

T1237

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

NİTROGLİSERİNİN ERİTROSİT ANTİOKSİDAN SİSTEMİNE İN VİTRO VE İN VİVO ETKİSİ

T1237 /1-1

UZMANLIK TEZİ

Dr. Serpil AKTAŞ

ANTALYA-1998

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
Yayıncılık

I.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**NİTROGLİSERİNİN ERİTROSİT
ANTIOKSİDAN SİSTEMİNE İNVİTRO VE
İNVİVO ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Serpil AKTAŞ

TEZ YÖNETİCİSİ
Prof. Dr. Yakup ALICIGÜZEL

ANTALYA-1998

(Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir.)

TEŐEKKÜR

Tezimin yapılıőı sırasında her konuda yardım ve desteğini gördüğüm değerli hocam Prof. Dr. Yakup Alıcıgüzel başta olmak üzere, bu konuda bana katkısı olan tüm hocalarıma ve arkadaőlarıma teőekkür ederim.

15.8.1998
Dr. Serpil AKTAŞ

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| A) GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| B) GENEL BİLGİLER | 2 |
| B.1) Organik Nitratlar | 2 |
| B.1.1) Hücresel Etki Mekanizmaları | 2 |
| B.1.2) Etki Yolları | 3 |
| B.1.2.1) Antianginal Etki | 3 |
| B.1.2.2) Diğer Etkiler | 4 |
| B.1.3) Farmakokinetik Özellikleri | 5 |
| B.1.4) Klinik Endikasyonları | 5 |
| B.1.5) Yan Etkileri | 6 |
| B.1.6) Nitrat Toleransı | 6 |
| B.1.7) Sınıflandırma | 6 |
| B.1.8) Nitrogliserin | 6 |
| B.2) Organik Nitratların Eritrositlerdeki Davranışı | 7 |
| B.2.1) Yapılarındaki NO'yu Bırakma Mekanizmaları | 7 |
| B.2.2) NO'nun Reaktif Nitrojen Ürünlerini Oluşturması | 11 |
| B.3) Eritrositte NO İle Etkileşebilen Sistemler | 12 |
| B.3.1) Antioksidan Enzimler | 12 |
| B.3.1.1) Süperoksit Dismutaz | 12 |
| B.3.1.2) Katalaz | 14 |
| B.3.1.3) Glutasyon Peroksidaz | 16 |
| B.3.1.4) Glukoz-6 Fosfat Dehidrogenaz | 17 |
| B.3.2) Antioksidan Mekanizmalarla İlişkili Olan Sistemler | 18 |
| B.3.2.1) Redükte Glutasyon | 18 |
| B.3.2.1) Glutasyon S Transferaz | 20 |
| C) MATERYAL VE METODLAR | 23 |
| C.1) Materyal | 23 |
| C.2) Metodlar | 23 |
| C.2.1) İnvitro Çalışma | 23 |
| C.2.1.1) İnkübasyon Deneylei | 23 |
| C.2.1.2) Nitrogliserinin Ölçülen Parametreler | 24 |
| Üzerine Olan Direkt Etkisi | |
| C.2.2) İnvivo Hasta Grubu Çalışması | 25 |
| C.2.3) Uygulanan Yöntemler | 25 |
| C.2.3.1) Hemoglobin tayini | 25 |

| | |
|---|----|
| C.2.3.2) CAT Tayini | 26 |
| C.2.3.3) G-6PD Tayini | 28 |
| C.2.3.4) Se-GSH-Px enzim tayini | 30 |
| C.2.3.5) Cu/Zn SOD Tayini | 32 |
| C.2.3.6) GSH Tayini | 34 |
| C.2.3.7) GST Tayini | 36 |
| C.2.4) Kullanılan Labaratuvar Malzemeleri | 37 |
| C.2.4.1) Gereçler | 37 |
| C.2.4.2) Kimyasal Malzemeler | 38 |
| C.2.5) Kullanılan İstatistiksel Analizler | 38 |
| D) BULGULAR | 39 |
| D.1) İnkübasyon Deneyleri | 39 |
| D.1.1) 1 Saatlik İnkübasyon Sonuçları | 39 |
| D.1.2) 3 Saatlik İnkübasyon Sonuçları | 41 |
| D.1.3) İnkübasyonlar Sırasında GSH'ın Zamana Göre Değişimi | 44 |
| D.2) Hemolizat Üzerine Eklenen Nitrogliserinin Ölçülen Parametreler Üzerine Direkt Etkisi | 45 |
| D.3) Hasta Grubu Çalışması | 45 |
| E) TARTIŞMA | 48 |
| F) ÖZET | 56 |
| G) SUMMARY | 57 |
| H) KAYNAKLAR | 58 |

A) GİRİŞ VE AMAÇ

Nitrogliserin preparatları uzun yıllardan beri vazodilatatör etkileri nedeniyle klinikte yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu ilaçlar etkilerini NO mediyatörü aracılığı ile gerçekleştirmektedir. NO'nun temel etki alanı endotel hücreleridir. Bunun yanında gerek ilaçlar yoluyla vücuda giren, gerekse invivo sentezlenen NO eritrosit içine de girebilmektedir. Eritrosit ortamına giren NO burada hemoglobine ve SH grubu içeren küçük molekül veya proteinlere direkt bağlanabildiği gibi; nitrit ve nitrat gibi maddelere oksitlenerek te bu yapılara bağlanabilmektedir. Bu yollarla bağlandığı proteinlerin fonksiyonlarını bozarak hücre içi metabolizmada değişikliklere yol açabilmektedir.

NO'nun eritrosit ortamında hemoglobinle olan etkileşimi oldukça dikkat çekicidir. Hemoglobine bağlanan NO oksijen bağlama kapasitesini azaltarak methemoglobinemiye yol açar. NO için bir yakalayıcı kapan gibi davranan hemoglobinin yanısıra SH grubu içeren proteinler de eritrositler içinde NO ile etkileşime girebilirler. Bu proteinlerin arasında enzimler oldukça önemlidir. Özellikle eritrositin antioksidan savunmasında görev yapan enzimler NO ile etkileşime girerek aktivitelerinde değişikliklere yol açabilirler.

Eritrosit içinde NO ile meydana gelebilen bu olaylar direkt NO etkileşimi ile ya da NO yoluyla oluşan reaktif nitrojen ürünleri yoluyla olmaktadır. Reaktif nitrojen ürünlerinin eritrosit membranı üzerine olan zararlı etkileri bilinmektedir.

Bu bilgilerin ışığında invitro ve invivo olarak NO donörü olan Nitrogliserinin eritrosit antioksidan enzimler üzerine olan etkisini ve olası etkinin mekanizmasını belirleyebilmek amacıyla bu çalışmayı planladık.

B) GENEL BİLGİLER

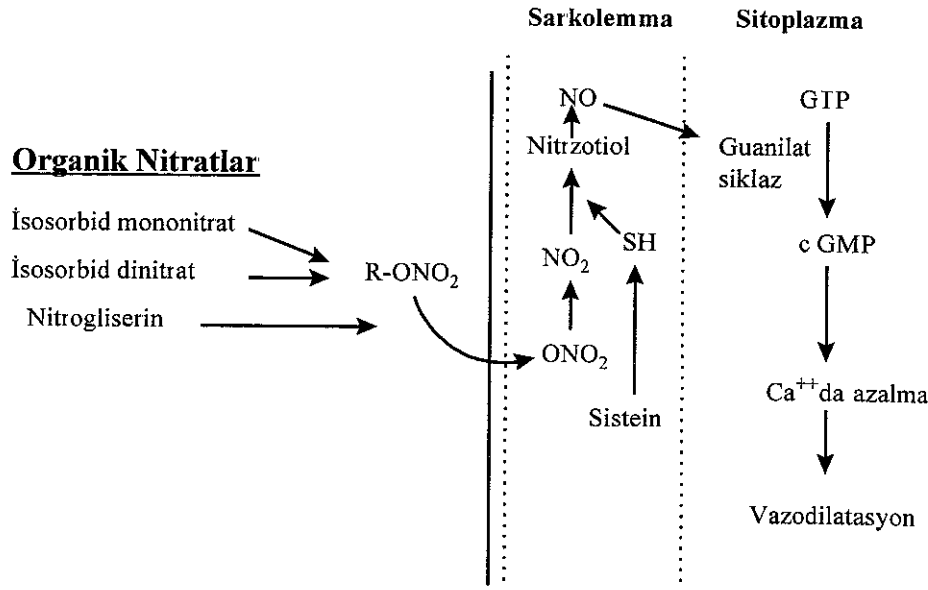
B.1) ORGANİK NİTRATLAR

Vazodilatör etkileri nedeni ile iskemik kalp hastalığı tedavisinde çok yaygın olarak kullanılan organik nitratların etkinliği, ilk olarak 1867 yılında Brunton tarafından tanımlanmıştır (1). Organik nitratlar kimyasal yapıları bakımından gliserol gibi polialkollerin nitrat esterleridir. Başlıca kullanım alanını oluşturan angina pektoristen başka; diğer ilaçlara yardımcı olarak ve bazı durumlarda tek başlarına kullanılabilirler. Diğer miyokard iskemisi sendromlarının, konjestif kalp yetmezliğinin ve özel hipertansif durumların tedavisinde; kontrollü hipotansiyon gerektiren durumlarda da başarılı oldukları kanıtlanmıştır. Büyük arter ve ven dallarını, arteriyelleri ve özellikle venülleri; düz kas hücreleri üzerindeki direkt etkileri yoluyla gevşetirler (1).

B.1.1) HÜCRESEL ETKİ MEKANİZMALARI:

Bu ajanlar çok lipofilik oldukları için hücre membranından kolayca geçerler. Hücre içinde serbest sülfidril yani tiyol (-SH) grubu içeren organik doğal maddelerle (sistein, asetilsistein gibi) etkileşerek stabil olmayan S-nitrozotiyol türevlerine dönüşürler. Bu ara ürünler, organik nitratların nitrik oksit (NO) salıvermelerini potansiyelize ederler. Vazodilatör etkileri NO aracılığı ile gerçekleşir. NO solubl guanilat siklaz enzimini aktive eder. Enzimin

“hem” kısmındaki selektif bir bağlanma noktası NO reseptörünü oluşturur. Guanilat siklazin aktivasyonu ile GTP’den siklik GMP oluşur. Bunun sonucu olarak sitoplazmadaki Ca^{++} düzeyi azalır ve buna bağlı olarak vazodilatasyon meydana gelir (Şekil 1).



Şekil 1: Organik nitratların hücresel etki mekanizması

B.1.2) ETKİ YOLLARI

B.1.2.1) ANTIANGİNAL ETKİ:

Nitratlar hem arterlerde hem de venlerde vasküler düz kas hücrelerinin gevşemesine neden olurlar. Düşük konsantrasyonlarda daha çok venodilatasyon yapmalarına karşın, yüksek konsantrasyonlarda arteriyoler dilatasyon yaparlar. Antianginal etkilerini miyokardın oksijen ihtiyacını azaltarak ve miyokarda olan oksijen sunumunu düzelterek gösterirler. Venodilatasyon preloadda düşmeye ve ventriküler boyutlarda azalmaya yol açar. Sonuçta, miyokard oksijen ihtiyacının major belirleyicilerinden biri olan sol ventrikül duvar gerilimi azalır. Ayrıca, nitratların neden olduğu arteriyoler dilatasyon da afterloadı azaltarak duvar geriliminin azalmasına katkıda bulunur. Kalp atış hacminin bu yollarla azalması, ortalama kan basıncının düşmesine neden olur. Kalbin aortaya kanı pompalarken yenmesi gereken basıncın

ve yaptığı mekanik işin azalması oksijen tüketiminde düşmeye neden olur (6, 7, 8) Bu olay sonucunda subendokardial dokuların daha iyi kanlanması sağlanarak iskemi düzelir (9)

Koroner obstrüksiyonlu hayvanlarla yapılan çalışmaların sonucunda organik nitratların, subendokardiumdaki normal perfüze alanlardan iskemik alanlara doğru kan akımının redistribüsyonunu sağladıkları anlaşılmıştır (10).

Hastalardaki koroner kan akımı üzerine Nitrogliserinin etkisi konulu çalışmaların sonuçları tartışmalıdır. Bazı çalışmalar sublingual veya intravenöz uygulamadan sonra kan akımının arttığını rapor etmişlerdir (11, 12). Buna karşı bu tip ilaçların akım üzerinde etkisinin olmadığına dair çalışmalar da vardır (13).

Xenon-133'ün intrakoroner enjeksiyonu yoluyla gösterildiği üzere; eğer iyi gelişmiş koroner arter desteği varsa organik nitratların uygulamasından sonra, daralmış koroner arterler tarafından beslenen miyokardium alanlarındaki kan akımı artar (14) Kronik stabil anginalı hastalarda organik nitratlar, global miyokardial perfüzyonu etkilemeden, azalmış perfüzyonlu alanlara doğru kan akımını artırarak miyokardial perfüzyonu artırırlar(11).

İyi gelişmiş kollaterallerin varlığı, nitratlara karşı iyi bir cevabın oluşmasında en önemli faktördür (14, 15). Sistemik nitratların verilmesinden sonra angina öncesi kalp hızı artabilir. Fakat bu olay intrakoroner uygulamadan sonra oluşmaz. Nitratlar ventriküler duvar hareketlerini koroner arter hastalarında hem istirahat hem de egzersiz sırasında düzeltir. Bu olay kontrast ventrikülografi, ekokardiografi ve radyonüklid ventrikülografi ile gösterilmiştir (16). Nitratlar miyokardial iskeminin yayılmasını da önlerler. Bu durum egzersiz-talyum tomografik perfüzyon tekniği ile gösterilmiştir (17).

B.1.2.2) DİĞER ETKİLER:

Nitratlar sadece damar düz kaslarını değil bütün düz kasları gevşetirler. Oddi sfinkteri ve safra kanalları üzerindeki bu etkileri belirgindir. Morfinin yaptığı safra koliğine karşı Nitrogliserin kullanılabilir. Mide-barsak kanalı, bronş ve üreter düz kaslarında relaksasyona yol açarlar. Ama bu etkilerinin tedavi yönünden bir değeri yoktur (18, 19)

Vazodilatör etkilerine ek olarak, NO yoluyla guanilat siklazın aktivasyonu trombositler üzerinde inhibitör etkiyle sonuçlanır. Hem anstabil hem de kronik stabil anginalı hastalarda intravenöz Nitrogliserinin bu etkisi gösterilmiştir (18, 19).

B.1.3) FARMAKOKİNETİK ÖZELLİKLERİ

Bu maddeler çok liposolubl oldukları için deriden ve özellikle mukozalardan çok kolay absorbe edilirler. Bu nedenle sublingual, transdermal, oral ve intravenöz uygulanabilirler. Karaciğerden ilk geçişleri sırasında büyük oranda hidrolize olarak inaktif edilirler. Buradaki hidroliz reaksiyonu glutatyon-organik nitrat redüktaz sistemi tarafından gerçekleştirilir (denitrasyon). Molekülden iki nitro grubunun koparılması hızlı, diğerlerinin koparılması yavaş olur. Plazmadaki yarılanma ömrü 2-8 dakikadır (20, 21,22)

B.1.4) KLİNİK ENDİKASYONLARI (20, 23 24, 25)

A) Koroner kalp hastalığı (Myokard iskemisi sendromları)

- 1) Stabil angina pectoris
- 2) Anstabil angina pectoris
- 3) Sessiz iskemi
- 4) Akut myokard infarktüsü
- 5) Koroner vazospazm (Varyant angina)

B) Konjestif kalp yetmezliği

- 1) Vazodilatör tedavi
- 2) Mitral yetmezliği
- 3) İnfarktüs sonrası sol ventrikül dilatasyonunun önlenmesi

C) Arterial kan basıncının kontrolü

- 1) Hipertansif kriz ve vazokonstrüktör ilaca bağlı akut hipertansiyon
- 2) Nöroşüritjik, kardiovasküler ve ortopedik cerrahi girişimler sırasında kontrollü hpotansiyonla kanamanın kontrolü
- 3) Yaşlıların sistolik hipertansiyonu

D) Diğer durumlar

- Üfürümlerin ayırıcı tanısı

B.1.5) YAN ETKİLERİ

Oldukça güvenilir ilaçlar olmalarına rağmen, çeşitli yan etkilere de neden olabilirler. En sık görülenleri vazodilatasyona bağlı olan etkilerdir. Bunlar; baş ağrısı, baş dönmesi, flushing ve ortostatik hipotansiyondur. Hipotansiyon, özellikle volüm kaybı ve düşük sol ventrikül doluş basıncı olan hastalarda görülür. Yüksek dozda oral nitratlar gastrointestinal intoleransa neden olabilirler. Pomad ve flasterle yapılan topikal tedavi deride irritasyon oluşturabilir. Uzun süreli uygulamalarda arteriel kandaki oksijen parsiyel basıncında azalma ve methemoglobinemi görülebilir (26, 27).

B.1.6) NİTRAT TOLERANSI

Nitratlar uzun süreli olarak devamlı kullanıldıklarında, vazodilatör ve diğer hemodinamik etkilerine karşı tolerans gelişebilir. Bunun nedeninin hücre içinde nitratların etkisinde rol oynayan tiyollü bileşiklerin nitrata maruz kalma sonucunda azalmalarının neden olduğu ileri sürülmüştür. Tolerans, genellikle sürekli tedavinin ilk birkaç haftasından sonra oluşur. Nitrogliserinin sürekli infüzyonu 24 saat içinde toleransla sonuçlanabilir (28, 29). Uzun etkili nitrat preparatlarının kesintisiz uygulamalarından 1-2 hafta sonra antianginal etkilerinde belirgin bir azalma görülür (30).

B.1.7) SINIFLANDIRMA

Nitratlar sublingual veya oral uygulandıklarında yaptıkları etkilerin devam süresine göre kısa etkili ve uzun etkili olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Kısa etkili olanlar; Nitrogliserin ve amil nitrittir. Nitrogliserin intravenöz ve flaster uygulamaları yoluyla uzun etkili nitratlar grubuna da alınabilir. Uzun etkili olanlar; izosorbid dinitrat, izosorbid mononitrat, pentaeritrol tetranitrat, eritritil tetranitrat ve mannitol hekzanitratıdır (22,31).

B.1.8) NİTROGLİSERİN

Gliserolün 3 molekül nitrik asitle yaptığı esterdir. Molekül ağırlığı 227,09 gramdır. Uçucu bir sıvıdır. Özellikle sıcak ortamlarda hidroliz nedeniyle kolayca bozular. Sıcaktan ve ışıktan korunması gerekir. Sublingual ve oral uygulanan tabletleri vardır. En sık kullanılan organik nitrat preparatı sublingual Nitrogliserindir. Bukkal uygulama için aerosol sprey şeklinde preparatları da vardır. Pomad şeklinde uygulamaları da etkili bir nitrat uygulama

yoludur. Transdermal veya disk sistemi 24 saat boyunca sabit Nitrogliserin absorpsiyonu sağlar (22, 27).

Anstabil angina veya ciddi konjestif kalp yetmezliği nedeniyle hospitalize edilmiş hastalara 5-10mg/dk 'dan başlayarak intravenöz Nitrogliserin uygulanabilir. İnfüzyon hızı semptomlar kontrol altına alınıncaya kadar ya da ortalama sistemik arterial basınçta %10'luk azalma oluncaya kadar arttırılır (21).

B.2) ORGANİK NİTRATLARIN ERİTROSİTLERDEKİ DAVRANIŞI

B.2.1) YAPILARINDAKİ NO'YU BIRAKMA MEKANİZMALARI

NO salınımına yol ačan vazodilatatörler çok liposolubl bileşikler oldukları için hücre membranlarından doğal olarak ta eritrosit membranından, rahatlıkla geçebilmektedirler. Elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi (EPR) metodu yoluyla Nitroprussid, Nitrogliserin, Hidralazin, Nitritazid ve Hidroksilamin gibi ilaçların, insan kırmızı kan hücre süspansiyonlarında ve intakt fare eritrositlerinde değişik derecelerde NO'ya dönüştüğü gösterilmiştir (32).

NO'nun guanilat siklazın yapısında bulunan ve enzim cevabı ile ilişkili bir "hem" grubuna veya bu enzimin aktivasyonu için bir cevap oluşturabilecek bir enzime bağlandığı düşünölmektedir. NO'nun ilgili hem grubuna bağlanması enzimin aktivasyonuna yol ačan ve guanozin 5 trifosfat cGMP'ye dönüştür. Daha sonra bir seri protein kinaz aktivasyonu olur ve vasköler düz kas relaksasyonu gerçekteşir (32).

NO vazodilatatörlerinin etkilerinde kritik "hem" gruplarının varlığı, guanilat siklaz sistemi ve eritrositler arasındaki birçok benzerlik için açııklayıcı olabilir. Örneğin; NO hemoglobin için iyi bilinen güçlü bir bağdır. Hem hemoglobin hem de metilen blue NO yoluyla oluşturulan guanilat siklaz aktivasyonunun inhibitörleridir. Bazı NO vazodilatatörleri hemoglobini methemoglobine okside ederler (Nitrit, Hidroksilamin, Nitrogliserin ve Sodyum nitroprussid gibi) Azid, Nitrit ve Siyanid methemoglobinin ferrik demirine bağlanırlar. Hb ve Sodyum nitroprussid arasındaki reaksiyon sonunda NO salınımı gerçekteşir. Benzer durumlar altında Nitrit te eritrositte NO'ya dönüşmektedir. Azide ve Hidroksilamin ise hidrojen

peroksit üreten sistem varlığında katalaz enzimi tarafından NO'ya dönüşmektedir Bazı NO vazodilatatörlerin NO'ya dönüşüm mekanizmaları ise halen tartışmalıdır (32, 33).

Gerek invitro inkübasyon çalışmaları gerekse hayvan deneyleri NO vazodilatatörlerinin NO salabilmek için eritrosit içinde değişik derecelerde asimetrik hemoglobin ürünleri oluşturduklarını göstermiştir. Bu ürünler I (redükte alfa subüniti ve okside beta subüniti) ve II (okside alfa subüniti ve redükte beta subüniti) olarak tanımlanmıştır. Bunlar hemoglobinin parsiyel oksidasyonu ve methemoglobinin parsiyel redüksiyonu yoluyla oluşmaktadır (34).

Farklı ilaçlar farklı hibritlerin oluşmasına neden olur. Nitrit uygulanması daha çok I hibridinin oluşmasına yol açar. Nitrogliserin ve Hidroksilamin belirgin olarak ve kabaca iki hibridin artışıyla sonuçlanır. NO ve Hidralazin ise tamamen redükte tetramerin ve düşük konsantrasyonlarda I hibridinin artışına yol açar (Tablo 1) (33,34).

Tablo1:Değişik vazodilatatörlerin oluşturduğu ürünlerin kompozisyonu

| <u>Vazodilatatör</u> | <u>Valans ürünlerinin yüzdesi</u> | | | |
|----------------------|-----------------------------------|----------|-----------|--------------|
| | <u>Hb</u> | <u>I</u> | <u>II</u> | <u>MetHb</u> |
| Nitrit | 29 | 62 | 1 | 9 |
| Nitrogliserin | 6 | 14 | 33 | 47 |
| Hidroksilamin | 70 | 12 | 18 | 0 |
| Hidralazin | 94 | 6 | 0 | 0 |
| NO | 88 | 11 | 1 | 0 |

Bu ajanların hemoglobini nitrozile etme derecelerini saptamak için EPR ve absorpsiyon spektroskopisiyle kombine izoelektrik focusing gel elektroforezi (IEF) metodları uygun bir yaklaşımdır. Valans hibritlerinin absorpsiyon spektrumları çok farklı olmasına rağmen, EPR sinyalleri yüksek derecede korelasyonlu ve istatistiksel olarak anlamlı tek bir kalibrasyon ile uyumludur. Burada sadece nitrozile olan kısım bir EPR sinyali oluşturacağı için bu metod valans hibritlerinin redükte ve nitrozile subünitlerinin total konsantrasyonunu belirlemek için elverişlidir (33).

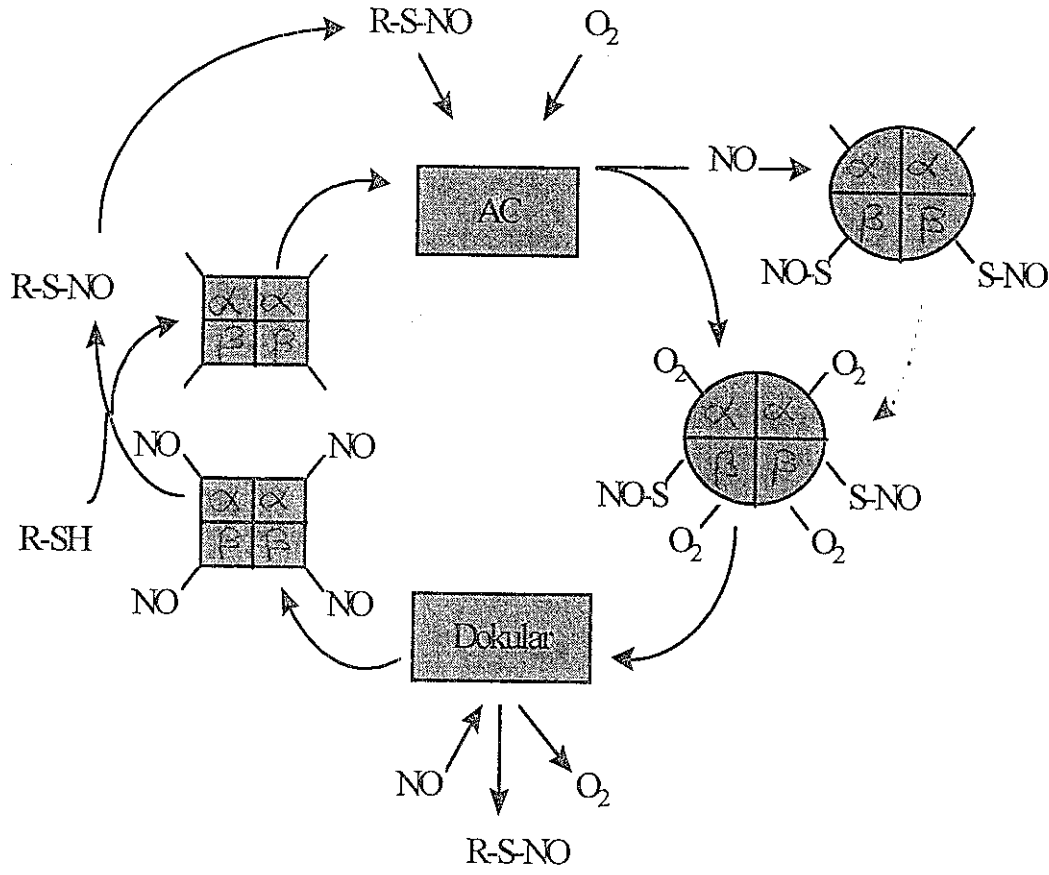
Bu yöntemlerin kullanılmasıyla değişik vazodilatatörlerin redükte subünitleri nitrozile etme dereceleri belirlenmiştir. Bu işlem Nitrit, Nitrogliserin ve Hidroksilamin için kolaylıkla gerçekleştirilmiştir (Tablo II) (33, 34).

Tablo II: Vazodilatatörlerin valans ürünlerini nitrozile etme dereceleri

| Vazodilatatör | Nitrozile Fraksiyon Yüzdesi | | |
|----------------------|------------------------------------|----------|-----------|
| | Hb | I | II |
| Nitrit | 64 | 100 | 0 |
| Nitrogliserin | - | 100 | 100 |
| Hidroksilamin | 10 | 12 | 9 |
| Hidralazin | Total pigmentin %1 | | |
| NO | Total pigmentin %94 | | |

Hemoglobinin sülfidril grupları ve “hem” grubu üzerinden NO bağladığı ve transfer ettiği bildirilmiştir. Hemoglobin her bir tetrameri üzerinden 2 molekül NO bağlar ve transfer eder. Alfa talessemide görülen hipertansiyonun nedeni HbH'nin “hem” grupları tarafından NO'nun (dolayısıyla vazodilatatör ilacın) irreversibl olarak bağlanmasıdır (33,35).

Jia ve arkadaşları, NO'nun hemoglobinin reaktif sülfidril gruplarına bağlanmakla beraber, “hem” gruplarına da bağlandığını göstermiştir. Çalışmalarında, 500-700 nm arasındaki spektrumun; NO vazodilatatörü ile inkübe edilmiş Hb'de artmış olduğunu saptamışlardır. Bu durumda oluşan bu spektrum değişiklikleri NO-hem nedeniyledir. Şekil 2 hemoglobin tarafından oksijen ve NO transferini göstermektedir.



Şekil 2: Hemoglobin tarafından gerçekleştirilen oksijen ve NO transpot mekanizması

Oksijenli ortamda (akciğerlerde) Hb bir taraftan oksijen bağlarken, diğer taraftan da kandaki nitrozotollerden (nitrozosistein, nitrozoalbümin gibi) kaynaklanan nitrat ile de bağ yapar. Dokulara geldiğinde, normal fonksiyonu olarak oksijeni bırakır. Bu sırada bağlanmış olduğu nitratları da dokularda bulunan sülfidril grupları ile reaksiyona girerek onlara transfer eder. Daha sonra dokulardan gelen bu yolla salınan NO ile bağ yaparak NO'yu bu yolla yakalar. Bunun sonucunda methemoglobin meydana gelir (35). Hemoglobin ve NO arasında oluşan bu durum Hb'nin oksijen bağlama kapasitesini etkiler. Bu durumda methemoglobin düzeylerinin ölçümüyle ortaya konabilen hipoksik bir durum ortaya çıkabilir. Bu tablo basit

anemide görülenden daha ağır bir hipoksidir. Böyle olgularda hipoksinin gösterilmesi için methemoglobinden ziyade kanın oksijen içeriğinin ölçülmesi daha iyi bir yaklaşımdır (32).

B.2.2) NO'NUN REAKTİF NİTROJEN ÜRÜNLERİNİ OLUŞTURMASI

Değişik mekanizmalar sonucunda organik nitratların yapısından salınan NO eşleşmemiş bir elektron çifti taşıdığı için serbest radikaldir. İn vivo ortamda salınan NO; nitrit (NO₂⁻) veya nitrata (NO₃⁻) ootoksida olabilir. NO'nun hücrelerden serbest radikal ürünü olarak veya diğer redoks formlarından biri olarak [nitroksil anyonu (NO⁻) veya nitroksil katyonu (NO⁺)] salınması konusunda tartışmalar vardır. NO⁻ ürünü, NO ile ilgili biyolojik etkilerinin bazısı için bir cevap olabilir. NO geçiş metalleri ile etkileşime girdiği zaman NO⁺ benzeri ürünlere dönüşebilir Bu ürün tiyol ve amin nitrozilasyonu için bir cevap oluşturabilir (36)

NO çok reaktif değildir. Ama O₂ ile reaksiyona girerek NO₂⁻ formuna dönüşür. Bu proses sırasında reaktif intermedier nitrojen oksitler oluşur. Bu ürünler NO toksisitesinin bir nedeni olabilir. Bu intermedier ürünlerin yapısı halen kesinlik kazanmamıştır. Ama NO₂ ve dinitrojenioksit (N₂O₃) bu gruba dahil edilebilir. NO'nun ootoksidasyonu özellikle düşük NO konsantrasyonlarında rölatif olarak yavaştır ve biyolojik sistemlerde bu olay çok anlamlı değildir. NO çok daha hızlı olarak O₂ ile reaksiyona girer. Bu durumda SOD ile yarışa girebilir. Bu reaksiyonun biyolojik öneminin daha fazla olduğu düşünülmektedir. Çünkü birçok hücre aktivasyon sırasında O₂⁻ üretir. Reaksiyon sonunda peroksinitrit (ONOO⁻) meydana gelir. Bu ürün çok güçlü bir oksidan ve sitotoksiktir. Bunun protonlanmış formu peroksinitröz asit (ONOOH) anstabildir ve hızlı bir şekilde nitrata dekompanze olur. Bu ürün, hidroksil radikali ve NO₂⁻ veya nitril katyonlu (NO₂⁺) intermedier ara ürünler yoluyla radical reaksiyonları başlatabilir (36, 37)

NO, lipid peroksidasyonu sırasında oluşan alkoksil ve peroksil radikalleri ve protein radikalleri ile de reaksiyona girebilir. Teorik olarak, NO diğer biyolojik oksidanlar yoluyla okside de olabilir(örneğin hidrojen peroksit veya hipoklorit). Ve nitrojenin yüksek oksitlerine dönüşebilir (38, 39)

Özet olarak, biyolojik sistemler değişik nitrojen oksitlere maruz kalırlar. Bu oksitler değişik oksidasyon basamaklarında nitrojen atomu taşırlar. Oksidasyon basamakları (+1)-(+5)

arasındadır. Bu ürünler genellikle “Reaktif Nitrojen Ürünleri” olarak adlandırılmaktadır (Tablo III) (36).

Tablo III: Reaktif nitrojen ürünleri

| <u>Oksidasyon Basamağı</u> | <u>Ürünün Adı</u> | <u>Sembol</u> |
|----------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| +1 | Nitroksil anyonu | NO^- |
| +2 | Nitrik oksit | NO^\cdot |
| +3 | Nitroksil katyonu | NO^+ |
| | Nitröz asit/ Nitrit | HNO_2/NO_2 |
| | Peroksinitröz asit/peroksinitrit | ONOOH/ONOO |
| | Dinitrojen trioksit | N_2O_3 |
| +4 | Nitrojen dioksit | NO_2 |
| | Dinitrojen tetraoksit | N_2O_4 |
| +5 | Nitrik asit/Nitrat | HNO_3/NO_3 |
| | Nitril katyonu | NO_2^+ |

ONOO^- ve NO_2^\cdot güçlü oksidan özellikleri nedeniyle proteinlerdeki değişik aminoasitlerle reaksiyona girerler. Bu aminoasitleri nitrozile ederek aminoasit modifikasyonuna yol açarlar. Özellikle tirozin, sistein, triptofan ve metionin bu reaksiyonlara katılırlar. Tirozin modifikasyonu dikkat çekicidir. Çünkü oluşan bir çok üründen biri olan 3-nitrotirozin stabil bir son üründür ve nitrojen oksitlerin karakteristiğini oluşturur (36).

B.3) ERİTROSİTTE NO İLE ETKİLEŞEBİLEN SİSTEMLER

B.3.1) ANTİOKSİDAN ENZİMLER

B.3.1.1) SÜPEROKSİT DİSMUTAZ: Süperoksit dismutaz (SOD; EC:1, 15, 1, 1 süperoksit, süperoksit oksidoredüktaz) Aerobik ortamda hücreleri süperoksit radikallerinin zararlı etkilerinden koruyan bir enzimdir (40)

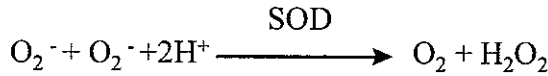
Süperoksit anyonu oksijenle yaşayan tüm canlılarda kaçınılmaz bir şekilde meydana gelir. O_2^- , oksijenin π^*2p orbitallerinden birine bir elektron girdiği zaman oluşur. (41)

Bu radikal başka organik radikallerin oluşumuna neden olarak toksik etki gösterebilmektedir. Bu tepkimeler aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- 1) Organik hidroperoksitlerle alkoksil radikallerinin oluşması
- 2) Tiyol radikallerinin oluşmasına neden olarak SH gruplarının disüflitlere oksitlenmesi
- 3) Spontan dismutasyon reaksiyonu
- 4) Oksijen radikallerinin redüktan özelliğinden dolayı Fe^{+3} 'ün Fe^{+2} 'ye dönüşümü
- 5) Diaçil peroksitlerle 1O_2 üretimi

Oluşan reaktif ürünlerin hepsi biyolojik yaşam için tehlikelidir (40,42).

SOD ilk kez 1968 yılında McCord ve Fridovich tarafından tanımlandığı gibi, aşağıdaki reaksiyon yoluyla, O_2^- 'nin dismutasyonunu sağlayarak H_2O_2 ve moleküler O_2 oluşturmaktadır (40).



İonoforez yöntemiyle SOD'nin yapısı anlaşılmıştır. SOD %16.53 oranında nitrojen, %1.05 oranında kükürt ve az miktarda karbohidrat içermektedir. Protein kısmında metionin yoktur. Heksoz, heksozamin ve siyalik asid çok düşük; aspartik asid, glutamik asid ve glisin ise büyük miktarlarda yapısında yer almaktadır (43).

Yapı bakımından ve aktif merkezindeki geçiş metal iyonları yönünden enzimin hücre içinde 2 değişik formu vardır.

1) Cu VE Zn İÇEREN SOD:

Primer olarak ökaryotik hücrelerin stoplazmasında bulunur. Bunun yanında mitokondride de yer almaktadır. 32000d (Dalton) molekül ağırlığındadır (44). Disülfid köprüsiyle bağlanmış, birbirinin aynı olan iki alt üniteden oluşmuştur. Her bir alt ünite birer adet Cu^{2+} ve Zn^{2+} içermektedir (45). Bu elementler enzim aktivitesi için mutlaka gereklidir. Fakat Zn^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} veya Cd^{2+} da geçebilir ve bu durumda enzimde aktivite kaybı olmaz Süperoksit anyon dismutasyonu Cu^{2+} ile sağlanır (46, 47). Eritrositler sadece Cu/Zn-SOD

içerirler. Cu/Zn-SOD insan nötrofillerinde (sitoplazmik SOD adıyla) total SOD'nin %85'ni oluşturur ve düşük molekül ağırlıklıdır (44).

Cu/Zn-SOD'lar oldukça kararlı enzimlerdir. KCN'ya hassas bir özellik taşırlar. Siyanid tarafından tersinir olarak inhibe edilirler. Siyanidin C atomu , enzimin Cu^{2+} 'ni redükleyebilir. Ancak $10\mu M$ 'ün üzerindeki hidrojen peroksit konsantrasyonlarında enzim irreversibl olarak inhibe olmaktadır. İn vivo koşullarda süperoksit radikalinin kendisi hidrojen peroksit ile yarışa girerek bu inhibisyonu önlemektedir (48, 49).

2) Mn İÇEREN SOD (Mn-SOD):

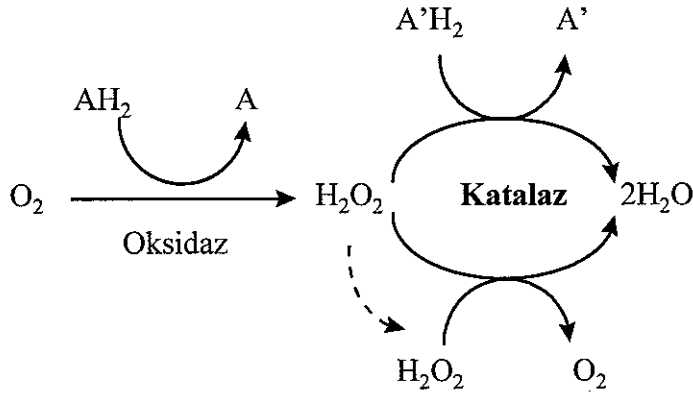
Prostetik grup olarak Mn içerir. Daha çok bakterilerde ve ökaryotik hücrelerin mitokondri matriksinde bulunur. Bakteriyel enzim eşit büyüklükte iki alt birimden oluşur. Her alt ünite bir Mn^{+} atomu içerir. Molekül ağırlığı 40000 d'dur. Mitokondrial enzim ise molekül ağırlığı 80000d olan bir tetramerdir (50).

Enzim kloroform, etanol ve %2'lik sodyum dodesil sülfat tarafından inhibe olur. Siyanürün bu tip bir etkisi yoktur (44).

Bazı hastalıklarda SOD aktivitesinin değiştiği gösterilmiştir. Down sendromlu hastaların eritrositlerinde, üremik ve böbrek yetmezlikli hastaların serumlarında Cu/Zn-SOD aktivitesi yüksek bulunmuştur. Fankoni anemili, orak hücre anemili, Duchen musküler distrofi veya idiopatik pulmoner hemosiderozisli hastaların eritrositlerinde ise azalmıştır (51, 52).

Alkolik karaciğer hastalığı olan kişilerin plazmasında Mn-SOD artmışken, Cu/Zn-SOD aktivitesi azalmıştır. Ankilozan spondilitli ve romatoid artritli hastalarda PMN lökositlerin Mn-SOD ve total SOD aktiviteleri azalmış ancak Cu/Zn-SOD aktivitesi ankilozan spondilitte belirgin bir biçimde artmıştır (53).

B.3.1.2) KATALAZ : Katalaz (CAT, EC: 1,11, 16, Hidrojen Peroksit: hidrojen peroksit oksidoredüktaz) 4 subünit içeren bir hemoproteindir. Peroksidaz aktivitesi dışında bu enzim bir molekül hidrojen peroksiti elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir. İn vivo koşullarda CAT'ın peroksidaz aktivitesi daha baskındır (54).



Enzim yüksek konsantrasyonlardaki H_2O_2 'in su ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyerek ortamdan uzaklaştırır. H_2O_2 , urat oksidaz, glukoz oksidaz ve D aminoasid oksidaz gibi birçok enzimin katalizlediği reaksiyonlar sonucunda oksijene iki elektron transfer edilmesi ile oluşur (54, 55).

CAT eritrositte, kemik iliğinde, müköz membranlarda , böbrek ve karaciğerde yoğun olarak bulunur. Mikro yapılar veya peroksizomlar, karaciğer dahil birçok dokuda bulunur. Bunlar, oksidazlar ve katalaz yönünden zengindir. Bu yapılar H_2O_2 üreten enzimler ile onu parçalayan enzimleri gruplamada büyük avantaj oluşturmaktadır. En yüksek konsantrasyonlara karaciğer ve eritrositte rastlanmaktadır. Karaciğerin CAT aktivitesinin yüksek olması, oluşan peroksitlerin etkisiz hale getirilmelerine katkıda bulunur. Eritrositlerin metabolik hızlarının daha düşük olmasına rağmen buradaki yüksek CAT aktivitesi, hemoglobinin oksidasyonunun önlenmesi için gerekmektedir. Eritrositler, H_2O_2 'i su ve oksijene çeviren GSH-Px aktivitesine de sahiptir. Bu iki enzim birbirinin eksikliğini kompanze ettiği için eritrositler oksidatif hasara karşı korunmaktadır (56).

Bakterisidal etkileri sırasında nötrofiller ve monositler fagositler içerisine büyük oranda H_2O_2 salgırlar. Salınan bu H_2O_2 fagosit hücre membranında lipid peroksidasyonunu başlatarak hasara yol açabilir. CAT fagositlerdeki peroksidasyona karşı koruyucu bir potansiyele sahiptir. Bu yolla ekstrasellüleri üretilen H_2O_2 'ye karşı da fagositler korunmuş olur (59).

Enzim mol başına 4gr Fe içeren tetramerik bir yapıya sahiptir. Protohem grubu aktif bölgenin temel komponentidir. Fe^{3+} içeren her alt birimde bir protoporfirin IX bulunmaktadır (56, 57).

Asetat, ascorbat, azid, siyanid, siyanojenbromid, 2,4-diklorofenol, etanol, florid, format, hidroksilamin, metanol, monokloramin ve nitrit CAT inhibitörleridir (58).

CAT aktivitesinin dokularda ve eritrositlerde konjenital olarak belirgin bir biçimde az olması, klinikte akatalazyza adı verilen hastalığın oluşmasına neden olur. CAT aktivitesinin belirgin olarak düşük olması H_2O_2 'nin yıkılmasını önler ve birikime yol açar. Çoğu zaman asemptomatik seyreden bu tablo sepsisli hastalarda önem taşır. Bu tip hastalarda ağız içinde yaralar, diş çürümeleri ve dişlerin kaybedilmesi gibi semptomlar görülür. Hemolitik hastalıklarda ve pankreatitlerin ağır formlarında serum CAT aktivitesinin arttığı saptanmıştır (59).

B.3.1.3) GLUTATYON PEROKSİDAZ: (GPx, EC: 1, 11, 1, 9, Glutasyon; H_2O_2 oksidoredüktaz) 1957 yılında tanımlanmış bir enzimdir. Dokulardaki ve vücut sıvılarındaki H_2O_2 'nin ve lipid hidroperoksidlerinin parçalanmasını katalizler. Böylelikle vücut dokularını oksidatif hasara karşı koruyucu bir rol oynar (55).

Se bağımlı GPx katalitik aktivitesi için Se'a gereksinim duyar. 23 kd'lik tetramerik bir proteindir. Mol başına 4 atom Se içermekte ve aktif bölgesinde selenosistein bulunmaktadır. Enzimin selenolat formu aktiftir. Peroksidleri alkole redüklerken, kendisi selenenik aside oksidlenir. Redükte glutasyonun reaksiyona girmesiyle enzim, selenosülfid şekline dönüşür. İkinci glutasyonun selenosülfide eklenmesiyle glutasyon okside formuna geçer ve enzim aktif durumuna geri döner. İnsan eritrositlerinde sadece Se bağımlı GPx'in bulunduğu bildirilmiştir (60, 61).

Uzun süreli Se eksikliği tüm dokularda GSH-Px aktivitesinin düşmesine yol açar. Eritrosit içindeki GSH-Px hemoglobinin peroksidasyonunu ve buna bağlı olarak Heinz cisimciği şeklinde presipitasyonunu engeller. Yine aynı koruyucu etkisini eritrosit membranı üzerinde de gösterir (55).

Fosfolipid hidroperoksid GPx (PHG-Px) diğer selenoproteindir. (62). Molekül ağırlığı 20000 d'un üzerinde olan monomerik bir enzimdir. Aktif bölgesinde bir Se atomu taşımaktadır. Membran bileşiklerinin hidroperoksidlerinin redüksiyonunda primer görev yapan sitozolik bir enzimdir. Fosfolipidlerin hidroperoksid derivelerini alkol derivelerine redükte eder (62).

Hem PHG-Px'in hem de GSH-Px'in lipid peroksidasyonunu inhibe edebilmeleri için membranlarda fizyolojik düzeylerde E vitamini bulunması gerekmektedir. E vitamini PHG-Px'in eksikliğinde lipidlerle birlikte okside olur. Bununla beraber ortamda E vitamini yoksa PHG-Px serbest radikallerin çoğalma hızını sadece yavaşlatabilir (62).

Plazmada bulunan GPx'in eritrosit ve diğer hücrelerde bulunan GPx'ten immunolojik açıdan farklı olduğu bildirilmiştir. Bu enzim de Se içermektedir ama glutatyona olan affinitesi 10 kat daha azdır. Cu, Hg ve Zn bu enzimi tamamen inhibe eder. Bu enzimin görevi, ekstrasellüler H₂O₂'ye karşı koruma ve glutasyon transportunu sağlamaktır (63).

Karaciğer , iskelet kası ve renal kortekste yoğun olarak Se bağımsız GPx bulunmaktadır. Daha küçük molekül ağırlıklı bu enzim bir selenoprotein değildir ve H₂O₂ dışında diğer organik hidroperoksidleri substrat olarak kullanabilir. Bu enzimin glutasyon S transferaz ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır (64).

Lökosit ve makrofaj gibi fagositik hücrelerde GSH-Px yüksek oranda aktiviteye sahiptir. Bu enzim bu hücreleri fagositoz sırasında kendi ürettikleri hidroperoksidlere karşı korur. Kanama bozuklukları ile ilişkili olarak trombositlerde azalmış GSH-Px aktivitesi saptanmıştır. Kapiller membranın peroksidasyonuna bağlı olarak gelişen ödemde de plazmadaki aktivitesi düşer (55).

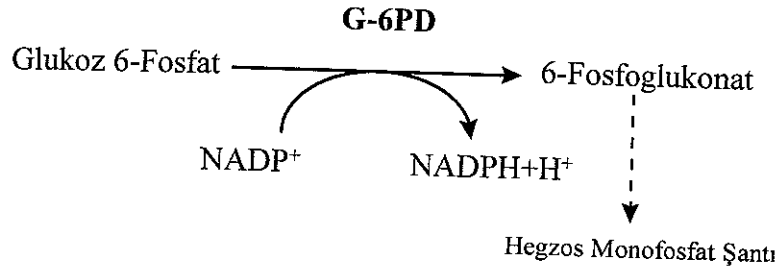
Karaciğerde bulunan yüksek orandaki GSH-Px aktivitesi H₂O₂'den ziyade lipid peroksidlerinin detoksifiye edilmesinde önemlidir. Lipid hidroperoksidleri üzerine CAT'ın öncelikle etkisi olmaz; dekompanzasyon için daha sonra devreye girer (55).

Bulgular Se ve GSH-Px aktivitesinin lens dokusunu oksidatif hasara karşı koruduğunu göstermiştir. Buna bağlı olarak katarakt gelişimi önlenir(55).

GPx inhibitörleri: Adenozin, adenozin 5'-tetrafosfat, ADP; AMP; ATP, Ca, Co, CTP, Hg, NAD⁺, NADP⁺, NADPH, Ni; D-penisilamin ve Zn'dir (65).

B.3.1.4) GLUKOZ 6 FOSFAT DEHİDROGENAZ (G-6PD, EC:1, 1, 1, 49) İdentifiye edilmiş subünitlerden oluşmuş dimerik yapıda bir enzimdir. Herbir subünitinin molekül ağırlığı 60000 d'dur. Enzim tetramerik bir yapıda da bulunabilir. Bu formu da enzimatik olarak aktiftir. Normal eritrosit G-6PD'nin tüm peptidlerinin sekans analizi yapılmıştır. İki G-6PD varyantının parsiyel aminoasit sekansında, A tipinde ve Hektoen'de normal G-6PD'den tek bir aminoasit farklılığı vardır (66).

G-6PD glikoliz ile hegzos monofosfat şantı arasında, iki reaksiyonu birbirine bağlayıcı bir görev taşımaktadır (66).



Enzim riboz-5-fosfat üretiminden sorumlu olan hegzos monofosfat şantı (HMP) metabolik yolunun ilk basamağını oluşturduğu için bu metabolik yolun kontrolünü sağlar. İnsan vücudunda kan, böbrek, kalp ve iskelet kasında yaygın olarak; serumda ise az miktarda bulunmaktadır. Aktif enzim 2 molekül NADP⁺ ile bağlanmış dimerik şekildedir. NADP⁺'yi de koenzim olarak kullanabilir, bu durumda enzim aktivitesi normal düzeyinin %4-10'nuna kadar düşer (67).

HMP yolunun fizyolojik önemi büyüktür. Nükleotid sentezi için gerekli olan pentoz fosfatların ve hücreyi oksidatif streslere karşı koruyan ve biyosentezlerde redüktif özellik taşıyan NADPH üretimini sağlar. Hücreler için NADPH üretiminin tek yolu HMP'dir. Bunun yanında antioksidan özelliği büyük olan redükte glutatyonun hücre içindeki varlığını koruyabilmesi için NADPH'a gereksinimi vardır (68).

G-6PD yetmezliğinin dünyadaki prevalansı yüksektir. Bu yetmezlik X'e bağımlı bir geçiş gösterir. Ciddi yetmezliklerde, yenidoğan döneminde hemolitik krizler görülür. Daha ılımlı formlarında bakla yenmesi, antimalaryal veya sülfonamid gibi ilaçların kullanılması ile hemolitik krizler ortaya çıkar (69).

G-6PD enzim ölçümlerinde optimal aktivite için Mg⁺⁺ iyonlarına gereksinim duyulmaktadır. Glukozamin-6 fosfat, primakin, stearil-KoA, vanadat dimer, vanadat tetramer ve meta-vanadat enzimin inhibitörleri arasında sayılabilir (65).

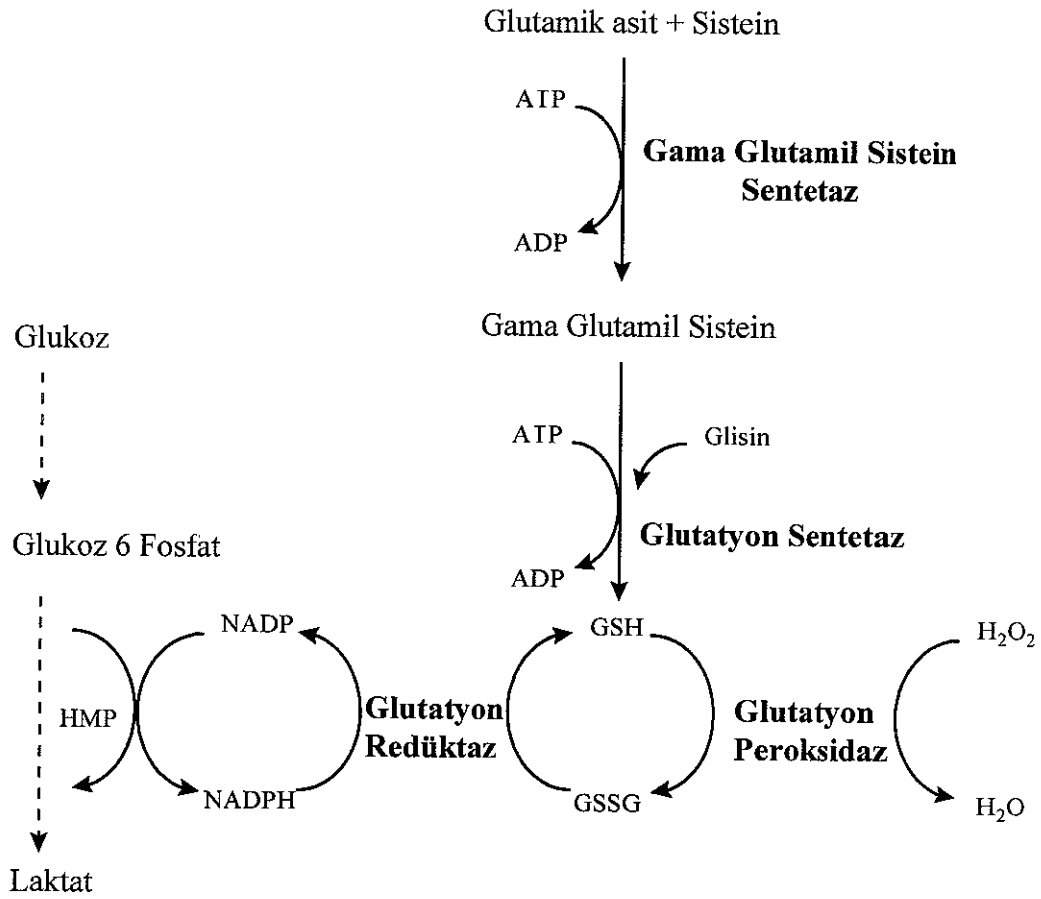
B.3.2) ANTIOKSIDAN MEKANİZMALARLA İLİŞKİLİ OLAN SİSTEMLER

B.3.2.1) REDÜKTE GLUTATYON (GSH): GSH, SH grubu içeren nonprotein bir tiyoldür. Protein tiyollerinin indirgenmiş şeklinin sağlanmasını destekleyerek doğrudan bir antioksidan

etki gösterir. Bu önemli görevinden başka membranlar boyunca aminoasit transportunda ve çeşitli detoksifikasyon olaylarında rolleri vardır. Elektrofilik bileşiklerin konjugasyonunu ve H_2O_2 ile ROOH'lerin indirgenmesini sağlar (54, 70).

GSH eritrositte sürekli sentez edilmektedir. Glutamik asit ve sisteinden γ -glutamil-sistein sentetaz yolu ile bir dipeptid oluşur. Daha sonra glutatyon sentetaz (GSH-S) ise bir tripeptid olan γ -glutamil-sisteinil-glisin'i yani GSH'ı oluşturur (55).

GSH, hemoglobin ve diğer kritik eritrosit proteinlerinin peroksidatif hasarına engel olarak eritrositi zararlı etkilerden korur. GSH'm metabolik yolunda birçok enzim bulunmaktadır (55).



Şekil 4: Hegzos monofosfat ve glutatyon yolları arasındaki ilişki

GSH'in hemen hemen tamamı hücre içinde yerleşmiştir. Serumda yok denecek kadar azdır. Normal şartlar altında hücrelerde GSH daha çok serbest formdadır. Sitozoldeki okside glutatyon (GSSG) miktarı çok azdır ve genellikle GSH miktarının %1-3'ünü oluşturur (54).

GSH hücre içinde SH gruplarına disülfid köprüleri ile bağlıdır. Rat karaciğerinde total hücre içi GSH'ın %30'unun disülfid formunda bulunduğu bildirilmiştir (1).

GSH oksidatif strese karşı önemli bir role sahiptir. Organik hidroperoksitler, intrasellüler GSH'ın okside forma dönüşmesiyle zararsız hale getirilirler. Yine glutatyon, fosfolipidlerde lokalize olmuş ROOH'lerin yıkımını da sağlayabilir (71).

Organik hidroperoksidlerin uygulandığı rat hepatositleri, intrasellüler NADPH temini tükenene kadar hidroperoksidleri metabolize eder. GSSG NADPH tarafından glutatyon redüktaz enzimine bağlı olarak GSH'a indirgenir (71).

Eritrositlerde glutatyon yolunu HMP'ye bağlayan glutatyon redüktazda ve/veya NADPH sağlayan G-6PD'de genetik bir yetmezlik olması, düşük GSH seviyelerine neden olur. GSH eksikliği ise membran fragilitesine ve ilaca bağımlı hemolize yol açar. Bu da kliniğe konjenital hemolitik anemi olarak yansır. GSSG'nin pekçok intrasellüler olay üzerine inhibitör ve geciktirici etkisi vardır. Normal şartlar altında GSSG'nin konsantrasyonu düşük seviyede seyrederek ve hücre dışına transport mekanizmaları, karaciğer ve eritrositte mevcuttur (54, 55).

B 3.2.2) GLUTATYON S TRANSFERAZ (GST, EC 2, 5, 18, RX: glutathione R-transferase): GST, insan hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunan çok gerekli bir enzimdir. Hücrel detoksifikasyon sisteminin major bir komponentidir. Elektrofilik kimyasal ürünlere karşı koruyucu bir ajan olarak davranır. GST birçok formda bulunur. En çok hücrelerin sitozol kısmından identifiye edilmiştir. Bu proteinler sitoplazmadan başka subsellüler kompartmanlarda da bulunmasına rağmen genel olarak sitozolik veya solubl GST olarak tanımlanmaktadır (72, 73).

GST, primer yapı bakımından genel olarak alfa, mü, pi ve teta şeklinde sınıflandırılabilir. Sitozolik GST dimerik bir proteindir. İzoenzimlerin ayırımı izoelektrik fokusing ve kromatofokusing analizler sonucu yapılabilmektedir. Bu yollarla kantitatif değerlendirme yapmak ta mümkündür. Eğer subünitlerin kantitatif değerlendirmesi amaçlanmıyorsa, izoelektrik fokusing ve sodyum dodesilsülfat/ poliakrilamid jel elektroforezi de yararlı olabilmektedir (74).

Bu enzim elektrofilik maddelere karşı hücre sel defans sistemde büyük rol oynamaktadır. Bu maddeler proteinlerle ve nükleik asitlerle etkileşerek genotoksik etkilere yol açabilen maddelerdir. GST için substrat olan bu maddeler arasında polisiklik aromatik hidrokarbonların epoksidleri gibi karsinojenik maddeler yer almaktadır. Bu enzimin katalizlediği ve glutatyonun yer aldığı reaksiyonun sonunda toksik ajanların inaktivasyonu gerçekleşir (75).



R: Elektrofilik ksenobiyotik

GSH: Nükleofilik bileşik

GSH içeren detoksifikasyon reaksiyonları, GSH'ın sülfür atomlarının nükleofilik özelliklerine dayanır. Kimyasal proses kabaca redüksiyon ve konjugasyon mekanizmaları şeklinde ayrılabilir. GST ile katalizlenen reaksiyonların çoğu konjugasyon reaksiyonlarıdır. Oksidatif prosesle beraber (ilaç metabolizmasında faz I) böyle konjugasyonlar (faz II reaksiyonlar) lipofilik ve suda zor çözünen organik moleküllerin transformasyonunu sağlar (75, 76).

İzoenzimlerinin çok sayıda oluşu ve bunların benzer özellikler taşıması, GST'nin doku dağılımının tam olarak belirlenmesinde zorluklar yaratmaktadır. Alfa izoenziminin bulunduğu dokular, barsak, böbrek, karaciğer ve akciğerdir. Mü ise beyin, meme, kalp, böbrek, karaciğer, kas ve pankreasta bulunur. Pi izoenzimi başta eritrositler olmak üzere hemen hemen tüm dokularda bulunur. Teta ise sadece karaciğerde bulunmaktadır. İzoenzimler farklı substratlara olan afiniteleri ile ayrılabilir. Herhangi bir dokudaki farklı hücre tipleri de farklı izoenzimlere sahip olabilir. Örneğim, rat karaciğerinin değişik kısımlarında alfa, mü ve pi sınıfında 7 adet GST subünitinin değişik şekillerde dağılımı sözkonusudur (74). Renal GST'nin farklı dağılımı insanlarda da gösterilmiştir. Buna ek olarak insan akciğerinde genetik faktörler veya sigara içimine bağlı olarak GST izoenzimlerinin farklı ekspresyonları olmaktadır (77)

İzoenzimlerin yapısındaki glutasyon bağlama bölgeleri (G bölgesi) temelde benzerlik göstermektedir (Ser/Thr ve Lys/Arg). Farklı substrat spesifitesine sahip olan izoenzimlerin elektrofilik hidrofobik substratlar için bağlanma bölgelerinin (H bölgesi) yapısı farklıdır. Bu bölge fleksibl bir özellik taşımaktadır ve değişik substratlarla reaksiyona girabilmek için aminoasid rezidülerinin farklı bölgeleri kullanılır (76).

GST ölçümü için kullanılan substratlar arasında; 1-kloro-2-4-dinitrobenzen, bromsülfoftalein, 4-nitrobenzil klorid, etakrinik asit, krotonaldehid, 4-vinilpridin sayılabilir. İnhibitörleri arasında ; bromsülfoftalein, sibacron blue, hematin, etakrinik asit, tributiltin asetat yer almaktadır.

C) MATERYAL VE METODLAR

C.1) MATERYAL

İnvitro deneyleri gerçekleştirmek amacıyla sağlıklı ve gönüllü 30 kişiden heparinli tüplere venöz kan örnekleri alındı. Bu kişilerin 16'sı erkek, 14'ü kadındı. Yaşları 35-66 arasında değişmekteydi.

İnvivo hasta grubu çalışması için; Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil ve Kardiyoloji Servislerine anjina pectoris tanısıyla kabul edilen ve intravenöz (IV) Perlinganit tedavisi uygun bulunan 22 hasta çalışma kapsamına alındı. Bu hastaların 17'si erkek, 5'i kadındı. Yaşları 45-65 arasında değişmekteydi.

C.2) METODLAR

C.2.1) İNVİTRO ÇALIŞMA

C.2.1.1) İNKÜBASYON DENEYLERİ: 30 sağlıklı kişiden, heparinli tüplere alınan kan örneklerinin herbiri önce 3000 devirde 10 dak süre ile +4 C° de santrifüj edilerek plazmalarının ayrılması sağlandı. Eritrosit paketi elde edilebilmesi için eritrositler 3 kez serum fizyolojik ile yıkandı ve üstteki lökosit zengin tabaka ayrıldı. eritrosit paketleri üzerine fizyolojik şartların tam olarak sağlanması amacıyla plazmaları eklenerek (3/2 oranında)

numuneler inkübasyon için hazırlandı. İnkübasyon, Perlinganit (İzotonik glukoz içinde çözülmüş Nitrogliserin preparatı), izotonik glukoz (Perlinganit içinde bulunduğu için), ve serum fizyolojik (kör deney) ile aşağıdaki şekilde 37 °C'deki su banyosunda gerçekleştirildi.

| | 1 saatlik inkübasyon için deney tüpleri | | | 3 saatlik inkübasyon için deney tüpleri | | |
|-----------------------|---|-----|-----|---|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| Numune (µL) | 990 | 990 | 990 | 990 | 990 | 990 |
| Serum fizyolojik (µL) | 10 | - | - | 10 | - | - |
| İzotonik glukoz* (µL) | - | 10 | - | - | 10 | - |
| Perlinganit** (µL) | - | - | 10 | - | - | 10 |

*: Hastaya uygulanan 10 mg/ml'lik Perlinganit dozuna uygun olacak şekilde 1000 kez sulandırılmış.

** : Hastaya uygulanan 10 mg/ml'lik Perlinganit dozuna uygun olacak şekilde

İnkübasyon sonunda tüm örneklerin Hb değerleri ölçülerek GSH ölçümü yapıldı. Daha sonra örnekler santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı ve daha önce tanımlandığı şekilde eritrosit paketleri hazırlandı. Her bir eritrosit paketinin Hb değeri ölçülerek, 1g 'lık ve 5g 'lık Hb içeren hemolizatlar hazırlandı. Bu hemolizatlarda GSH-Px, G-6PD, CAT, SOD ve GST enzim aktiviteleri ölçüldü.

Perlinganit preparatının eritrosit içi GSH düzeylerindeki zamana bağlı etkisini belirlemek için; daha önce tarif edildiği şekilde inkübasyona bırakılan 10 örnekte, inkübasyondan önce ve inkübasyonun 3, 6, 9, 12, 15. dakikalarında GSH ölçümü yapıldı

C 2.1.2) NİTROGLİSERİNİN ÖLÇÜLEN PARAMETRELER ÜZERİNE OLAN DİREKT

ETKİSİ: 30 sağlıklı kontrolden alınan kan örneklerinden eritrosit paketi hazırlanarak, yöntemler için gerekli olacak şekilde hemolizat hazırlandı. Hemolizatlar üzerine ölçümden

hemen önce aşağıdaki şekilde serum fizyolojik, izotonik glukoz ve Perlinganit eklenerek tüm parametrelerin ölçümleri gerçekleştirildi.

| | Deney tüpleri | | |
|-------------------------------------|---------------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 |
| Numune (μL) | 1100 | 1100 | 1100 |
| Serum fizyolojik (μL) | 100 | - | - |
| İzotonik glukoz * (μL) | - | 100 | - |
| Perlinganit ** (μL) | - | - | 100 |

*: Hastaya uygulanan 10 mg/ml'lik Perlinganit dozuna uygun olacak şekilde 1000 kez sulandırılmış.

** : Hastaya uygulanan 10 mg/ml'lik Perlinganit dozuna uygun olacak şekilde

C.2.2) İNVİVO HASTA GRUBU ÇALIŞMASI

İV Perlinganit uygulanan hastalardan infüzyon öncesi ve infüzyondan 1 ve 24 saat sonra alınan kan örneklerinin öncelikle Hb değerleri ölçüldü ve GSH ölçümü yapıldı. Daha sonra her kandan eritrosit paketi hazırlanarak ölçümler için gerekli olan Hb değerlerinde hemolizatlar oluşturuldu. Tüm hemolizatlarda; GSH-Px, G-6PD, CAT, SOD ve GST enzim aktiviteleri ölçüldü.

C.2.3) UYGULANAN YÖNTEMLER

C.2.3.1) HEMOGLOBİN TAYİNİ (55):

• Prensip:

Alkali ortamda Hb'nin ferrisiyanür ile methemoglobine dönüşmesi ve oluşan methemoglobinin potasyum siyanür ile siyanmethemoglobin bileşiğini oluşturması temeline dayanır. En son oluşan bileşiğin 546nm'de verdiği absorbans Hb konsantrasyonu ile orantılıdır.

• **Cözeltiler:**

Drapkin's ayracı: 1g. Sodyum bikarbonat, 0.2g. potasyum ferrisiyanür ve 0.05g potasyum siyanür, içeren karışım 1000ml distile suda çözülür. Koyu renkli şişelerde oda ısısında 6 ay stabildir.

• **Prosedür:**

| | Numune | Kör |
|-----------------------------|--------|-----|
| Drapkin's ayracı (mL) | 6 | 6 |
| Eritrosit paketi (μ L) | 20 | 20 |

Numune ve kör oda ısısında 10 dak. bekletilerek 546 nm'de absorbans okunur.

C.2.3.2) KATALAZ TAYİNİ (56) :

• **Prensip:**

H₂O₂'nin CAT tarafından O₂ ve H₂O'ya parçalanması sırasında reaksiyon karışımındaki 240nm'de absorbansın düşmesi esasına dayanan bir yöntemdir (ϵ_{240} : 0.00394 \pm 0.0002 mmol⁻¹ mm⁻¹)

• **Cözeltiler:**

1) Fosfat tamponu (50 mmol/L, pH:7.0)

a) 6.81g KH₂PO₄, 1000ml bidistile suda çözülür.

b) 8,90g Na₂HPO₄:H₂O, 1000ml bidistile suda çözülür.

Solüsyonlar a ve b'de sırası ile 1:1,5 (v/v) oranında karıştırılır.

2) H₂O₂ (30mmol/L): 0,34ml %30'luk H₂O₂, fosfat tamponu ile 100ml'ye tamamlanır.

Fosfat tamponu 2°C'de stabildir. H₂O₂ ise günlük hazırlanmalıdır

- **Prosedür:**

Eritrosit paketinden 1/5 soğuk distile suyla hemolizat hazırlanır. 1/5 dilüsyondaki hemolizatın hemoglobin değerinin %5g. olması sağlanır. Bu dilüsyondaki hemolizat, pH:7.0'deki fosfat tamponu ile 1/500 kat dilüe edilir.

| | Kör | Numune |
|------------------------------------|------|--------|
| Fosfat tamponu (µL) | 700 | - |
| Hemolizat (µL) | 1400 | 1400 |
| H ₂ O ₂ (µL) | - | 700 |

Reaksiyon H₂O₂ eklenmesiyle başlatılır. Başlangıç absorbansının, A=0.500 civarında olması sağlanır. 15 sn boyunca absorbanslar kaydedilir. 15 sn'deki ΔA₂₄₀'ın 0.100'den büyük ve 0.020'den küçük olmamasına dikkat edilir.

- **Aktivitenin hesaplanması:**

$$k = 2.3/\Delta t \times \log (A_0/A_{15})$$

$$k = 2.3/15 \times \log (A_0/A_{15}) = 0.153 \times \log (A_0/A_{15}) \text{ s}^{-1} (\text{ml})$$

Litredeki k değeri hesaplanacağı için çıkan sonuç 1000 ile çarpıldı;

$$K = 153 \times \log (A_0/A_{15}) \text{ s}^{-1}\text{L}^{-1}$$

Numune 2500 defa dilüe edildiği için bulunan değer 25000 ile çarpıldı, çıkan sonuç stok hemolizattaki Hb %5g. olduğu için 50'ye bölünerek CAT'ın k/g Hb değeri bulundu;

$$k/g \text{ Hb} = [\log (A_0/A_{15})] / 50 \times 382500$$

Anormal kinetiği nedeniyle CAT ünitesi için "First order reaksiyon sabiti (k) " kullanıldı ve eritrosit CAT'ının spesifik aktivitesi hemoglobinle ilişkilendirilmiş şekilde k/g Hb olarak verildi

- **Enzimin Stabilitesi:**

CAT intakt eritrosit ve konsantre hemolizatta 2°C’de birkaç gün, dilüe hemolizatta ise 5-10 dak. satabildir.

- **Metodun Değerlendirilmesi:**

C.V. Değeri: Eritrosit paketinden hazırlanan hemolizatta arka arkaya yapılan ölçümler sonucunda C.V. değeri % 4.34 olarak bulundu.

| CAT Ölçümleri İçin C.V: Değeri | | | |
|--------------------------------|----|--------|---------|
| Çalışılan numune | n | x±SD | C.V.(%) |
| Hemolizat | 12 | 339.85 | %4.34 |

- **Yöntemin Spesifikliğı:**

Bu yöntemle H₂O₂’nin dekompozisyonunu katalizleyen her madde belirlenebilir. Ancak diğer “hem” bileşiklerinin aktivitesi çok daha düşük olduğu için (10⁻³-10⁻⁴) metodun CAT için spesifik olduğu düşünülebilir. Şüpheli durumlarda CAT inhibitörlerinin eklenmesi (örneğin; NaN₃ 0.1 mmol/L) H₂O₂ dekompozisyonunun CAT’ımı yoksa diğer bileşikleremi ait olduğunu gösterir.

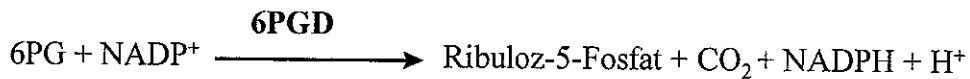
C.2.3.3) G-6PD TAYİNİ (78):

- **Prensip:**

“Modifiye Zinkham Yöntemi” kullanılarak ölçüm yapıldı.



Reaksiyon sonunda açığa çıkan 6-fosfoglukonat (6PG) aşağıdaki reaksiyona katılır



Reaksiyonun başlangıç safhasında, yani hızın lineer olarak artış gösterdiği dönemde, oluşan NADPH miktarı ile G-6PD enzim miktarı orantılıdır. Oluşan NADPH'ın 340nm'de verdiği absorbans artışı, kinetik olarak izlenerek G-6PD aktivitesi ölçülür. Ölçümler pH: 7.4'te yapılmaktadır.

• **Cözeltiler:**

- 1) Stabilize edici solüsyon: 2,7mM EDTA ve 0.7 mM 2-merkaptoetanol karışımıyla hazırlanır.
- 2) NADP⁺ (2mM): 0-4 °C'de 2 hafta, -20°C'de 1 yıl stabildir.
- 3) G6P (6mM): 0-4 °C'de 2 hafta, -20°C'de 1 yıl stabildir.
- 4) MgCl₂ (0,1M): 0-4 °C'de 2 hafta, 20°C'de 1 yıl stabildir.
- 5) Tris-HCl tamponu (1M, pH:8,0): 121.1 g Tris (hidroksietil aminometan)tartılarak; üzerine 250 ml distile su ve 650 ml 1N HCl eklenir ve çözülür. pH:8.0 olarak ayarlanır ve volüm 1 litreye tamamlanır. 0-4 °C'de uzun süre stabildir.

Reaksiyon karışımının hazırlanması: Deney tüpleri içerisine; 550 µL distile su, 100µL NADP⁺, 100µL Tris-HCl ve 100µL MgCl₂ pipetlenerek -20°C'de 1yıl stabildir.

Numunenin alınması: Numuneler asit-sitrat-dekstroz, EDTA veya heparinli tüplere alınabilir. Bu şekilde alınan numunelerde enzim; 0-4 °C'de14-20 gün, 25 °C'de 5 gün stabildir.

• **Prosedür:**

| | Numune | Kör |
|-------------------------|--------|-----|
| Reaksiyon karışımı (µL) | 850 | 850 |
| Hemolizat (µL) | 50 | 50 |
| G6P (6mM) (µL) | 100 | - |
| Distile su (µL) | - | 100 |

Kör küvetine distile su, numune küvetine G-6P eklenerek reaksiyon başlatılır. 340nm'deki dakikalık optik dansite değerleri 10 dakika boyunca kaydedilir.

- **Aktivitenin hesaplanması:**

Dakikalık optik dansite artışının ortalaması ($\Delta OD / \text{dak}$) hesaplanır. Daha sonra bu değer aşağıdaki formüle yerleştirilerek g Hb başına düşen enzim aktivitesi olarak belirlenir.

$$IU/g.Hb = (\Delta OD / \Delta t) / [\epsilon \times \%g.Hb \times V/V]$$

$$IU/g.Hb = [(\Delta OD / \text{dak}) \times 10^5] / 6.22 \times Hb^a \times \text{Hemolizat hacmi}^b$$

a: %g.

b: mikrolitre hemolizat/ ml reaksiyon karışımı

$$IU/g.Hb = [(\Delta OD / \text{dak}) \times 10^5] / 311$$

- **Metodun değerlendirilmesi:**

Eritrosit paketinden hazırlanan hemolizatlarla, arka arkaya yapılan ölçümlerde G-6PD ölçüm yönteminin C.V. değeri %4.23 olarak bulundu.

| G-6PD Ölçümleri İçin C.V: Değeri | | | |
|---|----|------------------|---------|
| Çalışılan numune | n | $\bar{x} \pm SD$ | C.V.(%) |
| Hemolizat | 10 | 8.70 \pm 0.36 | 4.23 |

C.2.3.4) Se-GSH-Px ENZİM TAYİNİ (79):

- **Prensip:**

Se-GSH-Px aktivitesi Paglia ve Valentina'nın birleşik enzimatik yöntemi modifiye edilerek tayin edildi. Birinci aşamada redükte glutatyon, Se-GSH-Px tarafından katalizlenen bir reaksiyonla t-BOOH kullanılarak okside edilir. İkinci aşamada ise ortama eksojen olarak eklenen GR, yine ortama eksojen olarak eklenen NADPH'ı kullanarak okside glutatyonu yeniden redükler. Bu sırada 340nm'de NADPH absorbansındaki azalma ölçülür.

- **Cözeltiler:**

1) Fosfat tamponu (50mM, pH: 7.2): K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 kullanılarak hazırlandı. Tampon kahverengi şişede, 4 °C'de 1 yıl stabildir.

2) Reaksiyon karışımı: 15ml fosfat tamponunda çözülür.

a) EDTA (0.3mM): 0.00221g

b) NADPH (0.1mM): 0.001666 g

c) GR (0.5U): 0.014 g

d) NaN_3 (0.5mM): 0.00065g.

3) Redükte glutatyon (GSH): 0.0015 g glutatyon 2ml tamponda çözülür.

4) t-BOOH: 54.78 μL / 100ml olacak şekilde distile suyla hazırlanır.

• **Prosedür:**

β -merkaptetanollü stabilize edici ajanla, eritrosit paketinden %1g.Hb olacak şekilde hemolizat hazırlanır.

| | GSH (+) | GSH (-) |
|--------------------------------------|---------|---------|
| Reaksiyon karışımı (μL) | 750 | 750 |
| Hemolizat (μL) | 50 | 50 |
| GSH (μL) | 100 | = |
| Distile su (μL) | - | 100 |
| t-BOOH (μL) | 100 | 100 |

t-BOOH eklenmesiyle birlikte her numunede 340nm'de GSH (+), ve GSH (-) deneylerin 3'er dakikalık ölçümleri yapılır.

• **Aktivitenin hesaplanması:**

GSH (+) ve GSH (-) 'li ölçümlerin ΔOD 'si bulundu. Aktivite hesaplanması G-6PD aktivite ölçümünde belirtildiği şekilde yapıldı.

$$\text{Se-GSH-Px Aktivitesi (U/g Hb): } [\text{GSH (+)}\Delta\text{OD} - \text{GSH (-)}\Delta\text{OD}/311] \times 10^5$$

• **Metodun Değerlendirilmesi:**

Aynı eritrosit paketinden hazırlanan hemolizatlarla yapılan arka arkaya ölçümler sonucunda yöntemin C.V: değeri % 5.53 olarak bulundu.

| Se-GSH-Px Ölçümleri İçin C.V: Değeri | | | |
|--------------------------------------|----|------------------|---------|
| Çalışılan numune | n | $\bar{x} \pm SD$ | C.V (%) |
| Hemolizat | 10 | 4.1 \pm 0.40 | 5.53 |

C.2.3.5) Cu/ Zn SOD TAYİNİ (80):

- **Prensip:**

Epinefrinin otooksidasyonu sonucu adrenokrom oluşur. Bu otooksidasyonun , Cu/Zn-SOD ile inhibisyon yüzdesine göre enzim miktarı hesaplanır. Adrenokromun maximum absorbands verdiği 480nm'deki absorbands değışikliğı SOD inhibisyonuyla ilişkilidir.

- **Cözeltiler:**

- 1) Na₂CO₃/NaHCO₃ tamponu. (0.3M, pH:10.2):
- 2) EDTA (0.75M)
- 3) Epinefrin (1.8 mM, pH:2): 0.01M HCl ile günlük hazırlanır.

- **Prosedür:**

Eritrosit paketinden buzlu distile suyla %5g.Hb içeren hemolizat hazırlanır. Hazırlanan bu hemolizat daha sonra tamponla 500 kat dilüe edilerek ölçümde kullanılır.

| | Kontrol | Numune |
|-----------------|---------|--------|
| Tampon (µL) | 550 | 550 |
| EDTA (µL) | 400 | 400 |
| Hemolizat (µL) | - | 50 |
| Distile su (µL) | 50 | - |
| Adrenalin (µL) | 500 | 500 |

Ortama en son 0.5mL epinefrin eklenerek hemen karıştırılır ve 480nm'de köre karşı numune ve kontrol tüplerindeki absorbands değışimi 3 dakika boyunca izlenir.

• **Standart hazırlanması:**

20mM potasyum fosfat tamponu (pH:7.4) içinde 0.0625, 0.125, 0.25 ve 0.5 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan Cu/Zn-SOD (Bovine eritrosit SOD, Sigma) standartları numune gibi çalışıldı. Tüm standartlar çift çalışılarak ortalamaları alındı. Konsantrasyon absorpsiyon (% inhibisyon) değerleri arasında yapılan regresyon analizinde:

$$\text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/mL}) = [(\% \text{ inhibisyon} \times 0.0202) - 30.18] / 35.11$$

Şeklinde bir ilişki saptandı; korelasyon: $r=0.98$ olarak bulundu.

• **Aktivitenin Hesaplanması:**

Kontrol tüpünde inaktif enzim kullanıldığı için, epinefrin kolayca nonenzimatik olarak adrenokroma oksitlenir. Bu nedenle kontrol tüpündeki inhibisyon yüzdesi sıfırdır. Standart ve numune tüplerindeki inhibisyon yüzdesi Cu/Zn-SOD konsantrasyonuna bağlı olarak değişir.

| | |
|--|----------------|
| Kontrol tüpünün $\Delta\text{OD}/\text{dak}$ | 100aktif birim |
| Standartın $\Delta\text{OD}/\text{dak}$ | X |

$$X = [(\Delta\text{OD standart}/\text{dak}) / (\Delta\text{OD kontrol}/\text{dak})] \times 100$$

$$\text{Standartın } \% \text{ inhibisyon değeri} = 100 - X$$

| | |
|--|----------------|
| Kontrol tüpünün $\Delta\text{OD}/\text{dak}$ | 100aktif birim |
| Numunenin $\Delta\text{OD}/\text{dak}$ | Y |

$$Y = [(\Delta\text{OD numune}/\text{dak}) / (\Delta\text{OD kontrol}/\text{dak})] \times 100$$

$$\text{Numunenin } \% \text{ inhibisyon değeri} = 100 - Y$$

Numunenin % inhibisyon değeri bulunduktan sonra standart çalışması ile elde edilen formülde yerine konur. Sonuç %1g Hb cinsinden verileceği için numunenin son hacmindeki Hb hesaplanır ve orantı kurularak %1g.Hb için enzim aktivitesi bulunur.

- **Metodun Değerlendirilmesi:**

Eritrosit paketinden hazırlanan hemolizatta arka arkaya yapılan ölçümlerde C:V: değeri %5.13 olarak bulundu.

| Cu/Zn-SOD Ölçümleri İçin C.V: Değeri | | | |
|---|----|-------------------|---------|
| Çalışılan numune | n | $\bar{x} \pm SD$ | C.V.(%) |
| Hemolizat | 11 | 52.76 \pm 10.30 | 5.13 |

- **Yöntemin Spesifikliği:**

Alkaleen pH'da Mn-SOD ve bazı SOD gibi davranan maddeler inhibe olmaktadır. Bu nedenle bu metod temel olarak Cu/Zn-SOD için önerilmektedir.

C.2.3.6) REDÜKTE GLUTATYON TAYİNİ (55):

- **Prensip:**

Eritrositlerdeki nonprotein sülfidril gruplarının hepsi redükte glutatyon formundadır. 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoik asit), veya DTNB bir disülfid kromojendir ve sülfidril bileşikler ile indirgenerek koyu sarı bir renk verir. Redükte kromojenin absorbanısı 412nm'de ölçülür. Heparinli tüplere alınan kanlarda ölçümler aynı gün yapılır.

- **Cözeltiler:**

1) Presipite edici solüsyon: 1.67g glasiyal metafosforik asit, 0.20g. disodyum veya dipotasyum EDTA ve 30.0 g NaCl tartılır; distile suda çözüldükten sonra hacim 100mL'ye tamamlanır. Bu solüsyon 4 °C'de 3 hafta dayanıklıdır.

2) Fosfat solüsyonu (0.3M): 10.65g. Na₂HPO₄ tartılır ve distile suyla hacim 250 mL'ye tamamlanır. Solüsyon 4 °C'de uzun süre stabildir.

3) DTNB solüsyonu: 40mg 5,5'-dithiobis, 1g./dL'lik sodyum sitrat solüsyonu ile çözüldükten sonra hacim 100 mL'ye tamamlanır. Bu solüsyon 4 °C'de 13 hafta dayanıklıdır.

4) GSH standartları: 10 mg. GSH tartılır ve distile suyla 10mL'ye tamamlanır (100mg/dL) Bu standarttan 2.5-5-7.5-10 mg /dL olacak şekilde dilüsyonlar yapılır. Bu solüsyonlar günlük taze olarak hazırlanmalıdır.

• **Prosedür:**

200 µL tam kan üzerine 1800 µL distile su eklenerek hemolizat hazırlanır. Bu hemolizatın üzerine 3mL presipite edici solüsyon eklenerek karıştırılır. 5 dak. oda ısısında bekletilerek süre sonunda filtre kağıdından süzülür. Elde edilen filtrat ile aşağıdaki yöntem uygulanır.

| | Kör | Numune |
|----------------------|------|--------|
| Filtrat (µL) | - | 500 |
| Presipite edici (µL) | 300 | - |
| Distile su (µL) | 200 | - |
| Fosfat tamponu (µL) | 2000 | 2000 |
| DTNB (µL) | 250 | 250 |

Bundan sonra numune ve kör deney tüpleri üç kez karıştırılır. ve 4 dak. içinde 412 nm'de absorbanslar okunur. Orijinal tam kanın Hb değeri ölçülür.

• **Standart Çalışması:**

Daha önce tanımlandığı şekilde hazırlanan standart solüsyonlarla yapılan ölçümler sonunda elde edilen absorbans değerleri ile konsantrasyon değerleri arasında yapılan regresyon analizi sonunda;

$$\text{Konsantrasyon} = 1.04 + [14.04 \times (\text{OD})]$$

şeklinde bir ilişki ortaya konuldu. (korelasyon: $r=0.989$)

Ortamdaki Hb değeri hesaplanarak sonuçlar 1g/dLHb başına olacak şekilde ayarlandı ve GSH mg/g.Hb şeklinde belirlendi.

• **Metodun Değerlendirilmesi:**

Arka arkaya yapılan ölçümlerde C.V. değeri % 6 88 olarak bulundu

C.2.3.7) GLUTATYON S TRANSFERAZ TAYİNİ (81):

• **Prensip:**

Redükte glutatyon ve 1-kloro-2,4 Dinitrobenzen substrat olarak kullanıldığı ve GST enzimi tarafından tiyoeter-2,4-dinitrofenil glutatyon bileşiminin oluşturulması ve bu sırada 340nm'deki absorbands değişikliğinin GST aktivitesi ile ilişkili olması esasına dayanır

• **Cözeltier:**

1) Fosfat tamponu (0.1M, pH:6.5): 0.8709g K_2HPO_4 ve 0.680g KH_2PO_4 ayrı ayrı 50mL distile suda çözülerek pH:6.5 olacak şekilde karıştırılır. 4°C'de uzun sürede stabildir.

2) 1-kloro-2,4 dinitrobenzen (CDNB) (10mM): 1/5 oranında önce etanolde eritilerek aynı oranda üzerine tampon eklenir.

3) GSH (10mM): 0.003070 g GSH 1mL tamponda çözülür.

• **Numune:**

Eritrosit paketinden 1g /dL Hb olacak şekilde distile suyla hemolizat hazırlanır. Ölçümde bu hemolizat kullanılır.

• **Prosedür:**

| | Deney |
|----------------------|-------|
| GSH (μ L) | 100 |
| CDNB (μ L) | 100 |
| Tampon (μ L) | 725 |
| Hemolizat (μ L) | 75 |

Ortamın ısısı 30 °C olacak şekilde ayarlanır. Deneyden önce tampon 30 °C'de 5 dak bekletilir. Substratın (CDNB) eklenmesiyle reaksiyon başlatılarak, 340nm'de 6 dak. Süre ile absorbans okuması yapılır.

• **Aktivitenin Hesaplanması:**

Absorbans ölçümlerinin ΔOD 'si hesaplanarak, sonuçlar $\Delta OD/g.Hb$ olarak belirlendi

• **Metodun Değerlendirilmesi:**

Aynı eritrosit paketinden hazırlanan hemolizatlarla arka arkaya yapılan ölçümler sonucunda yöntemin C.V. değeri %6.23 olarak saptandı.

| GST Ölçümleri İçin C.V: Değeri | | | |
|--------------------------------|----|------------------|---------|
| Çalışılan numune | n | $\bar{x} \pm SD$ | C.V.(%) |
| Hemolizat | 12 | 17.01 \pm 2.90 | 6.23 |

C.2.4) KULLANILAN LABARATUVAR MALZEMELERİ

C.2.4 1) GEREÇLER

1) Fotometreler:

- a) Beckman model 26 spectrophotometer
- b) Bohringer Mannheim photometer 4010
- c) Shimadzu UV 1600

2) Yazdırıcı: beckman model 39 printer

3) Su banyosu:

- a)Nüve BM 100

4) Santrifüj:

- a) Heraus (Christ) soğutuculu santrifüj
- b)Nüve NF 815

5) Hassas terazi: Sartorius 2472

6) Derin dondurucu: Karteknik marka dondurucu -20°C'ye kadar inebilen ilave motorlu

- 7) Test tüpü: 16×160 mm
- 8) Otomatik pipet: Biohit marka; 5-50, 50-200, 200-1000 µL'lik
- 9) Cam pipet: 1,2,5 ve 10 mL'lik serolojik
- 10) 10)Cam balon jojeler ve beherler

C.2.4.2) KİMYASAL MALZEMELER

Tüm kimyasal maddeler “Sigma” ve “Merck’ten” temin edildi.

C.2.5) KULLANILAN İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Tüm sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmeler “SPSS” paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Grup içindeki farklar “Paired Student *t* Testi” ile karşılaştırıldı. İnkübasyonlardaki GSH konsantrasyonunun zamana göre değişimi “Tekrarlayan Analizlerde Varyans Ölçümü Testi” ile değerlendirildi.

D) BULGULAR

D.1) İNKÜBASYON DENEYLERİ

D.1.1) 1 SAATLİK İNKÜBASYON SONUÇLARI

Nitrogliserin ile yapılan inkübasyon sonuçları, hem serum fizyolojik hem de izotonik glukoz inkübasyon sonuçları ile karşılaştırıldığı zaman, CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinde anlamlı bir inhibisyon oluşturduğu saptandı (Her iki enzim için $p < 0.001$).

Yine aynı deney grubunda CAT ve GSH-Px aktivitesi, İzotonik glukoz inkübasyonlarında serum fizyolojik inkübasyonları ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulundu (Her iki enzim için $p < 0.001$) (Tablo IV ve V, Şekil 5 ve 6)

Nitrogliserin ile yapılan inkübasyon sonuçları, hem serum fizyolojik hem de izotonik glukoz ile yapılan inkübasyon sonuçları ile karşılaştırıldığında Cu/Zn-SOD, G-6PD, GST aktivitelerinde ve GSH düzeylerinde anlamlı bir farklılık bulunmadı.

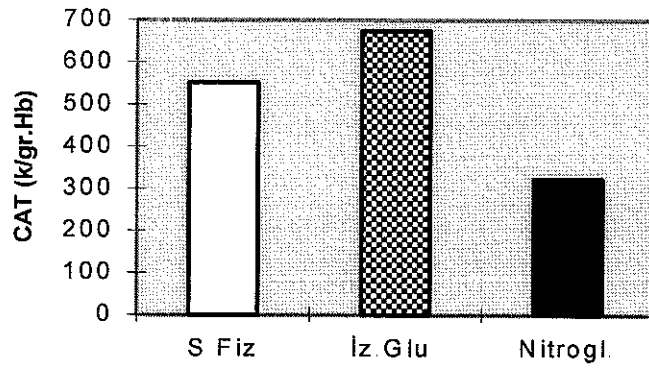
Aynı parametrelerde ; izotonik glukoz ve serum fizyolojik ile yapılan inkübasyonlar sonucunda elde edilen değerler arasında da anlamlı bir farklılık bulunmadı. (Tablo VI)

Tablo IV: Eritrosit üzerine Serum fizyolojik, İzotonik glukoz ve Nitrogliserin eklenmesiyle yapılan inkübasyonun 1. saatindeki CAT değerlerinin karşılaştırılması.

| | Serum Fizyolojik | İzotonik Glukoz | Nitrogliserin |
|---------------------|-------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| n | 30 | 30 | 30 |
| CAT (k/g.Hb) | 552.3 ± 68.30 | 673.63 ± 69.40 ^a | 322.16 ± 62.32 ^{a, b} |

^a: Serum Fizyolojik ile karşılaştırıldığında, p<0.001

^b:İzotonik glukoz ile karşılaştırıldığında, p<0.001



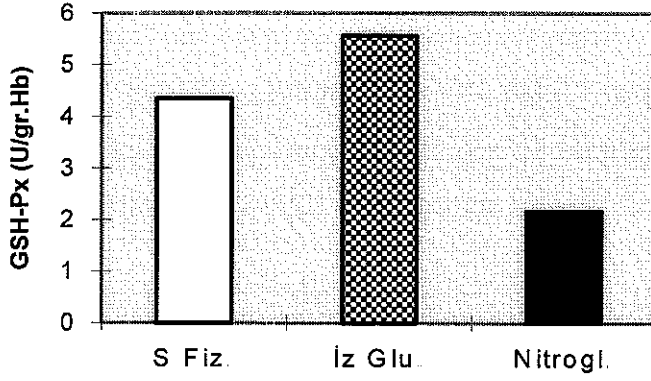
Şekil 5: Eritrosit üzerine Serum fizyolojik (S.Fiz), İzotonik glukoz (İz Glu) ve Nitrogliserin (Nitrogl) eklenmesiyle yapılan inkübasyonun 1 saatindeki CAT değerleri.

Tablo V: Eritrosit üzerine Serum fizyolojik, İzotonik glukoz ve Nitrogliserin eklenmesiyle yapılan inkübasyonun 1 saatindeki GSH-Px değerlerinin karşılaştırılması.

| | Serum Fizyolojik | İzotonik Glukoz | Nitrogliserin |
|------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| n | 30 | 30 | 30 |
| GSH-Px (U/g.Hb) | 4.35 ± 0.58 | 5.55 ± 0.62 ^a | 2.17 ± 0.57 ^{a, b} |

^a: Serum Fizyolojik ile karşılaştırıldığında, p<0.001

^b:İzotonik glukoz ile karşılaştırıldığında, p<0.001



Şekil 6: Eritrosit üzerine Serum fizyolojik (S Fiz), İzotonik glukoz (İz Glu) ve Nitrogliserin (Nitrogl.) eklenmesiyle yapılan inkübasyonun 1. saatindeki GSH-Px değerleri

Tablo VI: Eritrosit üzerine serum fizyolojik, izotonik glukoz ve Nitrogliserin eklenmesiyle yapılan inkübasyonun 1. saatindeki Cu/Zn SOD, G-6PD, GSH ve GST değerleri

| | Serum Fizyolojik | İzotonik Glukoz | Nitrogliserin |
|------------------------|------------------|----------------------------|-------------------------------|
| n | 30 | 30 | 30 |
| Cu/ZnSOD(U/gHb) | 47.36 ± 12.16 | 47.66 ± 11.47 ^a | 47.06 ± 11.46 ^{a, b} |
| G-6PD (U/g.Hb) | 6.98 ± 1.76 | 6.85 ± 1.84 ^a | 6.74 ± 1.86 ^{a, b} |
| GSH (mg./g.Hb) | 25.66 ± 5.67 | 25.03 ± 5.99 ^a | 25.20 ± 5.83 ^{a, b} |
| GST (Δ OD) | 16.86 ± 4.41 | 17.03 ± 3.51 ^a | 17.16 ± 3.94 ^{a, b} |

^a: Serum Fizyolojik ile karşılaştırıldığında

^b: İzotonik glukoz ile karşılaştırıldığında

D.1.2) 3 SAATLİK İNKÜBASYON SONUÇLARI

Nitrogliserin ile yapılan inkübasyon ve hem serum fizyolojik hem de izotonik glukoz ile yapılan inkübasyonlar karşılaştırıldığında CAT ve GSH-Px aktivitelerinde anlamlı bir farklılık bulundu. (Her iki enzim için de $p < 0.001$)

Aynı deney grubunda CAT ve GSH-Px aktivitesi; izotonik glukoz inkübasyonunda serum fizyolojik inkübasyonu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulundu (Her iki enzim için de $p<0.001$) (Tablo VII ve VIII, Şekil 7 ve 8)

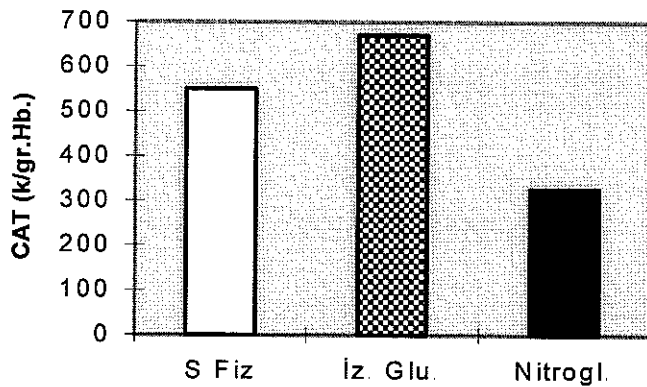
Tüm inkübasyon sonuçları birbirleriyle karşılaştırıldığında; Cu/Zn-SOD, G-6PD, GST enzim aktivitelerinde ve GSH düzeylerinde anlamlı bir farklılık bulunmadı. (Tablo IX)

Tablo VII: Eritrosit üzerine Serum fizyolojik, İzotonik glukoz ve Nitrogliserin eklenmesiyle yapılan inkübasyonun 3. saatindeki CAT değerlerinin karşılaştırılması

| | Serum Fizyolojik | İzotonik Glukoz | Nitrogliserin |
|---------------------|------------------|----------------------------|--------------------------------|
| n | 30 | 30 | 30 |
| CAT (k/g.Hb) | 550.03 ± 62.3 | 670.63 ± 67.4 ^a | 326.66 ± 60.50 ^{a, b} |

^a: Serum Fizyolojik ile karşılaştırıldığında, $p<0.001$

^b: İzotonik glukoz ile karşılaştırıldığında, $p<0.001$



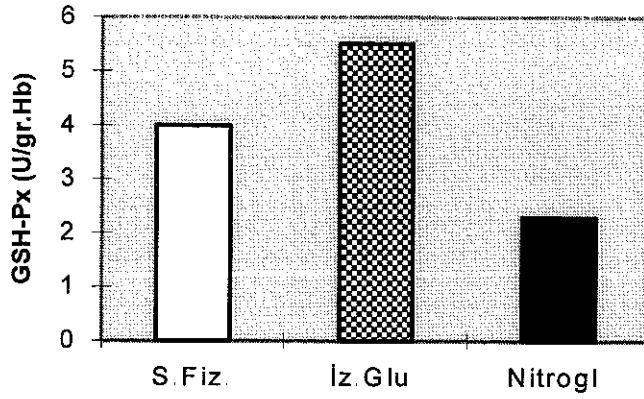
Şekil 7: Eritrosit üzerine Serum fizyolojik (S.Fiz), İzotonik glukoz (İz.Glu) ve Nitrogliserin (Nitrogl.) eklenmesiyle yapılan inkübasyonun 3. saatindeki CAT değerleri

Tablo VIII: Eritrosit üzerine Serum fizyolojik, İzotonik glukoz ve Nitrogliserin eklenmesiyle yapılan inkübasyonun 3. saatindeki GSH-Px değerlerinin karşılaştırılması

| | Serum Fizyolojik | İzotonik Glukoz | Nitrogliserin |
|------------------------|------------------|--------------------------|-----------------------------|
| n | 30 | 30 | 30 |
| GSH-Px (U/g.Hb) | 4.00 ± 0.48 | 5.51 ± 0.54 ^a | 2.29 ± 0.50 ^{a, b} |

^a: Serum Fizyolojik ile karşılaştırıldığında, p<0.001

^b: İzotonik glukoz ile karşılaştırıldığında, p<0.001.



Şekil 8: Eritrosit üzerine Serum fizyolojik (S.Fiz), İzotonik glukoz (İz Glu) ve Nitrogliserin (Nitrogl) eklenmesiyle yapılan inkübasyonun 3. saatindeki GSH-Px değerleri

Tablo IX: Eritrosit üzerine serum fizyolojik, izotonik glukoz ve Nitrogliserin eklenmesiyle yapılan inkübasyonun 3. Saatindeki Cu/Zn-SOD, G-6PD, GSH ve GST değerleri.

| | Serum Fizyolojik | İzotonik Glukoz | Nitrogliserin |
|-------------------|------------------|-----------------|---------------|
| Deney sayısı | 30 | 30 | 30 |
| Cu/ZnSOD (U/grHb) | 49.86 ± 11.70 | 48.31 ± 12.55 | 53.43 ± 11.80 |
| G-6PD (U/gr Hb) | 5.98 ± 1.87 | 6.70 ± 1.72 | 6.84 ± 1.79 |
| GSH (mg/g Hb) | 24.98 ± 5.91 | 24.98 ± 5.91 | 24.92 ± 4.91 |
| GST (Δ OD) | 16.01 ± 4.02 | 16.83 ± 3.76 | 17.20 ± 3.63 |

D.1.3) İNKÜBASYONLAR SIRASINDA GSH'İN ZAMANA GÖRE DEĞİŞİMİ

İnkübasyonun 0, 3, 6, 9, 12. ve 15. Dakikalarında yapılan GSH ölçümlerinde; Serum fizyolojik, İzotonik glukoz ve Nitrogliserin inkübasyonlarında GSH'nin zamana bağlı, anlamlı olarak azaldığı saptandı ($p < 0.001$)

Aynı dakikalardaki 3 inkübasyon grubu arasında GSH değerleri karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunmadı (Tablo X ,Şekil 9)

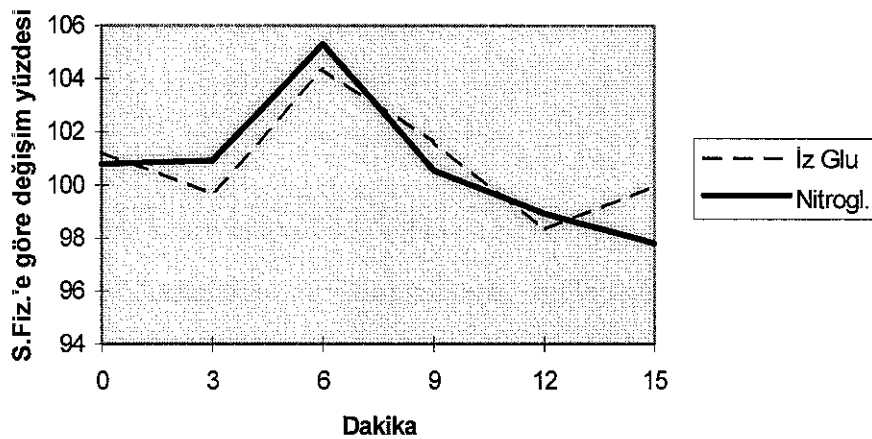
Tablo X: Eritrosit üzerine serum fizyolojik, izotonik glukoz ve Nitrogliserin eklenmesiyle yapılan inkübasyon sırasında GSH konsantrasyonlarının zamana göre değişimi

| Dakika | GSH (mg/g.Hb) | | | | | |
|---------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 15 |
| S.Fizyolojik | 24.40±4.64 | 24.08±4.21 | 23.04±4.50 | 22.94±4.40 | 23.42±4.21 | 23.34±4.15 ^a |
| İz.Glukoz | 24.70±4.32 ^b | 24.00±4.98 ^b | 24.04±4.82 ^b | 23.31±4.17 ^b | 23.03±3.27 ^b | 23.33±4.25 ^{a,b} |
| Nitrogliserin | 24.60±4.14 ^{b,c} | 24.30±4.54 ^{b,c} | 24.26±4.25 ^{b,c} | 23.07±4.47 ^{b,c} | 23.17±4.20 ^{b,c} | 22.83±3.50 ^{b,c} |
| Deney sayısı | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |

^a: Zamana bağlı anlamlı olarak azaldı, $p < 0.001$

^b: Serum fizyolojik ile karşılaştırıldığında,

^c: İzotonik glukoz ile karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik yok



Şekil 9: İzotonik glukoz ve Nitrogliserin ile yapılan inkübasyonlarda GSH düzeylerinin zamana göre Serum fizyolojik ile karşılaştırmalı değişim yüzdesi

D.2) HEMOLİZAT ÜZERİNE EKLENEN NİTROGLİSERİNİN ÖLÇÜLEN PARAMETRELER ÜZERİNE DİREKT ETKİSİ

Tüm deneylerde Nitrogliserin eklenmesiyle elde edilen CAT, GSH-Px, Cu/Zn-SOD, G-6PD ve GST enzim aktiviteleri ve GSH düzeyleri ile hem İzotonik glukoz hem de Serum fizyolojik eklenmesiyle elde edilen değerler arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı.

Aynı deneylerde, serum fizyolojik ve izotonik glukoz eklenmesiyle elde edilen değerler arasında da anlamlı bir farklılık bulunmadı.(Tablo XI)

Tablo XI:Hemolizat üzerine Serum fizyolojik, İzotonik glukoz ve Nitrogliserin eklenmesiyle elde edilen eritrosit CAT, GSH-Px, Cu/Zn-SOD, G-6PD, GSH ve GST değerleri

| | Serum Fizyolojik | İzotonik glukoz | Nitrogliserin |
|-------------------|------------------|-----------------|---------------|
| Deney sayısı | 30 | 30 | 30 |
| CAT (k/g.Hb) | 491.13±137.20 | 501.56±141.26 | 515.80±112.92 |
| GSH-Px (U/g.Hb) | 3.31±1.21 | 3.29±1.13 | 3.26±1.31 |
| Cu/Zn-SOD (U/gHb) | 49.46±13.22 | 48.83±11.19 | 49.03±12.19 |
| G-6PD (U/g.Hb) | 7.92±1.63 | 7.30±1.61 | 8.27±1.81 |
| GSH (mg/g.Hb) | 23.53±5.69 | 23.60±5.32 | 23.80±5.29 |
| GST (Δ OD) | 16.76±3.30 | 16.86±3.22 | 16.73±3.07 |

D.3) HASTA GRUBU ÇALIŞMASI

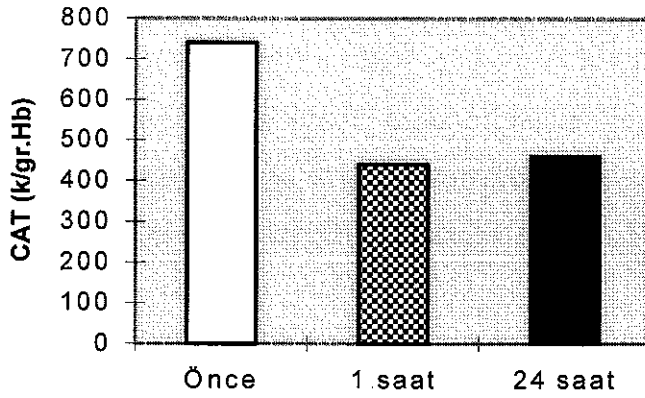
Tüm hastalarda IV Nitrogliserin infüzyonunun 1. saatindeki CAT ve GSH-Px aktiviteleri infüzyon öncesi değerlerle karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalmış bulundu ($p<0.001$). Bu iki enzimin infüzyonun 24. saatindeki değerleri ile infüzyon öncesi değerleri karşılaştırıldığında; her iki enzimin 24.saatte de anlamlı olarak azaldığı saptandı ($p<0.001$) Infüzyonun 1. saati ve 24. saati arasındaki değerlerde anlamlı bir farklılık bulunmadı. (Tablo XII ve XIII, Şekil 10 ve 11)

Tablo XII: Nitrogliserin uygulanan hastalarda eritrosit CAT aktivite değerleri

| | Uygulama Öncesi | 1. saat | 24. saat |
|--------------|-----------------|----------------------------|------------------------------|
| Hasta sayısı | 22 | 22 | 13 |
| CAT (k/g.Hb) | 739.59±92.29 | 440.13±111.92 ^a | 459.84±130.73 ^{a,b} |

^a: Uygulama öncesi değer ile karşılaştırıldığında, p<0.001

^b: 1 saatlik değer ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulunamadı



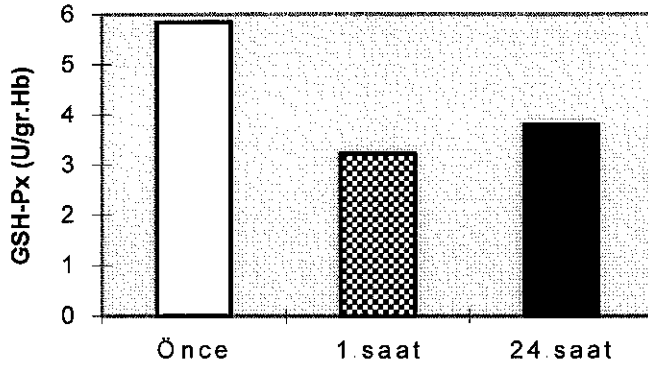
Şekil 10: Nitrogliserin uygulamasının hasta eritrosit CAT aktivitesi üzerine olan etkisi

Tablo XIII: Nitrogliserin uygulanan hastalarda eritrosit GSH-Px aktivite değerleri

| | Uygulama Öncesi | 1. saat | 24. saat |
|----------------|-----------------|------------------------|--------------------------|
| Hasta sayısı | 22 | 22 | 13 |
| GSH-Px(U/g.Hb) | 5.84±1.83 | 3.22±1.70 ^a | 3.80±1.13 ^{a,b} |

^a: Uygulama öncesi değer ile karşılaştırıldığında, p<0.001

^b: 1 saatlik değer ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulunamadı



Şekil 11: Nitrogliserin uygulamasının hasta eritrosit GSH-Px aktivitesi üzerine olan etkisi

Cu/Zn-SOD, G-6PD ve GST enzim aktiviteleri ve GSH düzeylerinde infüzyonun hem 1 saatinde hem de 24. saatinde; infüzyon öncesi değerler ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Yine aynı parametrelerin infüzyonun 1. ve 24. Saatindeki değerleri arasında da anlamlı bir farklılık saptanmadı (Tablo XIV)

TabloXIV: Nitrogliserin uygulanan hastaların eritrosit Cu/Zn-SOD, G-6PD, GSH ve GST değerleri

| | İnfüzyon öncesi | 1. saat | 24. saat |
|--------------------|-----------------|-------------|-------------|
| Hasta sayısı | 22 | 22 | 13 |
| Cu/Zn-SOD (U/g.Hb) | 80.00±11.14 | 81.13±16.22 | 82.42±14.76 |
| G-6PD (U/g. Hb) | 7.67±1.39 | 7.70±1.35 | 7.70±1.10 |
| GSH (mg/g.Hb) | 23.36±5.37 | 24.09±5.46 | 23.92±5.04 |
| GST (Δ OD) | 24.27±5.47 | 24.04±4.58 | 24.53±5.56 |

E) TARTIŞMA

Organik nitratlar yapılarındaki NO'yu bırakabilmek için değişik mekanizmalar kullanırlar Endotel hücrelerinde tiyollü bileşiklerle etkileşerek stabil olmayan nitrozotiyol bileşikleri oluşturup, bu bileşikler üzerinden ortama NO verirler. Bu reaksiyonda görev alan tiyollü yapılar; sistein, N-asetil sistein ve glutatyon gibi bileşiklerdir (1). Liposolubl yapıları sayesinde hücre membranlarından, doğal olarak eritrosit membranından da kolaylıkla geçen organik nitratlar; eritrosit içinde de farklı mekanizmaları kullanarak yapılarındaki NO'ı ortama bırakırlar (32). Bu konuda başta hemoglobın olmak üzere, yapılarında "hem" grubu taşıyan proteinlerle olan etkileşimleri oldukça önemlidir. Hemoproteinlerin yapısında bulunan Fe, organik nitratların NO'ı bırakabilmek için gereksinim duyduğu oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarına çok uygun bir ortam yaratır. Bu durum organik nitratların hemoproteinlere karşı olan aşırı ilgisinin de bir açıklayıcısıdır (32,33).

Eritrositlerde Nitrogliserin ile yaptığımız inkübasyon deneylerinin sonucunda GSH-Px ve CAT aktivitesinin , inkübasyonun 1. saatinde anlamlı olarak azaldığını ve bu düşük aktivitenin inkübasyonun 3. saatine kadar devam ettiğini tespit ettik (Tablo IV, V, VII ve VIII, Şekil 5, 6, 7 ve 8). Bu iki ezimdeki belirgin aktivite azalmasının, organik nitratlardan eritrositte değişik mekanizmalarla ortama bırakılan NO ile ilişkili olabileceği görüşündeyiz. Çünkü aynı numunelerin hemolizatları üzerine hemen ölçüm öncesi aynı konsantrasyonlarda Nitrogliserin ekleyerek gerçekleştirdiğimiz enzim aktivite ölçümlerinde hiçbir değişiklik saptamadık. Bu deney bize Nitrogliserinin hiçbir parametre üzerinde gerek enzim gerekse

substrat düzeyinde inhibitör bir etki oluşturmadığı sonucunu gösterdi (Tablo XI). Yani CAT ve Guanilat siklaz arasında NO bağlama konusunda bir kompetisyon olduğu yorumu yapılabilir. Kruszyna ve arkadaşlarının bu konuda daha önce yaptıkları çalışmalar bizim bu görüşlerimizi destekler tarzdadır (34). Organik nitratlardan Hb ile etkileşim yoluyla salınan NO yine Hb tarafından yakalanmaktadır. Bu olay NO'nun Hb'nin değişik hibrid ürünlerinin "hem" II subünitleri üzerinden bağlanması yoluyla gerçekleşmektedir. Oluşan bu nitrozile ürünler hava ortamında İEF yoluyla ayırım yapmak için yeterli stabiliteye sahiptir. Ve bu durumda bile karakteristik EPR sinyallerini üretmektedirler. Bu araştırmacılar deney hayvanlarına Nitrogliserini infüzyon yolu ile uygulayarak; uygulamadan önce, uygulamanın 1. ve 8. saatinde ve uygulamanın bitiminden sonraki 4. saatte kan örnekleri alarak HbNO'yu saptamaya çalışmışlardır. Çalışmanın sonunda HbNO'nun en yüksek konsantrasyonlarını uygulamanın 1. saatinde elde ettiklerini bildirmişlerdir. Yani Nitrogliserinden eritrosit içinde maximum NO salınımı uygulamanın 1. saatinde olmaktadır (34). Bizim deneylerimizde de GSH-Px ve CAT aktivitelerinde meydana gelen inhibisyonun, uygulamanın 1. saatinde olması dikkat çekicidir. Kruszyna ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaların sonuçları ve bizim bulgularımız beraber değerlendirildiğinde ; Nitrogliserin uygulaması sonucunda saptanan eritrosit GSH-Px ve CAT enzimlerindeki aktivite kaybının, Nitrogliserinden eritrosit içinde meydana gelen NO salınımıyla ilişkili olduğu şeklinde bir yorum yapılabilir.

GSH-Px ve CAT enzimlerindeki Nitrogliserin uygulamasına bağlı olarak görülen aktivite kaybı, Nitrogliserinin yapısındaki NO'yu bırakmak için eritrosit içinde kullandığı mekanizmalarla ilişkili olabilir. Gerçekten de Kruszyna ve arkadaşlarının çalışmalarına göre; özellikle CAT hemoprotein yapısı nedeniyle bu mekanizmalarda yer almaktadır. Bu konuyla ilgili olarak daha önce yapılan çalışmalar; Azid, Hidroksilamin ve Hidralazin gibi ilaçlardan NO salınabilmesi için bu ajanların 3 elektron tarafından oksidasyona ihtiyaç duyduğunu göstermiştir. Nitrit ise daha farklı olarak 1 elektronla redükte olarak yapısındaki NO'yu bırakmaktadır. Benzer mekanizmalar eğer dekompanzasyon basamakları nitrit iyonu salınmasıyla sonuçlanırsa; Nitrogliserin için de geçerlidir. (32)

Hemoglobin redoks reaksiyonlarına katılan önemli bir moleküldür ve eritrosit içinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Hemoglobin ile olan direkt kimyasal reaksiyonlar; Sodyum Nitroprussid, Nitrit, Nitrogliserin, Hidralazin gibi NO yoluyla etkisini gösteren ilaçlar için tanımlanmıştır. Bu ajanların hepsi bu yolu kullanarak hemoglobini methemoglobine dönüştürür ve böylelikle hemoglobin fonksiyonlarında bozulmaya neden olur. Hemoglobinin methemoglobine oksidasyonunda Hidroksilamin ve Hidralazin 1 elektronla redükte olmak

yerine, 3 elektronla okside olarak NO üretir. Hidroksilamin Azid'le beraber CAT üzerinden de yapısındaki NO'yu bırakabilir. Hem Hidroksilamin hem de Azid CAT için alternatif bir substrat veya inhibitördür. Eritrosit içinde CAT yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. CAT'ın yer aldığı ve bu ajanlar tarafından rat karaciğerinde gösterilmiş olan guanilat siklaz aktivasyonu olayı eritrosit içinde de meydana gelmektedir. Bu olay NO salınımının bir göstergesi olarak kabul edilebilir (32, 33). CAT'ın hemoprotein yapısı bu ajanlar için gerekli olan 3 elektron oksidasyonuna uygundur. Nitrogliserin de aynı bu ajanlarda olduğu gibi yapısındaki NO'yu ortama bırakabilmek için CAT enzimi ile etkileşime girebilir. Nitrogliserinin hemoglobin ile olan etkileşimi, nasıl methemoglobinemi gibi hemoglobin fonksiyonlarında bozulmaya yol açıyorsa; CAT ile olan etkileşimi sonucunda da bu enzimin aktivitesinde bir azalmaya yol açabilir. Biz, çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz Nitrogliserin uygulaması ile oluşan CAT aktivitesindeki inhibisyonun bu yolla olabileceği görüşündeyiz. Bu düşüncemiz nitritlerin CAT inhibitörleri arasında yer alması konusunda açıklayıcı olabilir (58). Ortama salınan NO, aynı hemoglobinde olduğu gibi, CAT tarafından yakalanarak ortamdan uzaklaştırılabilir. Bu düşüncemizi hemoproteinlerin guanilat siklaz inhibitörleri olmalarına dair bulgular desteklemektedir (34). Ayrıca invitro test sistemlerinde; ortama eklenen hemoproteinlerin bazı organik nitratların etkisini inhibe ettiği saptanmıştır. Hemoproteinler hücre dışında tutuldukları sürece, ekstrasellüler etkili olan NO vazodilatörlerin etkilerinin ortadan kalktığı gösterilmiştir (32).

Bir başka taraftan, Nitrogliserin NO salabilmek için endotel hücrelerinde olduğu gibi, eritrosit ortamında da sülfidril grubu taşıyan moleküllerle de etkileşebilir. CAT ve GSH-Px enzimlerinde saptamış olduğumuz bu inhibisyon, bu enzimlerin yapılarındaki sülfidril grupları ile Nitrogliserin etkileşimi sonucu da meydana gelebilir. Sülfidril grubu taşıyan moleküller içinde glutatyon oldukça önemli bir yer tutar. Glutatyon eritrositte oldukça yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Nitrogliserin ile etkileşim bakımından diğer sülfidrilli yapılar için bir ipucu teşkil edebilir. Biz bu etkileşimin olup olmadığını belirleyebilmek için yaptığımız deneylerin sonucunda; eritrositlerin Nitrogliserin ile yapılan inkübasyonlarında kısa süreli GSH ölçümlerinde zamana bağlı, anlamlı bir değişiklik saptayamadık. Ama kısa süreli GSH' ta konsantrasyon değişiklikleri olduğunu gözlemledik (Tablo X, Şekil 9). Bu bulgulardan yola çıkarak; Nitrogliserinin glutatyondan ziyade hemoproteinler üzerinden NO salıverdiği düşüncesine ulaştık. Zaten okside glutatyonun redükte glutatyona dönüşümünü sağlayan glutatyon redüktaz için gerekli olan NADPH üreticisi G-6PD ve glutatyonu substrat olarak kullanan GST enzim aktivitelerinde de deneylerimiz sonucunda bir değişiklik

saptamamıştık (Tablo IV, IX ve XIV). Bu bulgular Nitrogliserinin eritrosit içinde glutatyon yolunu kullanmadığını veya kullansa bile bu yolun NO salınımı için temel oluşturmadığını gösterdi.

Nitrogliserin ile yaptığımız inkübasyon deneylerinin sonucunda saptamış olduğumuz CAT ve GSH-Px inhibisyonu; Nitrogliserinden NO salınması sırasında değil de, salınan NO'nun daha sonra eritrosit içinde girdiği başka reaksiyonlar sonucu da meydana gelebilir. Çünkü NO anstabil dir ve hızlı bir şekilde farklı ürünlere dönüşür "Reaktif Nitrojen Ürünleri" olarak bilinen bu maddeler hücre içinde ve eritrositte değişik reaksiyonları başlatabilirler (36) Bu reaksiyonları şu şekilde özetleyebiliriz:

1) NO oksitlenerek nitrit ve nitrate dönüşür. Oluşan bu ara ürünler hidrojen peroksitle birleşerek peroksinitriti oluşturur. Zang ve arkadaşlarının bu konuda yaptıkları çalışmalar, hidrojen peroksidin süperoksid anyonuna dönüşümü için bir ara ürün olarak peroksinitrit yolunun kullanıldığını göstermiştir (82).

2) NO'nun kendisi de süperoksid anyonuyla direkt reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturabilir (83)

NO yoluyla oluşan hem peroksinitrit hem de NO₂ güçlü oksidan maddelerdir Bu nedenle proteinlerdeki değişik amino asitlerle reaksiyonlara girebilirler NO₂ tiyol radikallerine dönüşerek sistein, triptofan ve tirozin rezidülerini okside eder. Peroksinitrit tarafından sistein rezidülerinin oksidasyonu daha komplekstir. Bu reaksiyon 1 veya 2 oksidasyon basamağı içerir. Peroksinitrit tiyol grupları ile reaksiyona girerek tiyol radikallerini oluşturur. Bu temelde küçük bir yoldur. Yapılan çalışmalar peroksinitritin tiyollerle nitrozotiyollere (RSNO) dönüşmek için reaksiyona girdiğini göstermiştir. Ama bu yolla RSNO gelişimi düşüktür (%1'den az). Peroksinitrit metionin ile de hızlı bir şekilde reaksiyona girebilir (36, 83, 86).

Bu konuda yapılan çalışmaların sonuçları oldukça dikkat çekicidir. 1mM peroksinitrit 10mg/mL'lik albümin solüsyonu üzerine eklendiği zaman, albüminin -SH'inin tamamen tükendiği, triptofan floresansının %20 oranında azaldığı, tirozin rezidülerinin %10 oranında okside olduğu ve -NH₂ gruplarının %5-10 oranında azaldığı gözlenmiştir. Oksidatif protein hasarının başka bir göstergesi olan, protein karbonillerinin artmış düzeyleri elde edilmiştir (36).

NO tarafından oluşturulan reaktif nitrojen ürünlerinin, özellikle de peroksinitritin neden olduğu değişik aminoasit modifikasyonları, yer aldıkları proteinlerin yapısını ve fonksiyonunu bozan bir neden olarak görülmektedir (36). Biz bu çalışma ile saptamış

olduğumuz Nitrogliserin tarafından meydana gelen GSH-Px inhibisyonunun bu mekanizmalar sonucu da meydana gelebildiğini düşünmekteyiz.

Bizim bu düşüncemiz Prince ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaların sonuçlarıyla da desteklenebilir. Bu araştırmacılar peroksidaz, prostaglandin H sentaz ve ribonükleotid redüktaz gibi enzimlerin peroksinitrit tarafından inhibe olduğunu öne sürmüşlerdir. Çünkü bu enzimlerin yapılarında bol miktarda tirozin rezidüsü bulunur. Enzim aktive olduğu zaman bu tirozin rezidüleri tyrosyl radikallerine dönüşür. Aktif merkezlerinde taşıdıkları bu tirozin rezidüleri reaktif nitrojen ürünleri tarafından nitrozile olduğu zaman bu enzimlerin aktivitesinde azalma olmaktadır. Prince ve arkadaşları bu yolla NO tarafından ribonükleotid redüktaz enziminin inaktive olduğunu göstermişlerdir. Oluşan bu inaktivasyon peroksinitrit yoluyla olabileceği gibi, direkt olarak NO'nun fonksiyonel tyrosyl radikali ile etkileşimi sonucu da olabilmektedir. Bu reaksiyon anstabil intermedier nitrotirozin ürünleri yolu ile tirozin rejenerasyonuna yol açar. Sonuç olarak NO'nun protein radikalleri ile olan reaksiyonu enzim fonksiyonlarında en önemli düzenleyici mekanizma olarak görülmektedir (36).

Bu görüşü güçlendiren diğer çalışmalar ise Asahi ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmalardır (84). Bu araştırmacılar nitrik oksit donörleri tarafından glutasyon peroksidazın inaktive olduğunu gösterdiler. Enzimdeki modifiye olmuş bölge kütle spektrometri yoluyla belirlendi. Bu teknikle iki peptid zinciri arasında bir köprü identifiye edildi. Bir peptidin katalitik merkezinde selenosistein 45 ve sistein 74 içerdiği diğer peptidin sistein 91 içerdiği saptanmıştır. Burada iki olası kombinasyon vardır. Selenosistein 45 ve sistein 91 veya sistein 74 ve sistein 91. GSH-Px'in yapısında, Selenosistein 45 ve sistein 91 arasında bir çapraz bağ olması daha uygundur. Peroksinitrit yoluyla katalitik merkezde selenosistein 45'in bir serbest tiyol ile bir selenyl sülfite okside (Se-S) olduğu düşünülerek GSH-Px'in bu yolla inhibe olduğu öne sürülmüştür. Bu çalışmaların sonucunda NO ve onun ürünlerinin spesifik bir şekilde selenyl sülfid üretimi yoluyla GSH-Px'i direkt olarak inaktive ettiği ve bu durumun da hücrel hasara yol açan intrasellüler peroksitte bir artışla sonuçlandığı bildirilmiştir (84, 85).

Diğer taraftan nitrit ile hidrojen peroksit arasındaki reaksiyon, peroksinitrit oluşumu ile sonuçlanırken süperoksid anyonu oluşumuna da yol açar (82). NO'nun oksidlenerek oluşturduğu NO₂'lerin son ürünü süperoksit anyonu ise, Nitrogliserin bir yerde O₂ prokürsörüdür denilebilir. Ortamda artmış olan süperoksid anyonu, SOD aktivitesinde bir artışa yol açabilir. Bizim bulgularımız da bu düşüncüyü destekler tarzdadır. Çünkü Nitrogliserin ile yapılan eritrosit inkübasyonlarında 1. saat ve 3. saatteki SOD aktiviteleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmasa da; 3 saatteki SOD

aktivitesinde 1 saate göre %13'lük bir artış saptadık (Tablo IV, IX) SOD aktivitesinde görülen bu artış mekanizmaların temelini peroksinitrit oluşumunun oluşturduğu görüşünü kuvvetlendirmektedir.

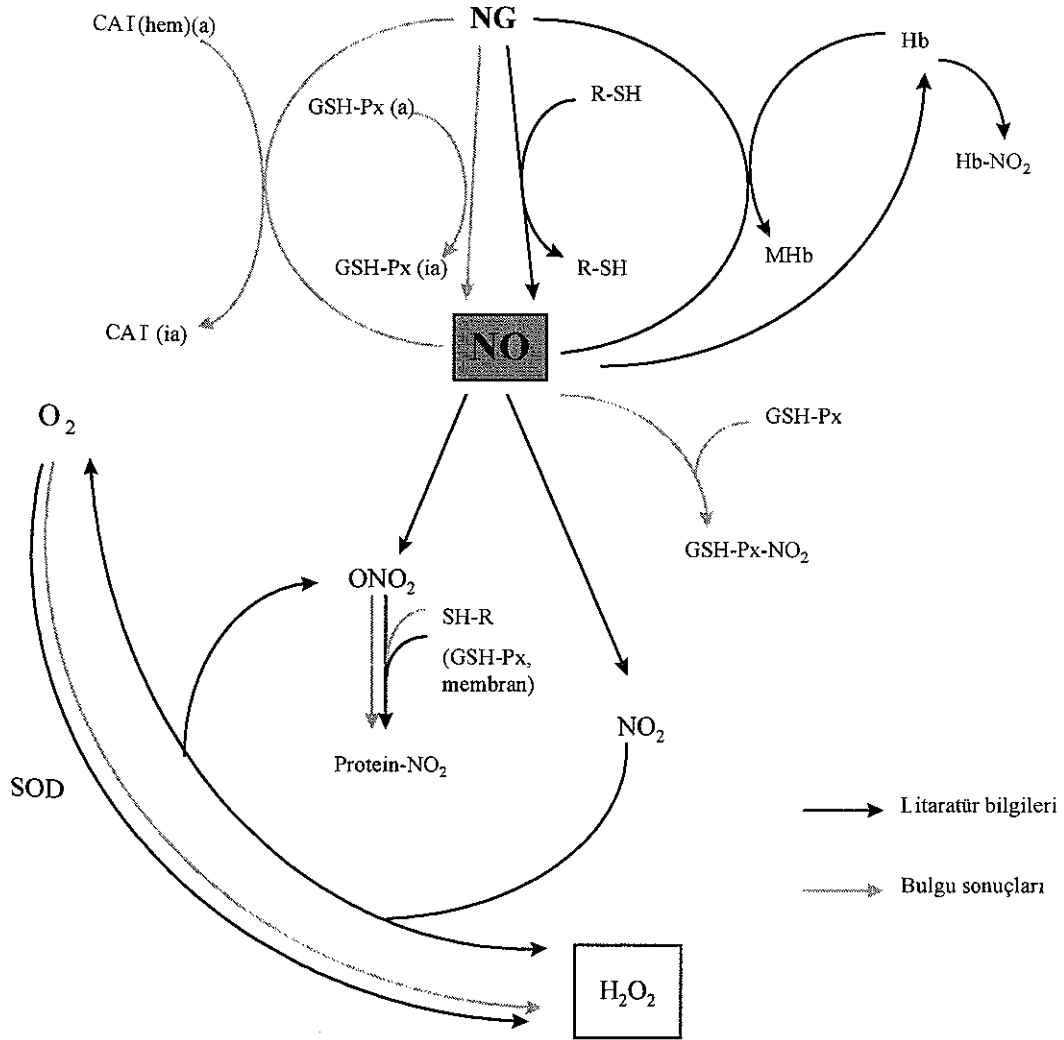
Gerçekten de bizim deneylerimizin sonuçları incelendiğinde, Nitrogliserin inkübasyonunun eritrosit GSH-Px aktivitesinde CAT aktivitesine göre daha fazla inhibisyona yol açtığı görülmektedir. (GSH-Px'te %60 oranında, CAT'da %50 oranında inhibisyon gözlemlendi.) Bu durum GSH-Px'in Nitrogliserin tarafından iki yolla inhibe olduğunu göstermektedir. 1. Yol Nitrogliserinden NO salınırken enzimin sülfidril gruplarını kullanması, 2.yol ise salınan NO yoluyla oluşan reaktif nitrojen ürünlerinin enzimde aminoasit modifikasyonuna yol açarak enzimi inhibe etmesidir. CAT'daki inhibisyon ise büyük oranda Nitrogliserin ile yapısındaki "hem" gruplarının etkileşimi sonucudur.

İnkübasyon deneyleri yolu ile invitro koşullarda elde ettiğimiz bu sonuçların, Nitrogliserinin klinik uygulaması sırasında hasta eritrositlerinde de olabileceği büyük bir olasılıktır. İnvivo hasta çalışmasının sonuçları invitro deney sonuçlarına oldukça benzerdir. Angina pectoris tanısıyla Nitrogliserin uygulanan hastaların, uygulama öncesiyle karşılaştırıldığında 1.saatte eritrosit GSH-Px ve CAT enzim aktivitelerinin anlamlı olarak inhibe olduğunu ($p<0.001$), diğer parametrelerin ise etkilenmediğini saptadık. Bu durumun Nitrogliserin infüzyonunun 24 saatine kadar devam ettiğini gözledik ($p<0.001$) Hastalarda saptamış olduğumuz GSH-Px ve CAT inhibisyon oranları (GSH-Px için %45 ve CAT için %40) invitro inkübasyon deneylerinden elde ettiğimiz oranlara göre daha düşüktür. İnvivo koşulları düşünecek olursak bu sonuçlar sürpriz değildir. Çünkü invivo ortamda tüm kompanzatuvar mekanizmalar devrededir. Bundan dolayı, Nitrogliserinden kaynaklanan oksidan etkiye karşı hücre savunmasının invitro koşullara göre daha baskın olması nedeniyle enzimlerdeki inhibisyonun daha az olması doğal bir durumdur.

Methemoglobinemi gibi çok önemli bir yan etkiye sahip olan Nitrogliserinin, eritrositlerde oksidan hasara karşı savunmada çok önemli görevleri olan GSH-Px ve CAT enzimleri üzerinde de inhibitör etkiye sahip olması oldukça önemlidir. NO yoluyla oluşan peroksinitritin eritrosit membranı üzerindeki oksidan hasarı zaten bilinmektedir (87, 88). Bu durum üzerine, Nitrogliserinin neden olduğu GSH-Px ve CAT inhibisyonunun eklenmesi eritrositlerin maruz kalacağı hasarı daha da arttıracaktır. Hemolizle sonuçlanabilecek olan bu durum normal şartlarda çok önemli klinik sonuçlar doğurmayabilir. Ama olaya başka provakatör faktörlerin eklenmesi ile ortaya çıkabilecek ileri derecede bir hemoliz riski için zemin hazırlayabileceğinden, bu konudaki önemi artacaktır. Bu durumda bizim önerimiz,

Nitrogliserin infüzyonu uygulanan veya sürekli Nitrogliserin preparatı alan hastaların çok sık aralıklarla kan prametrelerinin izlenmesi ve bu hastalarda gizli bir hemoliz riskinin olabileceği sürekli olarak akılda tutularak hastaya yaklaşılmıştır.

Bu konuda yapılabilecek ileri çalışmaların amacı; Nitrogliserinin eritrositler üzerine olan bu negatif etkisinin ortadan kaldırılması veya hafifletilmesi konusuna yönelik olmalıdır. Nitrogliserin infüzyonunun yanı sıra hastalara antioksidan bir madde ve/veya NO salınmasında etkili olan endojen SH grupları veya "hem" içeren moleküller yerine aynı işlevi gören egzojen bir maddenin verilmesinin, belkide GSH-Px ve CAT inhibisyonunu hafifletebileceği düşüncesindeyiz.



(a): Aktif enzim, (ia): İnaktif enzim, NG: Nitrogliserin

NİTROGLİSERİN VE NO'NUN HÜCRE İÇİ ETKİLEŞİM YOLLARI

F) ÖZET

Vazodilatör etkisi nedeniyle klinikte çok yaygın olarak kullanılan Nitrogliserin, esas etkilerini damar endoteli üzerinden göstermektedir. Endotel hücrelerinde yapısındaki NO'yu tiyollü bileşikler ile etkileşime girerek bırakır. Ortama salınan NO guanilat siklaz enzimi aktivasyonu yoluyla vazodilatasyon etkisini gerçekleştirmektedir. Nitrogliserin, infüzyon şeklinde uygulanması sırasında eritrosit membranından da diffüze olur. Eritrositte de diğer hücrelerde olduğu gibi yapısındaki NO'yu bırakır. Eritrosit ortamında bunun için değişik mekanizmalar kullanır. Hemoglobin ile bağlanarak, hem yapısındaki NO'yu bırakır hem de hemoglobini değişik valans hibridlerine dönüştürerek methemoglobinemiye yol açar. Yapısında Fe bulunduran hemoglobin ve bazı enzimler, eritrosit içinde NO yakalayıcısı gibi davranmaktadır. NO Fe ile reaksiyona girmesinin yanında bir serbest radikal olduğundan dolayı bu tip mekanizmaları da başlatabilir. Reaktif nitrojen ürünleri olarak tanımlanan ve NO'dan kaynaklanan ürünler bu mekanizmalarda oldukça etkindir. Reaktif nitrojen ürünleri eritrosit membranında oksidatif hasarı başlatabildikleri gibi bazı aminoasitler ile etkileşerek enzimler gibi bazı proteinlerde modifikasyona yol açabilir. Bu nedenle eritrosit uygun bir ortamdır. Nitrogliserin ile yapılan invitro ve invivo deneylerin sonucunda, inkübasyon ve infüzyon öncesi ve sonrası değerler karşılaştırıldığında CAT ve GSH-Px aktivitelerinde anlamlı bir düşüş gözlemlendi ($p < 0.01$). SOD aktivitesinde anlamlı bir değişiklik olmasa bile belirgin bir inhibisyon saptandı. G6PD, GST aktiviteleri ile GSH düzeylerinde herhangi bir değişiklik bulunamadı. Nitrogliserinin yukarıdaki parametreler üzerine direkt etkisinin olmadığı yapılan deneylerle belirlendi. Çünkü enzim aktivite ölçümlerinin ve GSH ölçümlerinin hemen öncesinde deney ortamına tedavi dozlarına uygun olacak şekilde eklenen Nitrogliserinin ölçülen parametreler üzerinde bir etkisi olmadığı saptandı. Bu sonuçlara göre eritrosit içindeki NO salınma mekanizmalarının ve/veya NO'nun direkt etkisiyle antioksidan sistemin etkilendiği sonucuna varıldı.

H) SUMMARY

Nitroglycerine, a drug used widely in therapy because of its vasodilator effect, shows its actual effect on vessel endothelium. It releases the NO in its structure by reacting with the thiol compounds present in the endothelial cells. NO, released into the environment, shows its vasodilator effect via activation of the enzyme guanylate cyclase. Nitroglycerine can also diffuse through the erythrocyte membrane while it is applied by infusion. It releases the NO in the erythrocytes, too, just as it does in the other cells. Erythrocytes have various mechanisms for this process. By binding to the hemoglobin, nitroglycerine both releases its NO and also it converts hemoglobin to methemoglobin. Hemoglobin and some enzymes which comprise Fe in its structure, behave as NO scavengers in the erythrocytes. Besides reacting with Fe, NO can initiate such mechanisms since it is a member of the free radical family. The products of NO which are called reactive nitrogen products are highly effective in these processes. Reactive nitrogen products can both initiate the oxidative damage in the erythrocyte membrane and also can cause modifications in some proteins- like enzymes- via reacting with some amino acids; thus erythrocyte is a good medium. In the in vivo and in vitro experiments, CAI and GSH-Px enzyme activities were significantly decreased after the incubation with or infusion of nitroglycerine ($p < 0.01$). There was an important inhibition in the SOD activity though not statistically significant. NO difference was observed in the GSH level and in G-6PD and GST activities. It was determined that nitroglycerine had no direct effect on the parameters above. It was determined that nitroglycerine, which was added at the therapeutic level medium just before the measurements of the enzyme activities, had no direct effect on the above parameters. Depending on our results, it was concluded that the antioxidant system is affected by NO directly or by the NO-releasing-mechanisms in the erythrocyte.

KAYNAKLAR

- 1) Robertson, R. M., and Robertson, D.: Drugs used for the treatment of myocardial ischemia. In Hardman, J. G., et al: Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th ed New York, McGraw-Hill, pp 759-780, 1996
- 2) Murad, F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J Clin. Invest.* 78:1, 1986
- 3) Anderson, T. J., Meredith, I. T., Ganz, P., et al Nitric oxide and nitrovasodilators: Similarities, differences and potential interactions. *J. Am. Coll. Cardiol.* 24: 555, 1994
- 4) Horowitz, J. D., Antman, E. M., Lorell, B. H., et al Potentiation of the cardiovascular effects of nitroglycerin by N-acetyl-cysteine. *Circulation*, 68: 1247, 1983
- 5) Winnitord, M. D., Kennedy, P. L., Wells, P. J., and Hillis, L. D. Potentiation of nitroglycerin-induced coronary dilatation by N-acetyl-cysteine *Circulation*, 73:138, 1986.
- 6) De Coster, P. M., Chierchia, S., Davies, G. J., Hackett, D., Fragasso, G., Maser, A. Combined effects of nitrates on the coronary and peripheral circulation in exercise-induced ischemia. *Circulation*, 81: 1881-6, 1990
- 7) Jugdutt, B. I., Warnica, J. W. Intravenous nitroglycerin therapy to limit myocardial infarct size, expansion, and complications. Effect of timing, dosage, and infarct location. *Circulation*, 78: 906-919, 1988.
- 8) Brown, B. G., Bolson, E., Petersen, R., B., et al The mechanisms of nitroglycerin action; Stenosis vasodilatation as a major component of the drug response. *Circulation*, 64: 1089, 1981.
- 9) Parker, J. O. Nitrates and angina pectoris. *Am. J. Cardiol.*, 72: 3C, 1993
- 10) Bache, R. J., Ball, R. M., Cobb, F. R., et al. Effects of nitroglycerin on transmural myocardial blood flow in the unanesthetized dog. *J. Clin. Invest.*, 55:1219, 1975.

- 11) Fallen, E. L., Nahmias, C., Schettel, A., et al. Redistribution of myocardial blood flow with topical nitroglycerin in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 91:1381, 1995.
- 12) Sudhir, K., MacGregor, J. S., Barbant, S. D., et al. Assessment of coronary conductance and resistive vessel reactivity in response to nitroglycerine, ergonovine and adenosine: In vivo studies with simultaneous intravascular two-dimensional and Doppler ultrasound. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 21:1261, 1993.
- 13) Ganz, W., and Warcus, H. S. Failure of intracoronary nitroglycerin to alleviate pacing-induced angina. *Circulation*, 46:880, 1972.
- 14) Dove, J. T., Shah, P. M., and Schreiner, B. F. Effect of sublingually administered nitroglycerin on left ventricular wall motion in coronary artery disease. *Circulation*, 49: 682, 1974.
- 15) Cohen, M. V., Downey, J. M., Sonnenblick, E. H., and Kirk, E. S. The effects of nitroglycerin on coronary collaterals and myocardial contractility. *J. Clin. Invest.*, 52:2836, 1973.
- 16) Dove, J. T., Shah, P. M., Schreiner, B. F. Effects of nitroglycerin on left ventricular wall motion in coronary artery disease. *Circulation*, 49: 662, 1974.
- 17) Mahmerian, J. J., Fenimore, N.L., Marks, G. F., et al: transdermal nitroglycerin patch therapy reduced the extent of exercise-induced myocardial ischemia: Results of a double blind, placebo-controlled trial using quantitative thallium-201 tomography. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 24:25, 1994.
- 18) Chirkov, Y. Y., Naukalis, J. I., Sage, E., and Horowitz, J. B. Antiplatelet effects of nitroglycerin in healthy subjects and in patients with stable angina pectoris. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 21: 384, 1993.
- 19) Andrews, R., May, J. A., Vickers, J., and Hepstintall, S.: Inhibition of platelet aggregation by transdermal glyceryl trinitrate. *Br. Heart J.*, 7:575, 1994.
- 20) Abrams J.: Nitroglycerin and long-acting nitrates. *N. Engl. J. Med.*; 302:1234-7, 1980.
- 21) Harling I. M.: intravenous nitroglycerin: Clinical pharmacology and therapeutic considerations. *Am. Heart J.*, 108:141-9, 1984.
- 22) Parker, J. O., Vavkoughnett, K. A., and Farrel, B.: Nitroglycerin lingual spray: Clinical efficacy and dose-response relation. *Am. J. Cardiol.*, 57:1, 1986.
- 23) DeMots, H., Glasser S. P.: Intermittent transdermal nitroglycerin therapy in the treatment of chronic stable angina. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 13: 786-93, 1989.

- 24) Flaherty J. T., Becker L. C., Bulkley, B. H: A randomized prospective trial of intravenous nitroglycerin in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, 68: 576-88, 1983.
- 25) Jörden, R. A., Seth, L., Henry, D. A., Wilen, M. M: Dose requirements and hemodynamic effects of transdermal nitroglycerin compared with placebo in patients with congestive heart failure. *Circulation*, 71: 980-6. 1985.
- 26) Jansen, R. W., and Lipsitz, L. A.: Postprandial hypotension: Epidemiology, pathophysiology and clinical management. *Ann. Intern. Med.*, 122: 286, 1995.
- 27) Hales, C. A., and Westphal, D.: Hypoxemia following the administration of sublingual nitroglycerin. *Am. J. Med.*, 65: 911, 1978.
- 28) Elkaya U: Tolerance to organic nitrates: Evidence mechanisms clinical relevance and strategies for prevention. *Ann. Intern. Med.*, 114-667, 1991.
- 29) Packer, M., Le, W. H., Kessler, P., et al: Induction nitrate tolerance in heart failure by continuous infusion of nitroglycerin and reversal of tolerance by N-acetylcysteine, a sulfhydryl donor. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 7: 27 A, 1996.
- 30) Abrams, J.: Interval therapy avoid nitrate tolerance: Paradise regained. *Am. J. Cardiol*, 64: 931, 1989.
- 31) Bassen, M. M: The daylong pattern of the antianginal effect of long term three times daily administered isosorbide dinitrate. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 16: 936, 1990
- 32) Kruszyna, H., Kruszyna R., Smith, R.: Red blood cells generate Nitric oxide from directly acting, Nitrogenous Vasodilators. *Toxicology and Applied pharmacology*, 91: 429-438, 1987.
- 33) Kruszyna, H., Kruszyna R., Smith, R.: generation of valency hybrids and nitrosylated species of hemoglobin in mice by nitric oxide vasodilators. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 94: 498-465, 1987.
- 34) Kruszyna, H., Kruszyna R., Smith, R.: Nitrite conversion to nitric oxide in Red cells and its stabilization as a nitrosylated valency hybrid of hemoglobin. *J. Pharmacology and Experimental Therapeutics*, No:1, 241:307-13, 1986.
- 35) Reddy, P., Bowie, L., Callistein, S.: Binding of nitric oxide to thiols and hemes in hemoglobin H: Implications for α -thalassemia and hypertension. *Clinical Chemistry*, 43:8, 1442-1447, 1997.
- 36) Vilet, A., Eiserich, J. P., Kaur, H.: Nitrotyrosine as Biomarker for Reactive Nitrogen Species. *Methods in Enzymology*, Vol:269, 175-185, 1996.

- 37) Vilet, A., Eiserich, J., P., O'Neill C.: Tyrosine modification by reaktive nitrogen species: A Closer Look. Arch. Biochem. Biophys Vol: 319, 341-349, 1995
- 38) Giorgio, S., Inares, E., Copurro, M de L.: Formation of nitrosyl hemoglobin and nitrotyrosine during murine leishmaniasis. Photochem Photobiol, 63:750-754, 1996.
- 39) Kaur, H., Whiteman, M., Halliwell, B.: Peroxynitrite- dependent aromatic hydroxylation and nitration of salicylate and phenylalanine. Is hydroxyl radical involved? Free Radical Res., 26:71-82, 1997.
- 40) Sun, Y., Oberley, L.W., Lu, Y.: A simple method for clinical assay superoxide dismutase. Clinical Chemistry, 34 (3): 497-500, 1988.
- 41) Gutteridge, J. M. C.: Lipid peroxidation and antioksidants as biomarkers of tissue damage. Clinical Chemistry, 41 (12): 1819-1828, 1995.
- 42) Toshiaki Miura and Taketo Ogisa: Lipid peroxidation of the erythrocyte membrane caused by stimulated polymorphonuclear leukocytes in the presence of ferritin. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 39 (6), 1507-1509, 1991.
- 43) Kimmel, J.R., Markowitz, H., Brown, DM.: Some chemical and physical properties of erythrocyte. J Biol Chem, 234:46-57, 1959
- 44) Saik, L.A., Hsieh, H.L., Baricos, W.H., Shapira, E.: Enzymatic and immunologic quantitation of erythrocyte superoxide dismutase in adults and in neonates of different gestational ages. Pediatr. Res., 16:933-37, 1982.
- 45) Hartz, J.W., Deutsch HF. Subunit structure of human erythrocyte superoxide dismutase. J Biol Chem, 247: 7043-50, 1972.
- 46) Rotilio G, Calabrese L, Bossa F, Barra D. Properties of the apoprotein and role of copper and zinc in protein conformation and enzyme activity of bovine superoxide dismutase. Biochemistry, 11: 2182-2187, 1972.
- 47) Waser U, Barth G, Djerassi C. A study on purified apoerythrocyte. Biochim Biophys Acta, 278: 28, 1972.
- 48) Bray RC, Cockle SA, Fielden EW, Roberts PB, Rotilio G. Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. Biochem J, 139: 43-48, 1974.
- 49) Salin ML, Mc Cord JW. Superoxide dismutase in polymorphonuclear leucocytes. J Clin Invest, 94: 1005-1009, 1974.
- 50) Vance PG, Keek BB. Superoxide dismutase from streptococcus mutants. J Biol Chem, 247: 4782-86, 1972.

- 51) Suu W, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, 34: 497-500, 1988.
- 52) Yavuzer S, Özelçi G, Yıldırım G. Hiperoksi ve eritrosit superoksit dismutan (SOD) aktivitesi. *Ankara Tıp Bülteni*, 5: 47-56, 1983.
- 53) Fattal A, Spiner Z, Golendir A. Superoxide dismutase activity in the erythrocyte of the term newborn and premature. *Enzyme*, 41: 187-190, 1989.
- 54) Horton A. A., Fairhurst S. "Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity " *CRC Critical Reviews In Toxicology* 18 (1) : 27-73, 1987.
- 55) Fairbanks, V.F., and Klee, G.G: *Biochemical Aspects of Hematology*. Tietz N.W: (ED), Textbook of clinical chemistry. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1986.
- 56) Aebi, H.E., *Catalase of Enzymatic Analysis*. Volume III Enzymes 1: Oxidoreductases, Transferases. Ed. Bergmeyer H.U., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 273-285, 1987.
- 57) Fita I, Rossmann MG The active center of catalase *J Mol Biol*, 185: 21-37, 1985.
- 58) Zollner H. *Handbook of Enzyme Inhibitors*. Ed. Zollner H, 2nd, revised and enlarged edition, Part A, VCH, Weinheim, 105, 1993.
- 59) Goth L., Serum catalase: Reversible formed charge isoform of erythrocyte catalase. *Clinical Chemistry*, 37(12): 2043-2047, 1991.
- 60) *Biochemistry*, Ed Strayer L, Third edition. WH Freeman and Company, New York, 397-423, 422, 592-593, 1988.
- 61) Takahashi, K., Cohen H.J: selenium dependent glutathione peroxidase protein and activity: Immunological investigations on cellular and plasma enzymes. *Blood*, 68:640-645, 1986.
- 62) Maiorino, M., Grogogolin, C., Ursini, F.: Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Met Enzimol*, 186: 448-457, 1990.
- 63) Avissar N, Whitin JC, Allen PZ. Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *J Biol Chem*, 264: 15850-15855, 1989.
- 64) Carmagnoe F, Sinet MP, Jerome H. Selenium-dependent and non-selenium dependent glutathione peroxidases in human tissue extracts. *Biochim Biophys Acta*, 759: 49-57, 1988.
- 65) Zollner H. *Handbook of Enzyme Inhibitors*. Ed. Zollner H, 2nd, revised and enlarged edition, Part A, V CH, Weinheim, 105, 1993.

- 66) Dolunay M. Antalya il merkezinde G6PD yetmezliği prevalansı ve Antalya kökenli yetmezlikli bireylerde biyokimyasal görünüm. Uzmanlık tezi. Antalya, 1998.
- 67) Luzzato L. New developments in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Prent*, 9: 9-10, 1484-1498, 1973.
- 68) Kahler SG, Kirkman HN. Intracellular glucose-6-phosphate dehydrogenase does not monomerize in human erythrocytes. *J Biol Chem*, 258: 717-718, 1983.
- 69) Bishop C. Assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1. 1. 1. 49) and 6 phosphogluconate dehydrogenase (EC 1. 1. 1. 43) in red cells. *J Lab Clin Med*, 68. 149-155, 1966.
- 70) Siegers C. P. , Younes M., "Clinical significance of the glutathione-conjugating system" *Pharmacological Research Communications*, 15(1): 1-13, 1983.
- 71) Smith J. A, Baker M.S, Weidemann M. J., "Free radical generation in hydroperoxide-treated erythrocytes monitored continuously by luminol-amplified chemiluminescence" *Biochemistry International*, 28(6): 1009-1020, 1992
- 72) Habig, W.H, Pabst, M.J : The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139, 1974
- 73) Buetler, I.M, Eaton, D.L : Glutathione S-transferases : Amino acid sequence comparison, classification and phylogenetic relation ship. *Environ Carcinog Ecotoxicol. Rev. , C10 : 181-203, 1992.*
- 74) Board, P.G : Biochemical genetics of glutathione-S-transferase in man. *Am. J Hum. Genet. , 33 : 36-43, 1981*
- 75) Fahey, RC. , Sundquist, A. R. : Evolution of glutathione metabolism. *Adv. Enzymol. Rel. Areas Mol. Biol. , 64 : 1-53, 1991.*
- 76) Mannervik, B. , Danielson, UH : Glutathione transferases-structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev Biochem. , 23: 283-337, 1988.*
- 77) Rozell, B. , Hansson, H : Glutathione transferases of classes α , β and γ show selective expression in different regions of rat kidney. *Xenobiotica*, 23 : 835-849, 1993.
- 78) WHO : Standardization of procedures for the study of G6PD. *Techn Rep Ser*, 366 : 5-53, 1967.
- 79) Paglia DE , Valentine WN . Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin Med*, 70 : 158-69, 1967
- 80) Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for

- 81) Cohen, A. J. , Smith, J. N. , Turbert, H. : Comparative detoxication The Enzymatic conjugation of chloro compounds with glutathione in locusts and other insects. *Biochem J.* , 90 : 457-464, 1964.
- 82) Zang LY. , Shi X. , Evidence for superoxide radical production in peroxynitrite decomposition. *Biochem Mol. Biol. Tut.* 37(2) : 355-60, 1995.
- 83) Quzjona C. , Alvarez B. , Gatti RM , Patways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. *Biochem. J.*322 (Pt):167-73, 1997
- 84) Asahi M., Fujii J.,Takao I.; The oxidation of selenocysteine is involved in the inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide donors *J. Biol. Chem.* , 272 (32): 19152-7, 1997.
- 85) Farias R., Chaudhuri G., Fukuto JM: The chemistry and tumoricidal activity of nitric oxide. *J Biol Chem.* 271 (11): 6144-51, 1996
- 86) Vatassery GI. Oxidation of vitamin E, vitamin C, and thiols in rat brain synaptosomes by peroynitrite *Biochem. Pharmacol.* 52 (4): 579-86, 1996
- 87) Soszynski M, Baartosz G. Effect of peroxynitrite on erythrocytes. *Biochim Biophys Acta.*, 1291: 107-114, 1996.
- 88) Kanematsu M., Takasi K., Sukata Y. Synergistic enhancement of nitrite on lysophospholipid- mediated cytolysis. *Biol. Pharm. Bull.* 17 (1): 78-81, 1994.

AKDENIZ UNIVERSITESI
MUTLUK
YUNUSKAYA