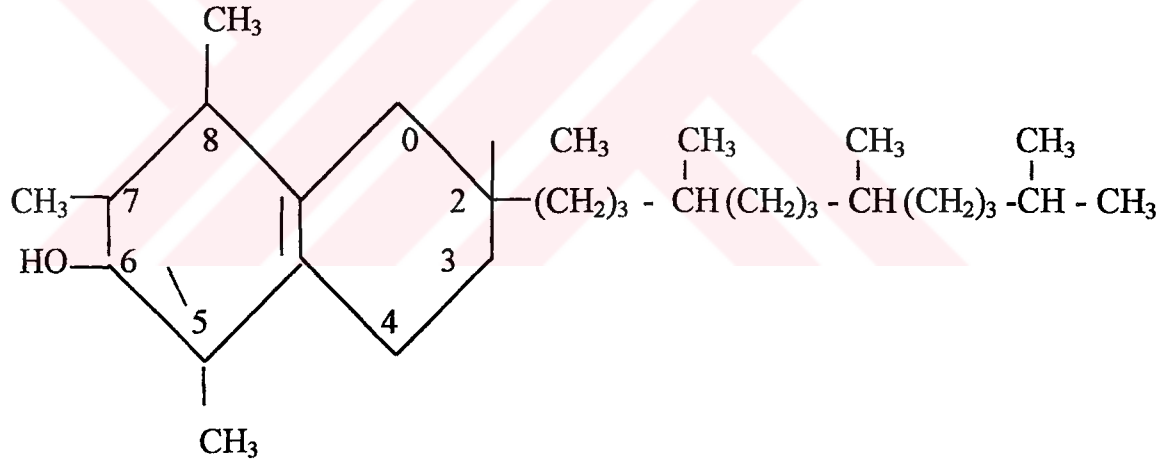
Memelilerde C vitamini ile glukoz metabolizması birbiriyle ilişkilidir. İnsan hücreleri, dehidroaskorbatı alıp, hemen askorbata indirgerler. D-Glukoz ve D-glukoz analogları, eritrositler ve lökositler tarafından dehidroaskorbat alımını yarışmalı olarak inhibe ederler. Diabetli kişilerde, diabetli olmayanlara göre lökositlerin dehidroaskorbat uptake hızları daha yavaştır. Bundan dolayı, bu hücrelerde dehidroaskorbat transportunun muhtemelen D-glukozun membran diffüzyonunu sağlayan aynı taşıyıcılar vasıtasıyla olduğu düşünülmektedir. İnsülin konsantrasyonlarındaki akut artışların askorbik asitin lökosit içine aktif transportunu in vitro olarak stimüle ettiği görülmüştür (49).

Diyetle düşük miktarda askorbik asit alan kişilere ilave askorbik asit verilmesi hiperkolesterolemiyi ve kutanöz vasküler frajiliteyi azaltır. Askorbik asitin in vivo ve in vitro eklenmesinin, insan eritrositlerinde sorbitol birikimini azalttığı görülmüştür. Doku askorbat eksikliğinin diabetes mellitusta doku patolojisini arttırdığı, bu yüzden hastaların fazla miktarda C vitamini alması gerektiği kaydedilmiştir.

E VİTAMİNİ

E vitamini tokoferol yapısında olup ilk olarak Evans ve Sure tarafından tanımlanmış ve 1938 yılında izole edilmiştir. Doğal olarak alfa, beta, gama, delta, teta ve zeta gibi çeşitli tokoferoller bulunmaktadır. Bunların hepsi, izoprenoidlerin substitue edildiği 6-hidroksi kromanlar veya tokollerdir. D- α -tokoferol en geniş doğal dağılımı olan ve en büyük biyolojik aktiviteyi gösteren tokoferoldür. Antioksidan aktivitesi en yüksek olan tokoferol de α -tokoferoldür. Vitamin E, fenol halkası içeren aromatik yapıda bir makromoleküldür. Yapının esas aktif kısmı fenol halkasına bağlı hidroksil grubudur. Molekülün antioksidan etkisi bu gruptan kaynaklanmaktadır (50).

α -Tokoferol dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunur. En yüksek vitamin E konsantrasyonları, mitokondri ve mikrozoimler gibi membrandan zengin hücre fraksiyonlarında bulunur. Miyokard membranlarındaki miktarı da fazladır.



Şekil 2 α -tokoferol

Bitkisel yağlar ve tohumlar, E vitaminlerinden zengin kaynaklardır. Bitkisel yağların sabunlaşmayan kısımlarında ve en çok yer fıstığı, badem, pamuk yağı ve keten tohumunda bulunur. Zeytin yağında eser miktarda bulunur.

Diyette, yağda çözünmüş olarak alınır, yağ sindirimi sırasında açığa çıkar ve emilir. Emilebilmesi için yağ emiliminin ve safraasitlerinin normal düzeyde olması gerekir. Herhangi bir taşıyıcı protein olmadan, pasif difüzyonla emilir. Önce, şilomikron yapısına dahil olur. Şilomikronlar lipoprotein lipaz aracılığı ile hidrolize olurken E vitamininin bir bölümü dokulara taşınır. Kalan E vitamini ise şilomikron

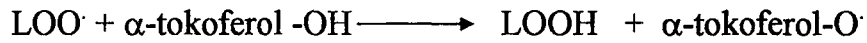
kalıntıları ile birlikte karaciğer tarafından alınıp, hepatik kökenli VLDL'ler aracılığı ile tekrar dolaşıma salınır veya HDL'e transfer edilir. E vitamini en fazla LDL'de bulunur. Bir LDL partikülünde ortalama 6 tane α - tokoferol molekülü vardır. LDL'nin dıştabakasında ve kromonal halkası sulu faza yönelmiş şekilde lokalizedir. E vitamininin en önemli depolanma yeri yağ dokusudur. Plazma konsantrasyonu ise 0.5-1.8 mg/dl kadardır (51).

Çok güçlü bir antioksidan olan E vitamini, hücre membran fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. Bir molekül α - tokoferol 100 molekül PUFA'nın peroksidasyonunu engelleyebilir. E vitamini, süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksi radikallerini ve diğer radikal tiplerini indirgeme özelliği gösterir.

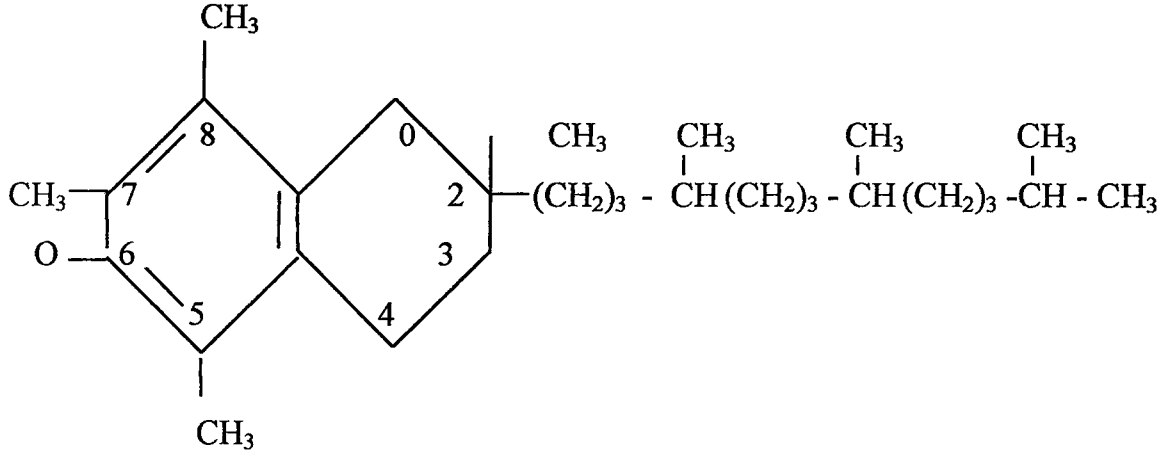
Glutasyon peroksidaz ile E vitamini serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. Enzim, teşekkül etmiş olan peroksitleri ortadan kaldırırken E vitamini peroksitlerin sentezini engeller.

E vitamini selenyum metabolizmasında da önemli rol oynar. Selenyum, normal pankreas fonksiyonu ve E vitamini ile lipidlerin emilimi için gereklidir. Ayrıca, E vitamininin lipoproteinler içinde tutulmasına yardımcı olur. E vitamini ise selenyumun organizmadan kaybını önleyerek veya onu aktif şekilde tutarak selenyum ihtiyacını azaltır (52).

E vitamini, zincir kırıcı bir antioksidan olarak bilinir. Çünkü fonksiyonları lipid peroksi radikallerini (LOO.) parçalamak ve böylece lipid peroksidasyon zincir reaksiyonları sonlandırmaktır.



Sonuçta oluşan tokoferoksil radikali nisbeten stabildir ve lipid peroksidasyonunu kendi kendine başlatmak için yeterince reaktif değildir. Bu oksidasyon ürünü, glukuronik asit ile konjugasyona uğrayarak safra yolu ile atılır. Tokoferolün antioksidan etkisi, yüksek oksijen konsantrasyonlarında etkilidir. Yüksek oksijen kısmi basıncına maruz kalan lipid yapılarında, örneğin eritrosit membranları ve solunum sistemi membranlarında yoğunlaşma eğilimindedir (49).



Şekil 3: Tokoferoksil radikali

E vitamini, okside olduktan sonra ve parçalanmadan önce, askorbik asit ve glutatyon tarafından yeniden indirgenebilmektedir. Bu reaksiyon, bu maddelerin konsantrasyonlarına ve/veya indirgenmiş formlarını devam ettiren enzimlere bağlıdır. Bu yolla tokoferol radikali, bir E radikal redüktaz aktivitesiyle E vitamininin doğal şekline dönüştürülebilir.



Solunum havası ile dışarı atılan pentan miktarı, lipid peroksidasyonunun bir göstergesidir. Diyetle verilen E vitaminin, solunum havasındaki pentan miktarını azalttığı tesbit edilmiştir. Bu da E vitamininin lipid peroksidasyonunu yavaşlattığını göstermektedir. Nitekim, oral yolla verilen E vitaminin LDL'leri oksidasyona karşı koruduğu gösterilmiştir. Plazmada düşük E vitamini seviyesinin erken anjina pektoris için bir risk faktörü olduğunu ve E vitamini alımıyla koroner kalp hastalığı riskinin azaldığını gösteren deneysel ve epidemiyolojik bulgular elde edilmiştir.

E ve C vitamini verilmesinin yaşlı kişilerde ortalama kan lipid peroksit konsantrasyonlarında bir azalmayla sonuçlandığı görülmüştür.

Deneysel olarak oluşturulan beyin iskemisinde E vitamini seviyesinin azaldığı, reperfüzyonda ise peroksitatif hasarı önlemede yardımcı olduğu tespit edilmiştir.

Serbest radikallerin kanserin başlamasında rol aldığı ve E vitamini ile diğer antioksidanların antikanserojen etki göstererek kanserin yayılmasını ve tümörün büyümesini önlediği kaydedilmiştir (47).

Yapılan çalışmalar, E vitamininin insan granüositlerinde NADPH oksidoredüktaz enzim sisteminin selektif bir inhibitörü olarak görev yapabileceğini ortaya koymuştur. Bu bulgu, yoğun E vitamini alımını takiben enfeksiyonların arttığını gösteren çalışmalarla uyumludur.

E vitamini verilmesi, ratlarda ve diabetik hastalarda hemoglobin glikozilasyonunu azalmıştır. α -Tokoferol düzeylerinin, plazma kolesterolü ve apolipoprotein B ihtiva eden lipoproteinler ve özellikle de LDL kolesterol düzeyi ile pozitif bir korelasyon gösterdiği de tesbit edilmiştir (34).

KARATENOİDLER

A vitamininin metabolik ön maddesi olan β -karoten, bitki pigmentlerinden olan karotenoid familyasının bir üyesidir. β -karotenin, singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve peroksi radikaller ile direkt olarak etkileşerek antioksidan etki meydana getirdiği tesbit edilmiştir (52).

3. MATERYAL VE METODLAR

3.1. MATERYAL

Hasta grubu, İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi İç Hastalıkları diabet servisine tedavi amacıyla gelen, yaşları 40 ile 60 arasında değişen ve hiçbir diabeti komplikasyonu olmayan tip II diabetes mellituslu hastalardan seçildi.

Kontrol grubu ise Dahiliye polikliniğine kontrol için başvuran, klinik olarak sağlıklı ve yaşları 40 ile 60 arasında değişen kişilerden oluşturuldu.

3.1.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Araştırmada kullanılan ksantin oksidaz, ksantin, nitrobluetetrazolium (NBT), CuCl_2 ve bovin serum albumin, sigma firmasından, H_2O_2 , EDTA, Na_2CO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, kloroform, etanol, NaCl, KH_2PO_4 Merck firmasından temin edilen analitik saflıkta maddelerdir. Hemoglobin kiti ise Randox firmasından temin edildi.

3.1.2. KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER

Numune hazırlanması ve enzim analizlerinde Gilson marka otomatik pipetler (10 μl , 100 μl , 1000 μl 'lik), Cenco whirlmix vorteks, Libror-AEG 320 model 0.0001 grama duyarlı hassas terazi, Hermle Z 383 K santrifüj, LKB Biochrom ultrospec plus uv/visible spektrofotometre kullanıldı.

İstatistikî analizler SPSS programı kullanılarak, iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi uygulandı (53).

3.2. METODLAR

3.2.1. Eritrosit Hemolizatlarının Hazırlanması:

Hasta ve kontrol grubunu oluşturan kişilerden alınan vena kanı eritrosit hemolizatlarının hazırlanması için kullanıldı.

Alınan ven kanları 2 cc'lik orjinal Na-EDTA'lı CBC tüplerine kondu. Kan numuneleri hiç bekletilmeden 3000 rpm' de on dakika santrifüje edilerek plazmaları ayrıldı.. Hücre paketinde en üst tabaka olan, lökosit tabakası eritrosit tabakasından ayrıldı. Böylece saf eritrosit numunesi elde edildi. Daha sonra eritrositler % 0,9'luk NaCl ile 3 defa yıkanarak plazma artıkları uzaklaştırıldı.

Yıkanmış eritrositler + 4°C'de soğutulmuş distile su ilavesi ile hemoliz edildi. Eritrosit hemolizatları 5000 rpm'de + 4°C'de 15 dk santrifüj edilerek hücre partikülleri çöktürüldü. Süpernatant, hemoglobın ve enzim analizinde kullanıldı. Analizi daha sonra yapılacak numuneler -20°C'de saklandı.

3.2.2. Hemoglobın Tayini

Analize başlamadan önce hemoglobın reaktifi hazırlandı. Bunun için orjinal kitte bulunan cyanüre/ferricyanüre bir miktar distile suda eritildi. Üzerine 500 µl Brij 35 eklendi ve hacim 1000 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan bu çözelti koyu renkli bir şişeye konularak oda ısısında saklandı. İşlem: Bir deney tüpüne hazırladığımız hemoglobın reaktifinden 2,5 ml alındı ve üzerine 10µl hemolizat eklendi. Spektrofotometre 540nm ayarlandı ve hazırladığımız reaktifle aletin sıfır absorbans okuması sağlanır. Daha sonra numunelerin absorbansı ölçüldü. Reaksiyon sonucu oluşan renk bir kaç saat sabit kalmaktadır.

Hemoglobın standart grafiğinin elde edilmesi için farklı konsantrasyonlarda hazırlanan hemoglobın çözeltileri numune gibi çalışılarak her konsantrasyona karşılık gelen absorbanslar tespit edildi. Bu veriler kullanılarak hemoglobın standart grafiği çizildi. Numunelerin okunan absorbans değerleri standart grafiğe yerleştirilerek örneğin gr/dl cinsinden Hb miktarı bulundu. Çıkan sonucun 100'e bölünmesiyle gr/ml cinsinden Hb bulundu. Ancak numune sulandırılmış ise bu sonuç sulandırma faktörleriyle çarpıldı.

3.2.3. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Tayini

Bu metotta süperoksit dismutaz aktivite ölçümü ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikalının NBT'yi (nitroblue tetrazolium) indirgeyerek renk oluşturması esasına dayanır. Bu şekilde üretilen süperoksit radikallerinin nitroblue tetrazoliumu indirgemesi 560 nm'de maksimum absorbans veren mavi renkli formazon oluşumu ile sonlanır.

Ortamda enzim olmadığı durumda bu indirgenme maksimal olup, koyu mavi bir renk oluşmaktadır. Ortamda SOD varlığında ise enzim süperoksit anyonunu hidrojen peroksit'e çevirmekte böylece NBT indirgenmesi azalmakta ve renk değişikliği meydana gelmemektedir. Renkli formazon oluşumu ortamın enzim konsantrasyonu ile ters orantılı olarak gerçekleşmektedir. Böylece oluşan formazonun 560 nm'de verdiği absorbanstan SOD aktivitesi hesap edilmektedir (54).

Kullanılan reaktifler

1- Assay Raktifi

a) 0.3 mmol/L xanthine; 9,13 mg alınıp 200 ml bidistile suda çözülür.

Çözme işlemi birkaç damla 1 M NaOH ilavesi ve hafifce ısıtılarak yapılır.

b) 0.6 mmol/L Na₂EDTA; 23 mg alınıp 100 ml bidistile suda çözülür.

c) 150 µmol/L NBT; 12.3 mg alınıp 100 ml bidistile suda çözülür.

d) 400 mmol/L Na₂CO₃; 2.54 gr alınıp 60 ml bidistile suda çözülür.

e) 1 g/L bovine serum albumin (BSA); 30 mg alınıp 30 ml bidistile suda çözülür.

Hepsi karıştırılır (toplam 490 ml) koyu renkli bir şişede +4°C'de saklanır.

2- Ksantin Oksidaz (167 u/L): 11860 Ü/L Ksantin oksidaz stok çözeltisinden 14 µl alınıp +4°C'de soğutulmuş 986 µL 2M (NH₄)₂SO₄ ile karıştırılır.

3- 2M (NH₄)₂SO₄: 2.64 gr Amonyum sülfat tartılır bir miktar distile suda çözülür ve total hacim 10 ml'e tamamlanır.

4- 0.8 mmol/L CuCl₂: 13.6 mg CuCl₂ alınıp bir miktar bidistile suda çözülerek total hacim 100 ml'ye tamamlanır.

Deneyin yapılışı:

1/5 oranında dilüe edilmiş eritrosit hemolizati eşit hacimde kloroform/etanol (3/5 W/W) ile karıştırıldı ve 3000 rpm'de 20 dakika santrifüje edildi. En üstteki berrak kısım SOD aktivite tayininde kullanılmak üzere ayrıldı.

	Kör	Numune
Assay reaktifi (ml)	2.85	2.85
Süpernatant (ml)	-	0.5
Bidistile su (ml)	0,5	-
Ksantin oksidaz (ml)	0.05	0.05

25°C'de 20 dakika süreyle inkübe edildi. Sürenin sonunda her iki tüpe de 1.0 ml CuCl₂ ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Spektrofotometre 560 nm'ye ayarlandı. Distile suya karşı kör ve numunenin absorbanları ölçüldü.

3.2.4. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Hesaplanması:

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Absorbans (Kör)} - \text{Absorbans (Numune)}}{\text{Absorbans (kör)}} \times 100$$

1 Ünite SOD: %50'lik NBT inhibisyonu meydana getiren enzim miktarıdır.

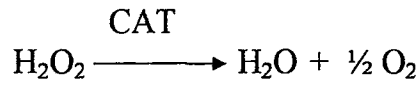
$$\text{Ü/ml SOD} = \frac{\% \text{ İnhibisyon}}{\% 50 \text{ inhibisyon}}$$

Gram hemoglobin başına SOD aktivitesi, spesifik aktivite:

$$\text{U/gr Hb} = \frac{\text{SOD Aktivitesi (U/ml)}}{\text{gr/ml Hb}}$$

3.2.5. Katalaz Aktivitesinin Tayini

Hidrojen peroksit (H_2O_2) ultraviyole spektrumunda absorpsiyon veren bir maddedir. Maksimal absorban 240 nm'de meydana gelmektedir. Deney ortamına ilave edilen hidrojen peroksitin katalaz tarafından su ve oksijene parçalanması 240 nm'de absorban azalması ile kendini gösterir. Absorbansta gözlenen bu azalma ortamdaki katalaz enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır (55). Katalazın katalize ettiği reaksiyon aşağıda verilmiştir.



Kullanılan reaktifler:

- 1- Fosfat tamponu (PH:7, 50 mM): 600 ml 50 mM Na_2HPO_4 ile 400 ml 50 mM KH_2PO_4 karıştırılarak hazırlandı.
- 2- Hidrojen peroksitli fosfat tamponu (pH:7, 50mM): 100 ml fosfat tamponuna absorbanı 0,5 olana kadar H_2O_2 ilave edildi. Her H_2O_2 ilavesinden sonra tamponun absorban ölçümü yapıldı ve son absorban 0,5'e ayarlandı.

Deneyin yapılışı:

	Kör	Numune
Fosfat Tamponu (pH 7,50 mM)	2.99	-
H_2O_2 'li Fosfat Tamponu	0.01	2.99 ml
Süpernatant	-	0.01 ml

Spektrofotometre 240 nm'ye getirildi ve kör'le sıfır absorbansa ayarlandı. Numune tüplerine süpernatant ilavesinden hemen sonra 240 nm de absorban okundu, bu başlangıç absorban değeridir. Daha sonra her 15 sn'de bir okuma yapmak suretiyle 90 sn süreyle absorban azalması takip edildi. Sürenin sonunda okunan absorban değeri kaydedildi. Lineer absorban azalmasının olduğu zaman aralığı değerlendirilmeye alındı.

3.2.6. Katalaz Aktivitesinin Hesaplanması:

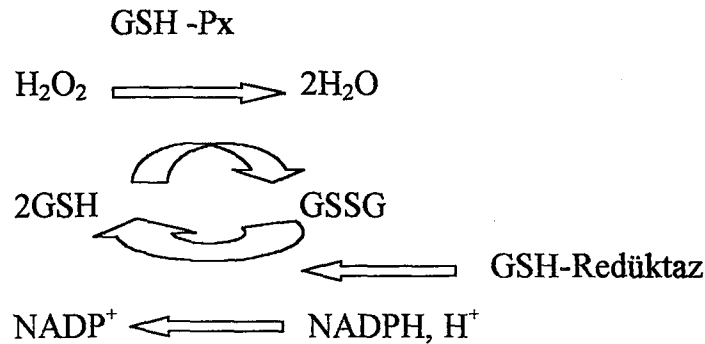
$$K = \frac{2.3 \log \frac{\text{Başlangıç absorbansı}}{\text{Son absorbans}}}{\Delta t \text{ (ölçüm süresi, sn)}}$$

$$K/\text{gr Hb} = \frac{K}{\text{gr/ml Hb}}$$

3.2.7. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Tayini

Deneyin prensibi: GSH-Px redükte glutasyonu kullanarak hidrojen peroksidin suya dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Reaksiyon sonunda redükte glutasyon okside forma dönüşür. Bir diğer hidrojen peroksidin suya katalizi için okside glutasyonun redükte forma dönüşmesi gerekir. Bu dönüşüm, ortamda redükte NADP varlığında glutasyon redüktaz tarafından gerçekleştirilir. Bu durumda redükte NADP okside NADP'ye çevrilirken okside glutasyon redükte forma dönüşür.

Redükte NADP 340 nm'de maksimal absorbans veren bir maddedir. Glutasyon redüktaz katalizi devam ettikçe 340 nm'de absorbans azalması meydana gelecektir. Çünkü redükte NADP okside forma dönüşmektedir. Absorbanstaki bu azalma ortamdaki GSH-Px aktivitesi ile doğru orantılı olacaktır (56).



Kullanılan reaktifler:

- 1- GSH (150 nM)= 50 mg GSH alınır 1ml tamponda çözülür. (kullanımdan hemen önce hazırlanır)
- 2- NaN_3 (1M) = 65 mg alınır, 1 ml fosfat tamponunda çözülür. (Kullanımdan hemen önce hazırlanır)
- 3- NADPH (3 mM) = 5 mg alınır.1 ml tamponda çözülür. (Kullanımdan hemen önce hazırlanır)
- 4- GSH Redüktaz (katı ise) 30 mg alınır. 1 ml 3.2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'de çözülür. GSH Redüktaz (sıvı ise) direkt olarak 10 μL alınıp deney ortamına ilave edilir.
- 5- Hidrojen peroksit çözeltisi (50 mM) = 15 μL H_2O_2 alınır, 5 ml fosfat tamponuna pipetlenir.
- 6- Fosfat Tamponu (pH= 7, 50 mM).

A

B

 Na_2HPO_4
50 mM 7,1 g/L KH_2PO_4
50 mM 6,8 g/L

600 ml A + 400 ml B alınır ve karıştırılır. Bu çözeltiye 2.08 g EDTA ilave edilerek pH'sı 7, 50 milimolar konsantrasyonda fosfat tamponu hazırlanır.

7- 3,2 M Amonyum sülfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çözeltisi

4,22 gr Amonyum sülfat alınır, 10 ml distile suda çözülür.

Deneyin yapılışı:

	Numune Tüpü
Fosfat Tamponu	2,650 ml
Redükte GSH	0,100 ml
NADPH	0,100 ml
GSH Redüktaz	0,010 ml
NaN_3 (sodyum asit)	0,010 ml
Numune	0,020 ml

Tüpler iyice karıştırılır ve oda ısısında 30 dk inkübe edilir. Sürenin sonunda her tüpe 0, 100 ml hidrojen peroksit çözeltisi ilave edilerek reaksiyon başlatılır.

Dalga boyu 340 nm'e ayarlanmış spektrofotometrede numunelerin absorbansları 5 dakika süreyle takip edilir. Son absorbans değerinden, ilk absorbans değeri çıkartılarak 5 dk'lık net değişim tespit edilir. Daha sonra bulunan değer 5'e bölünerek dakikadaki absorbans değişimi bulunur.

3.2.8. GSH-Px Aktivitesinin Hesaplanması:

$$\dot{U}/L \text{ (mikromol / dk/L)} = \frac{\Delta A/t \times V_t \times 10^6}{E \times V_s \times L}$$

E = NADPH'in ekstinkisyon sabiti ($6.22 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

V_t = Total reaksiyon volümü (ml)

V_s = Total reaksiyon içindeki numune volümü (ml)

L = Küvet çapı (1 cm)

Delta A/t = Dakikadaki absorbans değişimi

10⁶: molü mikromole çevirim sabiti.

$$U/L = \frac{\Delta A/dk \times 3 \times 10^6}{6,22 \times 10^3 \times 0,02 \times 1}$$

$$= \Delta A/dk \times \frac{3 \times 10^6}{124,4}$$

$$U/L = \Delta A/dk \times 24115$$

4. BULGULAR

I- Tip II diabetes mellituslu hastalarda eritrosit içi süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri.

Bu grubu oluşturan 50 diabetli hastadan alınan kan numunelerinin analiz sonuçları Tablo 1’de toplu halde verilmiştir.

Yapılan değerlendirme sonucunda bu grubu oluşturan diabetli hastaların eritrosit içi SOD aktivitesinin 409 ile 1510 U/gr Hb arasında değiştiği ve ortalama SOD aktivite değerinin 653 ± 215.4 U/gr Hb olduğu; katalaz aktivitesinin 89 ile 404 K/gr Hb arasında bir değer gösterdiği ve ortalama aktivitenin 196.3 ± 53.3 K/gr Hb düzeyinde olduğu tespit edilmiştir.

Hasta grubu eritrosit içi GSH-Px aktivite düzeyleri 593 ile 3605 U/gr Hb arası bir değişim göstermiş ve ortalama enzim aktivite değeri ise 1236.5 ± 478.6 U/gr Hb olarak hesap edilmiştir.

Tablo 1: Tip II Diabetes Mellitus Hastalarda Eritrosit İçi SOD, CAT, GSH-Px Aktiviteleri

No	İsim	Cinsiyet	Yaş	SOD (U/gr Hb)	Katalaz (K/gr Hb)	GSH-Px (U/gr Hb)
1.	A.B	E	42	698	207	1180
2.	B.S	E	44	409	197	759
3.	Ü.D	E	45	479	196	886
4.	İ.E	E	47	647	192	1286
5.	N.S	E	47	642	199	1183
6.	E.Z	E	48	510	237	1069
7.	B.A	E	48	475	89	974
8.	İ.A	E	52	1194	240	2100
9.	A.K	E	52	670	141	1236
10.	M.H	E	53	625	157	1140
11.	M.K	E	54	453	132	813
12.	M.G	E	54	512	240	1108
13.	E.G	E	55	483	163	893
14.	M.G	E	55	677	264	1127
15.	A.G	E	57	501	162	985
16.	A.K	E	57	512	171	843

17.	M.K	E	57	688	229	593
18.	İ.T	E	59	550	98	1156
19.	H.T	E	59	480	178	901
20.	N.Ö	E	60	924	181	1719
21.	F.K	E	60	681	223	1160
22.	Ö.S	K	60	469	252	961
23.	F.Ö	K	40	588	227	1171
24.	A.K	K	40	549	161	1017
25.	M.Y	K	41	515	209	960
26.	M.H	K	44	549	229	1206
27.	F.E	K	44	1164	263	2130
28.	F.T	K	45	627	253	1109
29.	Ş.G	K	46	512	140	994
30.	Z.B	K	46	443	183	852
31.	L.A	K	46	643	294	1178
32.	M.G	K	46	733	250	1337
33.	M.İ	K	46	709	153	1367
34.	S.E	K	47	438	181	742
35.	R.G	K	47	1510	191	3605
36.	M.G	K	48	693	190	1533
37.	M.T	K	50	504	164	1088
38.	H.T	K	50	577	167	1059
39.	H.Ö	K	51	650	178	1266
40.	S.U	K	51	975	404	1810
41.	K.P	K	52	832	204	1572
42.	N.D	K	53	766	161	1469
43.	N.T	K	54	735	180	1217
44.	G.O	K	55	512	255	992
45.	İ.K	K	55	1018	135	2130
46.	M.U	K	57	514	166	889
47.	P.G	K	58	632	156	1178
48.	F.A	K	58	636	150	1150
49.	E.Y	K	58	730	195	1475
50.	Z.S	K	58	550	160	993
Ort ± SD			51.16 ± 5.87	653,2 ± 215.4	196,3 ± 53.3	1236.5 ± 478.6

II. Kontrol Grubu Eritrosit İçi süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktiviteleri:

Analiz sonuçlarına göre kontrol grubu eritrosit içi SOD, CAT, GSH-Px analiz sonuçları Tablo 2’de toplu halde verilmiştir.

Kontrol grubunu oluşturan kişilerin eritrosit içi SOD aktivitelerinin 592 U/gr Hb ile 1834 U/gr Hb arasında olduğu ve ortalama SOD aktivite değerinin $1071,7 \pm 331,4$ U/gr Hb düzeyinde olduğu; Katalaz (CAT) aktivitesinin ise 90 K/gr Hb ile 265 K/gr Hb arasında değiştiği, ortalama CAT aktivitesinin ise $175,4 \pm 38,8$ K/gr Hb olduğu tespit edilmiştir.

Kontrol grubu GSH-Px aktiviteleri en düşük 600 ve en yüksek 4384 U/gr Hb olarak ölçülmüş ve ortalama enzim aktivite değeri $1381,3 \pm 690,6$ U/gr Hb olarak bulunmuştur.

Tablo 2: Kontrol Grubu Eritrosit içi SOD, CAT, GSH-Px Aktiviteleri

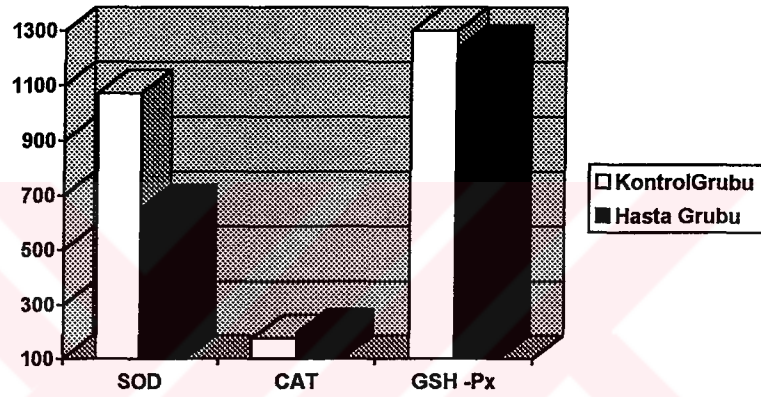
No	İsim	Cinsiyet	Yaş	SOD (U/gr Hb)	Katalaz (K/gr Hb)	GSH-Px (U/gr Hb)
1.	M.Y	K	40	1366	172	2376
2.	S.S	K	40	1551	188	1080
3.	A.Ö	K	40	739	118	845
4.	C.İ	K	40	896	174	794
5.	H.B	K	43	896	121	1551
6.	A.B	K	44	1099	150	1127
7.	B.S	K	44	802	196	1314
8.	D.B	K	46	859	251	794
9.	N.G	K	47	1355	150	4384
10.	A.D	K	47	1590	113	1533
11.	S.S	K	48	1497	168	1326
12.	A.E	K	48	1602	153	2430
13.	M.B	K	48	896	186	1422
14.	S.K	K	48	1811	152	3274
15.	S.Z	K	48	1010	207	1826
16.	A.K	K	49	811	189	1296
17.	A.Ö	K	49	1485	162	1457
18.	S.A	K	50	930	241	1505
19.	C.Ç	K	50	914	190	1185
20.	A.G	K	50	886	151	1596
21.	F.İ	K	52	1022	124	836
22.	G.D	K	53	1677	137	2208

23.	K.E	K	53	713	265	1162
24.	İ.K	K	56	1099	212	1237
25.	E.İ	K	58	930	242	1506
26.	A.Y	K	58	724	211	851
27.	A.E	K	58	1018	223	1283
28.	F.U	K	58	1834	214	2182
29.	N.S	K	58	1175	202	1195
30.	H.Y	E	56	832	169	1010
31.	A.Ç	E	57	903	239	1072
32.	H.M	E	40	811	192	952
33.	A.S	E	40	656	163	627
34.	O.Ö	E	41	907	147	1185
35.	H.Ö	E	41	879	199	755
36.	Ş.Ö	E	41	781	163	702
37.	T.T	E	41	1399	182	1127
38.	H.K	E	42	616	176	603
39.	Ş.K	E	43	784	169	1295
40.	O.T	E	48	962	142	1168
41.	A.K	E	50	787	199	1281
42.	A.G	E	50	592	118	600
43.	H.A	E	51	1443	152	1973
44.	R.Y	E	53	996	168	1176
45.	B.K	E	53	1073	130	1299
46.	A.B	E	54	1491	190	1389
47.	R.D	E	55	1239	196	1124
48.	H.K	E	56	671	124	663
49.	M.G	E	55	973	215	1257
50.	M.İ	E	56	1545	90	2527
Ort ± SD			49.06 ± 6.05	1071.7 ± 331.4	175,4 ± 38.8	1381.3 ± 690.6

Tablo 3. Kontrol ve hasta grubunun ortalama SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri:

Kontrol ve hasta gruplarına dahil şahısların SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinin ortalama \pm SD'ları Tablo 3'de toplu olarak verilmiştir.

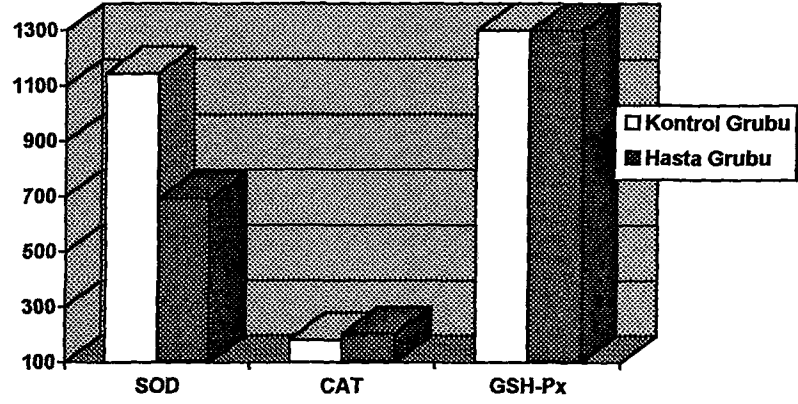
Gruplar	SOD (U/ gr Hb)	CAT (K/gr Hb)	GSH-Px (U/grHb)
1- Kontrol n= 50	1071,7 \pm 331,5	175,4 \pm 38,8	1381,3 \pm 690,6
2- Diabet n= 50	653,2 \pm 215,5	196,3 \pm 53,3	1236,5 \pm 478,6
p Değeri	p < 0,05	p < 0,05	p > 0,05



Tablo 4: Kontrol ve hasta grubunu oluşturan kadınlarda SOD, CAT ve GSH-Px Aktiviteleri.

Kontrol ve hasta gruplarına dahil kadınların SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinin ortalama \pm SD'ları Tablo 4'de toplu olarak verilmiştir.

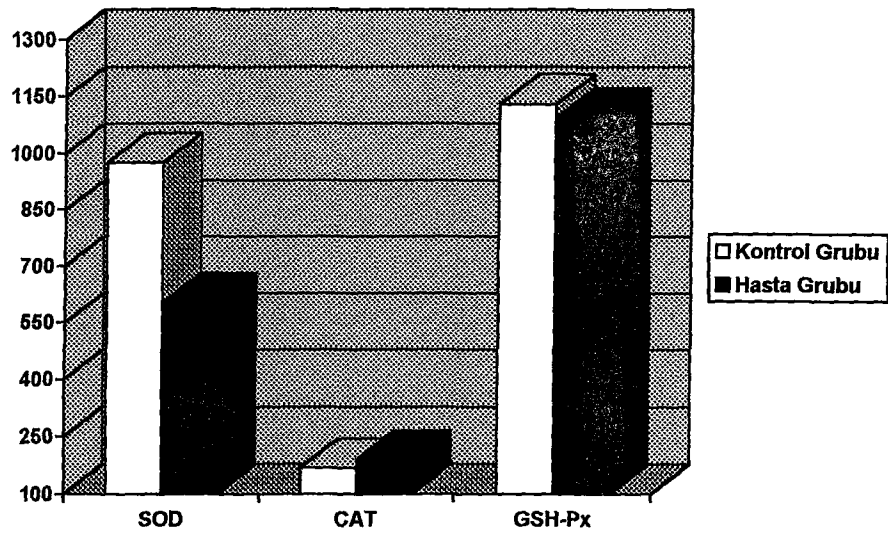
Gruplar	SOD U/gr Hb	CAT U/gr Hb	GSH-Px U/gr Hb
2- Kontrol n= 29	1144,4 \pm 348,4	181,4 \pm 41,4	1571,6 \pm 783,2
1- Diabet n= 29	692,2 \pm 236,6	202,1 \pm 57,5	1334,4 \pm 551,3
p Değeri	p < 0,05	p > 0,05	p > 0,05



Tablo 5: Kontrol ve hasta grubunu oluşturan erkeklerde CAT, SOD ve GSH-Px aktiviteleri

Kontrol ve hasta gruplarına dahil erkeklerde SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinin ortalama \pm SD'ları Tablo 5'de toplu olarak verilmiştir.

Gruplar	SOD U/gr Hb	CAT U/gr Hb	GSH-Px U/gr Hb
2- Kontrol n= 21	975,9 \pm 278,8	167,5 \pm 34,3	1130.5 \pm 449.1
1- Diabet n= 21	603,6 \pm 178,1	188,6 \pm 47,4	1094.2 \pm 320.5
p Değeri	p < 0,05	p > 0,05	p > 0,05



Tablo 6: Kontrol ve Diabet mellituslu hastaların eritrosit SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinin istatistiksel olarak karşılaştırılmaları.

Gruplar	ERİTROSİT		
	SOD	CAT	GSH-Px
1-2	p < 0,05	p < 0,05	p > 0,05

1- Kontrol grubu

2- DM hastalar

Kontrol ve DM'lu hastaların eritrositlerinde ölçülen SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması Tablo 6'da toplu olarak sunulmuştur. Tablodan da görüldüğü gibi kontrol ve DM'li hastaların SOD ve CAT enzim aktiviteleri arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir. DM'li hastaların SOD ve CAT aktivitesi düşük olarak bulunmuştur (p < 0,05). GSH-Px enzim aktivitelerinde ise iki grup arasında bir fark gözlenememiştir.

5. TARTIŞMA

Diabetes mellitusta en önemli problem glukozun kullanılmayarak kanda birikmesi ve enerji eldesinde yakıt maddesi olarak lipidlerin kullanılarak kanda bu sisteme ait sentez son ürünlerinin artmasıdır. Bunlara keton cisimleri adını veriyoruz. Bu hastalıkta oksijen kökenli serbest radikallerin muhtemel bir kaynağı, reaktif ketoaldehitlerin üretilmesi ve daha sonra ileri aşamadaki glikozilasyon son ürünlerinin oluşumu ile sonuçlanan glukozun otooksidasyonudur. Okside olan glukoz, glukoz asitlerine dönüşürken bir taraftan da serbest radikaller oluşmaktadır. Diğer bir kaynak da, diyabette, doğal olarak oluşan antioksidanların üretiminde bir bozukluğun ortaya çıkma ihtimalidir. Poliöl yolu aracılığı ile artan glukoz metabolizmasının NO üretimi için gerekli olan NADPH'i tüketmesi beklenebilir. Ayrıca sorbitolun fruktoza oksidasyonundaki artış, prostaglandin G₂'nin H₂'ye indirgenmesi aracılığıyla süperoksit anyon oluşumunu arttırabilir. Her iki durumda da, yani direkt oksijen radikali oluşumu veya antioksidan sistemin kesintiye uğraması ile diyabetli hastalarda oksidatif stres artacaktır (57).

Diabetin başlamasında oksidasyonun rol oynadığına dair bulguların çoğu, deney hayvanlarında diabet oluşturan 2 ilaç olan alloksan ve streptozotosin (STZ) ile yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Bu kimyasal maddelerin her ikisi de oksidan madde meydana getirerek Langerhans adacıklarını selektif olarak tahrip ederler. Bunlardan alloksan, intrasellüler redükthanlar olan askorbat ve tiollerle reaksiyona girerek onların antioksidan etkilerini engeller ve böylece oksidan üretimine sebep olur (58).

Bir glukon nitrosoüre olan STZ'in etki mekanizması ise tam olarak açıklanamamıştır. Ancak, STZ'nin uygun olmayan NO cevapları meydana getirerek diabete sebep olduğu tahmin edilmektedir.

Alloksan toksisitesi, in vitro ve in vivo metal şelatlayıcısı ajanlar, hidroksil radikal toplayıcıları ve lipidde çözünebilir antioksidanlarla inhibe edilebilir. Desferroksamin, düşük dozlarda tekrarlanan streptozotosinin sebep olduğu diabeti önler. Bu da, geçiş metallerinin katalizlediği serbest radikal reaksiyonlarının STZ toksisitesine katkıda bulunduğunu gösterir.

İnsüline bağımlı olmayan diabetes mellitusta vasküler ve diğer komplikasyonların sebebi olarak sigara içimi, hipertansiyon ve dislipidemi gibi geleneksel faktörler gösterilirdi. Bazı araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda bu risk faktörlerinin dışında oksidatif stresin de hızlı diabet komplikasyonu gelişiminde rol alabileceğini gösterdiler (59, 60, 61). Bu konudaki esas hipotez şudur: LDL'nin oksidasyon veya glikozilasyon ile modifiye edilmesi, endotel hücreleriyle sitotoksik reaksiyonlara girmesini ve doku hasarı oluşturmasını sağlamaktadır. Daha ileri reaksiyonlarla, bu modifiye edilmiş LDL'nin dolaşımında birikmesi ve spesifik reseptörleriyle kandan uzaklaştırılmaması sonucunda komplikasyonlar baş göstermektedir (62). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu hastalarda daha büyük miktarda yoğun LDL (dense LDL) olduğu gözlenmiştir. Bu yoğun LDL normallerine göre daha kolay okside edilebilmektedir (63). Ayrıca diabetli hastaların LDL'si daha fazla miktarda glikasyon son ürünü taşımaktadır (64). Diabetli ratlardan elde edilen VLDL ve LDL'nin daha çabuk okside edilebilir olduğu ve fibroblast hücrelerine daha çok toksik etki ettiği gösterilmiştir (65).

Diabetik durumda serbest radikal üretiminde bir artış görülmektedir. Bu serbest radikaller oksidasyon yoluyla damar duvarında harabiyet oluştururlar. Hem prelinik hem de klinik çalışmalarda, Diamicron'un serbest radikalleri temizleyici bir organ olarak etki gösterdiği saptanmıştır. Diamicron'un in vitro olarak LDL oksidasyonunun inhibe edilmesinde C vitamini kadar etkili olduğu gösterilmiştir (66). Buna karşın, glipizid, glibenklamid ve tolbutamid, LDL oksidasyonunu etkilememiştir. Serbest radikal temizleme özellikleri daha önce glibenklamidle tedavi edilen bir grup diyabetik üzerinde yapılan bir çalışmada kanıtlanmıştır. Üçüncü aydan itibaren Diamikron tedavisi, damar duvarı, lipid membranlarındaki oksidatif harabiyet sonucunda oluşan lipid peroksitlerde anlamlı azalma ve SOD aktivitesinde anlamlı bir artış saptamıştır (67).

Diabetli ratlarda lipoprotein peroksidasyonunun ve toksisitesinin probukol ve E vitamini verilmesiyle azalacağı, yapılan deneylerle gösterilmiştir (65). Ayrıca α - tokoferol, askorbat ve tioller gibi serum ve hücre antioksidanlarının bu tür hastalarda azalmasının, oksidasyona bağlı tüketimden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (68). Bununla beraber lipid peroksidasyonu ile diabet arasındaki

ilişkinin yorumunda bazı zıt sonuçların da bulunduğu literatürde görülmektedir (69, 70). E vitamini hakkında da birbirinden farklı sonuçlara varılmıştır. Bir kısım araştırmacı E vitaminini değişmez bulunurken bir kısmı arttığını diğerleri ise azaldığını bulmuşlardır (71, 72, 73).

Diyabetik komplikasyonların multifaktöriyel olduğu düşünülmele birlikte in vitro (74), hayvan (75) ve insan çalışmaları (76), serbest radikaller ile oluşan oksidatif stresin önemli bir rolü olduğunu göstermiştir. Diyabetli hastalarda hiperglisemi ile paralel olarak daha fazla O_2^- ve H_2O_2 üretilmektedir. Glukoz konsantrasyonunun artması serbest radikal oluşumunu hızlandırır ve sonuçta oksidatif stresin göstergesi olan protein substratların nonenzimatik glikasyonu ve polyol yolunda bir artış gözlenir. Reaktif oksijen metabolitesinin aşırı üretimi klinik ve eksperimental böbrek hastalıklarının artışında da rol oynar (77). Bu hastalıklar akut ve kronik, glomerular ve tübüler bozukluklardır ve hem immunolojik hem de nonimmunolojik yollarla oluşur. Diğer organlarda olduğu gibi böbrekte de hücreleri oksidan hasara karşı koruyan esansiyel bir defans sistemi vardır. sechi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (79) streptozotosin uygulanarak oluşturulmuş diyabette ratların böbreğinde Cu, Zn-SOD ve katalaza ait mRNA seviyelerinin arttığı gözlenmiştir. Diyabetli ratlarda öglisemi oluşturulmak üzere insülin uygulandığında her iki enzime ait mRNA seviyeleri normale dönmüştür. kan glikoz seviyesi ile her iki antioksidan enzime ait mRNA'larda gözlenen direkt korelasyon göstermektedir ki plazma ve/veya dokudaki yüksek glukoz konsantrasyonu renal antioksidan enzimlerin gen ekspresyonunu etkilemektedir. Uygun dozda insülin ile yapılan tedavi katalaz mRNA'sının normalize etmesi fakat Cu, Zn-SOD mRNA seviyesinde herhangi bir değişiklik yapmaması, bu genlerin glukoz konsantrasyonuna cevapta farklı eşiklere sahip olduğunu düşündürmektedir. Endotel hücre kültüründe yüksek glukoz konsantrasyonlarına maruz kalmanın Cu, Zn-SOD ve katalazın her mRNA, hemde aktivitelerinde artış yapması; artmış serbest radikal üretimine kompensatuvar bir cevap olarak görülmektedir (78). Bunun yanında bazı araştırmacılar kimyasal yolla oluşturulan diabette böbrek dokusunda Cu, Zn-SOD'yi azalmış (92), diğerleri ise katalazı azalmış olarak

bulmuşlardır. Bu farklılıkların sebebi tam olarak tahmin edilememekle birlikte alınan tedavinin tipine, hastalağın şiddetine ve süresine bağlanmaktadır.

İyi kontrol edilmeyen şahısların ve streptozotosin ile diabet oluşturulmuş, diabetik ratların nötrofilleri tarafından serbest oksijen radikallerinin anormal bir şekilde üretildiği gösterilmiştir (80, 81, 82). Polioliol yolunda hız-sınırlayıcı bir enzim olan aldoz redüktazın nötrofil içindeki aktivitesinin artışı ile serbest oksijen radikalın üretimin artabileceği iddia edilmiş ve bu enzimin inhibitörü olan Epalrestat (Epa) kullanılarak azaltılıp azaltılamayacağı yönünde araştırma yapılmıştır.

İyi kontrol edilmemiş diabet hastalarında aşırı glikoz plazma proteinlerinin glikasyonunun artışına sebep olur. Proteinlerin bu non-enzimatik glikasyonunun serbest oksijen radikallerinin üretimi üzerinde oksidatif stresin artmasına netice vereceği düşünülmektedir (83, 84). Oksidatif stresin artması ve özellikle plazma hidroksil plazma hidroperoksitlerinin seviyesindeki yükselme NIDDM'de gözlenmektedir (85, 86). Aşırı serbest radikal üretimi aynı zamanda LDL'nin oksidatif hasarına, okside LDL'nin aterojenik etkisinin hızlanmasına ve adezyon moleküllerinin ekspresyonunun modülasyonuna yol açar (87, 88).

Biz çalışmamızda sadece enzimatik antioksidan sistem ile insüline bağımlı olmayan diyabetin ilişkisini inceledik. Çalışma materyali olarak eritrositleri seçmemizin nedeni şu idi: Eritrositler vücut hücreleri içinde oksijen ile en çok temas eden ve oksidatif strese en yakın olan hücrelerdir. Çünkü bu hücrelerin herbiri taşıdığı yüzmilyonlarca hemoglobin molekülü ile bu miktarın dört katı oksijen taşımaktadır. Ayrıca her heme molekülü bir tane demir atomu taşımaktadır. Fe⁺² atomunun fenton reaksiyonu ile oksidatif streste aldığı rol "genel bilgiler" kısmında detaylı olarak tartışılmıştır. Dolayısıyla diyabette hiperglisemiye bağlı serbest radikal artışı (89) ilk olarak damar endotelleri ile damar içi hücreleri etkileyecektir. Bu bakımdan özel konumu nedeniyle sadece eritrosit içi antioksidanlardan SOD, CAT ve GSH-Px'i çalıştık. GSH-Px ve SOD aktivitesinin her ikisinde birden azalma olmasına rağmen, bunlardan istatistiksel açıdan anlamlı olanı SOD idi (p< 0, 05). CAT aktivitesinde önemli bir artış mevcuttu (p< 0,05).

Enzim aktivitelerinin birbirine zıt olarak artma ve azalmaları iki sebebe bağlı olabilir:

- 1) SOD aktivitesi azalmıştır. Çünkü bu enzimin ürettiği H_2O_2 başka kaynaklardan da geliyor olabilir. Bu durumda ürün miktarının fazlalığı reaksiyonu yavaşlatabilir.
- 2) CAT aktivitesinin artışı kompanse edilebilir. Yani GSH-Px aktivitesinin azalması hemen hemen aynı reaksiyonu katalizleyen CAT enziminin aktivitesini kompanse edilebilir. Böylece oluşan H_2O_2 ortamdan aynı hızda uzaklaştırılmış olur.
- 3) GSH-Px enzimi CAT gibi kofaktöre ihtiyaç duymayan bir enzim değildir. Aktivitesinin devamı için sürekli olarak indirgenmiş glutatyon ve NADPH'ye ihtiyaç vardır. Bu kofaktörlerin miktarındaki bir azalma enzim aktivitesindeki bir azalma ile kendini gösterebilir. Biz glutatyon ve NADPH miktar tayini yapmadığımız için kesin birşey söylemek güçtür. Ancak literatürde bizim bu hipotezimizi destekleyen çalışmalar mevcuttur (90, 91). G.Paolisso ve Giugliano yaptıkları araştırmada diyabetli hasta eritrositlerinde GSH-Px aktivitelerini düşük bulmuşlardır. Niva ve arkadaşları ise çalışmalarında diyabetli hasta eritrositlerinde SOD aktivitesinde belirgin bir azalma ve CAT aktivitelerinde belirgin bir artma tesbit etmişlerdir. Bu araştırmalar bizim çalışmamızla paralellik taşımaktadır.

Sonuç olarak şunları söyleyebiliriz:

- 1- İnsüline bağımlı olmayan diyabette görülen komplikasyonlara oksidatif stresin katkısı vardır. Bunu, eritrosit antioksidan enzimlerinin aktivitelerinin değiştiğini gösteren verilerimizden çıkarıyoruz.
- 2- Enzim aktivitelerindeki azalmalar, aktif olarak kullanılan enzimlerin yıkılışının artmasına bağlı olabilir.
- 3- Antioksidan savunmanın durumu çok komplikedir. Muhtemelen enzimatik olmayan antioksidan sistemde de köklü değişiklikler olmaktadır. Ancak biz E vitamini, C vitamini, glutatyon ve diğer antioksidanları çalışmadığımız için çalışmamızın ışığında bunu iddia etmemiz ancak diğer literatürlerin verilerine dayanmaktadır.

6. ÖZET

Bu çalışmada tip II diabetes mellitusu olan hastaların (n=50) eritrositlerinde süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-P_x) aktiviteleri ölçüldü.

SOD aktivitesi ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile belirlendi. Bu sistem tarafından üretilen süperoksitler NBT'yi indirgeyerek koyu mavi bir renk oluşturur. Eğer ortamda enzim varsa renk oluşmaz. Katalaz aktivitesi, ultraviole spektrum sahasında H₂O₂'in harcanması üzerinden ölçüldü. Glutatyon peroksidaz aktivitesi, NADPH'nin maksimum absorbans verdiği 340nm'de NADPH'nin harcanması ile meydana gelen absorbans azalması esasına göre ölçüldü.

Bulunan sonuçlar kontrol grubu (n=50) enzim aktivite değerleri ile karşılaştırıldı. Diabetes mellituslu hastaların eritrositlerinde SOD aktivitesi 653,2 ± 215,5 Ü/gr Hb, CAT aktivitesi 196,3 ± 53,3 K/g Hb, GSH-P_x aktivitesi 1236,5 ± 478,6 U/g Hb olarak bulundu. Bu sonuçlardan SOD ve CAT aktivitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı idi (p< 0,05). Hasta ve kontrol grubunun GSH-P_x aktiviteleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı.

Mevcut bulguların ışığı altında şu sonuca varıldı: İnsüline bağımlı olmayan diabetes mellitus gibi glukoz toleransının bozulduğu durumlar, serbest oksijen radikallerin aşırı oluşumu ile ve daha sonra buna cevap olarak serbest radikal süpürücü enzimlerin artışı ile sonuçlanabilir.

7. SUMMARY

ERYTHROCYTE GLUTATHIONE PEROXIDASE, SUPEROXIDE DISMUTASE AND CATALASE ACTIVITIES IN PATIENTS WITH NON -INSULINE DEPENDENT DIABETES MELLITUS

In this study, the activities of SOD, CAT and GSH-Px were measured in the erythrocyte of the patients with type II diabetes mellitus (n=50).

SOD activity was determined with xanthine/xanthine oxidase system. The superoxides produced via this system form a dark blue colour reducing NBT, if the enzyme is present in the reaction mixture, the colour does not appear. The catalase activity was measured considering the consumption of H₂O₂ in the ultraviolet spectrum area. The glutathione peroxidase activity was measured upon the diminishing in the absorbance of NADPH consumption at 340 nm, in which NADPH gives a maximal absorbance.

All the results obtained from patient groups were compared with the results of control groups. The erythrocyte enzyme activities in the patients with NIDDM were found to be following: SOD, $653,2 \pm 215,5$ U/g Hb; CAT, $196,3 \pm 53,3$ K/g Hb; GSH-Px, $1236 \pm 478,6$ U/g Hb.

The SOD and CAT activities were found to be statistically significant comparing with control groups ($p < 0,05$).

There was no significant difference between the activities of GSH-Px in the patient and control groups.

Considering these results, we conclude that the conditions where the glucose tolerance impaired such as insulin independent diabetes mellitus results in excessive production of the oxygen radicals and then increase in the radical scavenging enzymes.

8. KAYNAKLAR

1. Akkuş İ.: Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza yayıncılık, Konya, 1995
2. Van L.F.: Free radicals, Analytical Chemistry. 1993, 65: 12-15.
3. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull, 1993, 49 (3): 479-480.
4. Lunec J, Blake D. Oxygen free radicals: Their relevance to disease processes. In: Cohen RD, Lewis B, Alberti KGMM. The Metabolic and Molecular Basis of Acquired Disease. Balliere Tindall, London. 1990, 189-212.
5. Deby C, Pincemail J. Oxygen toxicity, free radicals and defense mechanisms. In Fünfgeld EW. Rökan (Ginkgo Biloba). Recent result in pharmacology and clinic. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.1988, 56-70.
6. Guemori L, Artur Y, Herberth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood. Clin Chem. 1991, 37-11, 1932-1937.
7. Kozumbo WJ, Trush MA, Kensler TW. Are free radicals involved in tumor promotion. Chem. Biol. 1985, 54: 199-207.
8. Niwa Y, Kanoh T, Sakane T, et al. The ratio of lipidperoxides to superoxide dismutase by tumor necrosis factor: Possible protective mechanism. Science. 1988, 242: 941-943.
9. Halliwell B. Reactive oxygen species in living system: source, biochemistry and role in human. Am J Med.1991, 91: 314-322.
10. Evans PH. Free radicals in brain metabolism and pathology, Br. Med Bull.1993, 49 (3), 577-587.
11. Klebanoff SJ. Oxygen metabolism and toxic properties of phagocytes. Ann Int Med,1980, 93: 480-489.
12. Fremann BA, Crapo JD. Free radicals and tissue injury. Lab Invest.1982, 47: 412-426.
13. Weiss SJ, Lobuglio AF. Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. Lab Invest.1991, 47: 5-18.

14. Fridovich I.: Superoxide radical: An endogenous toxicant, *Ann. Rev. Pharmacol Toxicol.* 1983, 23, 239-57.
15. Sies H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. *Am J Med.* 1991, 91: 331-338.
16. Halliwell B, Gutteridge JMC. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *The Lancet*;1984, 23: 1396-1397.
17. Anderson R, Theron AJ, Ras GJ. Regulation by the antioxidants ascorbate, cysteine and dapsone of the increased extracellular and intracellular generation of reactive oxidants by activated phagocytes from cigarette smokers. *Am Rev Resp Dis.* 1987, 135: 1027-1032.
18. Jendryczko A, Szpyrka G, Kozowicz M. Effect of passive smoking and vitamin E supplementation on blood antioxidant status. *Biochem J.* 1991, 12; 204-210.
19. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte. *Journal of Biological Chemistry.* 1969, 25: 6949-6055.
20. Amstad P, Peskin A, Shah G, Mirault ME, Moret M, Zbinden I, Cerutti P. The balance between Cu, Zn-superoxide dismutase and catalase affect the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. *Biochemistry.* 1991, 30: 9305-9313.
21. Szedlacsek SE, Duggleby RG, Vlad MO. Enzyme catalysis as a chain reaction. *Biochem J.* 1991, 279: 855-861.
22. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals catalytic metal ions in human disease. An overview. *Methods in Enzymology.* 1990, 186:76-85.
23. Valenzuela A. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci.*1990, 43: 301-309.
24. Ansari KA, Kaplan E, Shoeman D. Age-related changes in lipid peroxidation and protective enzymes in the central nervous system. *Growth, Development and Aging.*1989, 53: 117-121.
25. Köse K, Doğan P, Kardaş Y, et al. Lipid peroxidation and antioxidant activity in rheumatoid arthritis. *T. J. Med. Sciences.*1994, 22: 31-34.

26. Rangan U, Bulkey GB.: Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury, *Br Med Bull.*1993, 49 (3): 700-718.
27. Beckman G, Lundgren E, Tarnvik A. Superoxide dismutase izozymes in different human tissues, their genetic control and intracellular localization. *Human Heredity.*1973, 23: 338-345.
28. Sechi LA, Ceriello A, Griffin CA, Catena C, Amstad P, Schambelan M, Bartoli E. Renal antioxidant enzyme mRNA levels are increased in rats with experimental diabetes mellitus. *Diabetologia.*1997, 40: 23-29.
29. Niwa Y, Ishimoto K, Kanoh T. Induction of superoxide dismutase in leukocytes by paraquat: Correlation with age and possible predictor of longevity. *Blood.* 1990, 76: 835-841.
30. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes.* 1991, 40: 405-412.
31. Walter RM, Uriu-Hae JY, Olin KL, Anawalt BD. et al: Copper, zinc, manganese and magnesium status and complications of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 1991, 14 (11): 1050-56.
32. Özdem SS, Şadan G. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve klinik açıdan önemi. *Med J. Akdeniz Üni.* 1994, 9 (1); 63-71.
33. Cominancini L, Pasini FA, Garbin U, Campagnola M, Davoli A, Rigoni A, et al: E-Selectin plasma concentration is influenced by glycaemic control in NIDDM patients: possible role of oxidative stress. *Diabetologia* 1997, 40: 584-589.
34. Baker JR, Zyzak DV, Thorpe SR, Baynes JW. Mechanism of fructosamine assay: evidence against role of superoxide as intermediate in nitroblue tetrazolium reduction. *Clin Chem.*1993, 39/12: 2460-2465.
35. Cunningham JJ, Ellis SL, Mcevigh KL, et al. Reduced mononuclear leukocyte ascorbic acid content in adults with insulin-dependent diabetes mellitus consuming adequate dietary vitamin C. *Metabolism.*1991, 40: 146-149.
36. Kobayashi Y, Ishigame Y, et al. Superoxide dismutase activity of human granulocytes and lymphocytes. *The Lancet.*1977, 16: 865.

37. Wong GHW, Goeddel DV. Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: Possible protective mechanism. *Science*, 1988, 242: 941-943.
38. Rahman I, Nath N. Glutathione and its redox system, superoxide anion and superoxide dismutase of polymorphonuclear leukocytes in essential hypertension. In *J Med. Res.* 1988, 88: 64-70.
39. Corbisier P., Houbion A, Lambert D.: "Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase inactivation by peroxidase and oxygen derived free radicals". *Mechanisms of Ageing and Development.* 1990, 51, 283-297.
40. Gey K.F.: Lipids, lipoproteins and antioxidants. *Biochemical Society. Transactions.* 1990, 18:1041-45.
41. Ceballos, Picot I, Trivier JM; Nicole A. Age-correlated modifications of copper-zinc superoxide dismutase and glutathione-related enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem.* 1992, 38 (1): 66-70.
42. Gaetani GF, Galiano S, Canepa L, et al: Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood.* 1989, 73: 334-339.
43. Mayes PA. Structure and function of the water-soluble vitamins In: Murray RK, Granner DK, PA-Rodwell VW. *Harper's Biochemistry.* 23.ed. Lange medical publication, London. 1993, 573-587.
44. Levine M, Morita K. Ascorbic acid in endocrine systems. *Vitamins and Hormones.* 1985, 42: 1-64.
45. Mayes PA. Structure and function of the lipid-soluble vitamins. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA-Rodwell VW. *Harper's Biochemistry.* 23.ed. Lange medical publication, London. 1993, 588-598.
46. Murata A. Smoking and vitamins C. selected vitamins. Minerals and functional consequences of maternal malnutrition. *Vitamins and Hormones.* 1991, 64: 31-57.
47. Bendich A. Antioxidant vitamins and their functions in immune response. *Adv Exp. Med Bio.* 1990, 262: 35-55.

48. Roos D, Weening RS, Voetman AA, et al. Protection of phagocytic leukocytes by endogenous glutathione: Studies in a family with glutathione reductase deficiency. *Blood*. 1979, 53: 851-865.
49. Stankova L, Riddle M, Larned J, et al. Plasma ascorbate concentrations and blood cell dehydroascorbate transport in patients with diabetes mellitus. *Metabolism*. 1984, 33: 347-351.
50. Vatassery Gt, Morley JE, Kuskowski MA. Vitamin E in plasma and platelets of human diabetic patients and control subjects. *Am J Nutr*. 1983, 37: 641-644.
51. Shoff SM; Mares Perlman JA, Cruickshanks KJ, et al. Glycosylated hemoglobin concentrations and vitamin E, vitamin C and β -carotene intake in diabetic and nondiabetic older adults. *Am J Clin Nutr*. 1993, 58: 412-416.
52. Mooradian AD, Failla M, Hoogwerf B, et al. Selected vitamins and minerals in diabetes. *Diabetes Care*. 1994, 17: 464-479.
53. Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V. *Biyoistatistik*, Özdemir Yayıncılık, 1993. Ankara.
54. Sun Y, Oberley LW, Ying L: A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. 1988; 34:497-500.
55. Aebi H: Catalase; in Bergmeyer HU (ed): *Methods of Enzymatic Analysis*. New York, Weinheim Academic Press. 1974; pp 647-683.
56. Paglia D, Valentine WN: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
57. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Diabetes mellitus, hipertensiyon and cardiovascular diseases. The role of oxidative stress. *Metabolism*, 1995; 44: 363-368.
58. Balcı M, Akyol Ö, Zengin N, Kural G. Antioxidant enzyme status in alloxan-diabetic rat lenses. *Turk J Med Res* 1994; 91-92.
59. Pyorala K, Laakso M, Uusitupa M.: Diabetes and atherosclerosis: an epidemiological view. *Diabetes*. 1987, 3: 463- 524.
60. Kanell WB, Hjorland M, Castelli WP.: Role of diabetes in cardiac disease: conclusion from population studies. *Am J Cardiol*. 1974, 34: 29- 34.

61. Uusittupa M, Niskanen LK, Siitonen O, Voutilainen E, Pyorala K.: Five-years incidence of atherosclerotic vascular disease in relation to general risk factors, insulin level, and abnormalities in lipoprotein composition in NIDDM and non- diabetic subjects. *Circulation*.1990, 82: 27- 36.
62. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL.:Beyond cholesterol: modification of LDL that increase atherogenicity. *New Engl J Med*. 1980, 320: 915-924.
63. Feingold KR, Grunfeld C, Pang M, Doerrler M, Krauss RM.:LDL subclass phenotypes and triglyceride metabolism in NIDDM. *Arterioscler Throm*. 1992, 12: 1496- 1502.
64. Sobenin LA, Tertov VV, Koschinsky T et al.: Modified ldl from diabetic patients causes cholesterol accumulation in human aortic cells. *Atherosclerosis*. 1993, 100: 41-54.
65. Morel DW, Chisolm GM.: Antioxidant treatment of diabetic rats inhibits lipoprotein oxidation and cytotoxicity. *J Lipid Res*.1989, 30: 1827- 1834.
66. O'Brien S.F, Watts G.F, Powrie J.K, Shaw K.M., Miller N.J.: Lipids, lipoproteins, antioxidants and glomerular and tubular dysfunction in type 1 diabetes. *Diabetes Res. Clin Pract*. 1996, 32 (1-2): 81-90.
67. Sundurum R.K., Bhaskar A., Vijayalingam S, Viswanathan M, Mohan R, Shanmugasundaram K.: Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. *Clin sci (Colch)*. 1996, 90 (4): 255-560.
68. Lyons TJ, Oxidised LDL: a role in the pathogenesis of atherosclerosis in diabetes? *Diabet Med*.1991, 8: 411- 419.
69. Velazques E, Winocour PH, Kesteven P, Alberti KGMM, Laker MF.: Relation of lipid peroxides to macrovascular disease in type 2 diabetes. *Diabet Med*.1991, 8: 752-758.
70. MacRury S.M, Gordon D, Wilson E et al.: A comparison of different methods of assessing free radical activity in type II diabetes and peripheral vascular disease. *Diabet Med*.1993, 10: 331-335.

71. Thomson K.H, Godin D.V.: Micronutrients and antioxidants in the progression of diabetes. *Nutr Res.* 1995, 15:1377-1410.
72. Tsai E.C, Hirsch IB, Brunzell J.D, Chait A.: Reduced plasma peroxyl radical trapping capacity and increased susceptibility of ldl to oxidation in poorly controlled IDDM. *Diabetes.* 1994, 43: 1010-1014.
73. Asayama K, Uchida N, Nakane T et al.: Antioxidants in the serum of children with IDDM. *Free Radical Biol Med.* 1993, 15: 597-602.
74. Lorenzi M, Nordberg J.A, Toledo S.: High glucose prolongs cell cycle traversal of cultured human endothelial cells. *Diabetes.* 1991, 36: 1261-1267
75. Low P.A, Nickander K.K.: Oxygen free radical effects in sciatic nerve in experimental diabetes. *Diabetes.* 1991, 40: 873-877.
76. Jennings P.E, Jones A.F, Florkowski C.M, Lunec J, Barnett A.H.: Increased diene conjugates in diabetic subjects with microangiopathy. *Diabet Med.* 1987, 4: 452-456.
77. Ichikawa I, Kiyama S, Yoshioka T.: Renal antioxidant enzymes: their regulation and function. *Kidney Int.* 1993, 45: 1-9.
78. Ceriello A, dello Russo P, Amstad P, Cerutti P.: High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. *Diabetes.* 1996, 45: 471-477.
79. Wohaieb S.A, Godin D.V.: Alterations free radical tissue-defense mechanisms in streptozotocin-induced diabetes rat. Effects of insulin treatment. *Diabetes.* 1987, 36: 1014-1018.
80. Sato N, Shimizu H, Suwa K, Uehara Y, Shimomura Y, Kobayashi I, Kobayashi S: Reduced ability of neutrophils to produce active oxygen species in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Clin Endocrinol* 1992, 31-33.
81. Sato N, Shimizu H, Shimomura Y, Suwa K, Mori M, Kobayashi I.: Mechanism of inhibitory action of ketone bodies on the produce of reactive oxygen intermediates polymorphonuclear leukocytes. *Life Sci.* 1992, 51:113-118.

82. Sato N, Kashima K, Shimizu H, Uehara Y, Shimomura Y, Mori M.: Hypertonic glucose inhibits the production of oxygen-derived free radicals by rat neutrophils. *Life Sci.* 1993 52: 1481-1486.
83. Wolff S.P, Dean R.T.: Glucose autoxidation and protein modification: the potential role of "autoxidative glycosylation" in diabetes mellitus. *Biochem J.* 1989, 245: 243-250.
84. Hunt J, Wolff S.P.: Oxidative glycation and free radical production: a causal mechanism of diabetic complications. *Free Rad Res Commun.* 1991, 12-13:115-123.
85. Baynes J.W.: Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes.* 1991, 40: 405-412.
86. Noberasco G, Odetti P, Boeri D, Maiello M, Adezati L.: Malondialdehyde (MDA) level in diabetic subjects. Relationship with blood glucose and glycosylated hemoglobin. *Biomed Pharmacother.* 1991, 45: 193-196.
87. Khan B.V, Parthasarathy S.S, Alexander R.W.: Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J. Clin Invest.* 1995, 95: 1262-1270.
88. Cominacini L, Garbin U, Fratta Pasini A et al.: Antioxidants inhibit the expression of intercellular cell adhesion molecule -1 and vascular cell adhesion molecule-1 induced by oxidized LDL on human umbilical vein endothelial cells. *Free Rad Biol Med.* 1997, 22: 117-127.
89. Hunt J.V, Dean R.T, Wolff S.P.: Hydroxyl radical production and autooxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J.* 1988, 256: 205-212.
90. Hohman T.C, Beg M.A: Diabetic complication: progress in the development of treatments. *Exp Opin Invest Drugs.* 1994, 3: 1041-1049.
91. Lowenstein C.J, Dinerman J.L, Snyder SH.: Nitricoxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med.* 1994, 120: 227-237

92. Sechi L.A., Ceriello A, Griffin C.A., Catena C, Amstad P, Schambelan M, Bartoli.: Renal antioxidant enzyme mRNA levels are increased in rats with experimental diabetes mellitus. *Diabetologia*.1997, 40: 23-29.

