

T 1139

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Biyofizik Anabilim Dalı

**DEĞİŞİK DENEYSEL STRES MODELLERİNİN  
GÖRSEL UYARILMA POTANSİYELLERİ  
ÜZERİNE ETKİLERİ VE MEKANİZMASI**

T 1139

**Nazmi YARAŞ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Piraye YARGIÇOĞLU**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: 99.01.0122.02).

"Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir"

**Antalya, 2000**

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyofizik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 26/06/2000

**Tez Danışmanı :** Prof. Dr. Piraye YARGIÇOĞLU  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyofizik Anabilim Dalı



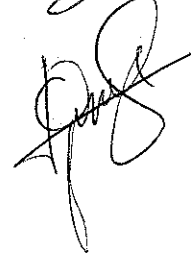
**Üye :** Prof. Dr. Korkut YALTKAYA  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Nöroloji Anabilim Dalı



**Üye :** Prof. Dr. Aysel AĞAR  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Fizyoloji Anabilim Dalı



**Üye :** Doç. Dr. Saadet GÜMÜŞLÜ  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı

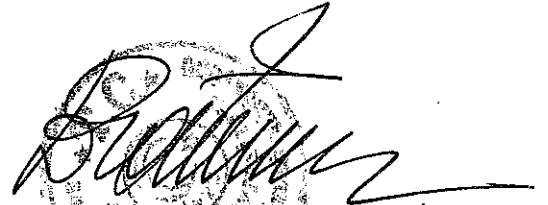


**Üye :** Doç. Dr. Nimet UYSAL  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Fizyoloji Anabilim Dalı



**Onay :**

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Ramazan DEMİR  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

Strese maruz kalan bireylerde fizyolojik ve davranışsal bir takım değişikliklerle birlikte, NO'nun ve lipid peroksidasyonunun arttığı da bilinmektedir. Ancak, streste oluşabilecek görsel sistem değişikliklerinde NO'nun ve lipid peroksidasyonunun nasıl bir rolü olduğu henüz bilinmemektedir. Bu amaçla hazırlanan çalışmamızda, 120 adet albino sıçan her birinde 10'ar adet olmak üzere bölünerek şu gruplar oluşturulmuştur; kontrol grubu (K), L-NAME alan kontrol grubu (KL), Vitamin E alan kontrol grubu(KE), soğuk strese maruz bırakılan grup (S), hareketsizlik stresine maruz bırakılan grup (H), hareketsizlik ve soğuk stresine maruz bırakılan grup (HS), L-NAME alan stres grupları (SL, HL, HSL), Vitamin E alan stres grupları (SE, HE, HSE).

15 günlük deney süresince, L-NAME 10 mg/kg/gün olarak intraperitoneal, vitamin E ise 30 mg/kg/gün olarak intramusküler verilmiştir. Aynı sürede kontrol gruplarına serum fizyolojik injekte edilmiştir. Deneysel sürenin sonunda sıçanların görsel uyarılma potansiyelleri (VEP) kaydedildikten sonra, biyokimyasal analizler için kanları ile birlikte retina ve beyin dokuları alınmıştır.

Plazma kortikosteron düzeylerinin bütün deney gruplarında kontrole göre arttığı görülmüştür. Stres grupları kontrolleri ile karşılaştırıldığında, L-NAME'in sadece SL grubunda kortikosteron düzeyini önemli ölçüde yükseltirken, Vitamin E'nin bütün stres gruplarında kortikosteron düzeylerini anlamlı olarak azalttığı saptanmıştır.

Beyin ve retina TBARS değerlerinin bütün stres gruplarında K grubuna göre önemli olarak arttığı gözlenmiştir. L-NAME'in kontrolleri ile karşılaştırıldığında, stres gruplarında lipid peroksidasyonu azalttığı, ancak KL grubunda yükselttiği dikkati çekmiştir. Vit E'nin ise, bütün stres gruplarında kontrollerine göre TBARS değerlerini anlamlı olarak düşürdüğü izlenmiştir.

Kontrolle karşılaştırıldığında, beyin nitrit seviyelerinin bütün stres gruplarında, retina nitrit seviyelerinin ise sadece H grubunda önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. Kontrolleri ile karşılaştırıldığında, L-NAME ve Vit E'nin bütün stres gruplarında nitrit değerlerini fark edilir düzeyde düşürdüğü görülmüştür.

İstatistiksel değerlendirme sonucunda, beyin ve retina GSH-Px aktivitelerinin stresten etkilendiği, L-NAME'in etkisinin ise stres modeline göre değiştiği saptanmıştır.

Stres grupları kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, her üç stres grubunda da VEP'lerin tüm bileşenlerinin latenslerinin uzadığı tespit edilmiştir. L-NAME'in, K ile mukayese edildiğinde KL grubunda tüm VEP latenslerini anlamlı biçimde uzattığı gözlenmiştir. Ancak, L-NAME'in ve vitamin E'nin kontrolleri ile karşılaştırıldığında, tüm stres gruplarında VEP bileşenlerinin latenslerini anlamlı olarak kısalttığı göze çarpmıştır. VEP'lerin tepeden-tepeye genlik değerleri içerisinde, sadece P<sub>2</sub>N<sub>2</sub> genliğinin KL ve tüm stres gruplarında kontrol grubunun genlik değerine göre düştüğü bulunmuştur.

## ABSTRACT

Early researches have put forward that NO and lipid peroxidation were increased during stress. However, it is not clear whether NO and lipid peroxidation have roles on visual system changes possibly occurred in stress. To investigate this topic, 120 albino rats were used in this study. Experimental animals were divided equally into 12 groups as follows; Control group (C), L-NAME+control group (CL), Vitamin E+control group (CE), cold stress group (CS), immobilization stress group (IS), cold+ immobilization stress group (CIS), L-NAME+stress groups (CSL, ISL, CISL), Vit E+stress groups (CSE, ISE, CISE).

Chemical agents, L-NAME and Vitamin E, were administrated 10 mg/kg/day *i.p.* and 30 mg/kg/day *i.m.* respectively throughout 15 days experimental period. Physiological solution was injected to the control groups during the experimental period. Visual evoked potentials (VEPs) were recorded from animals at the end of the experimental period. Afterwards, blood, retina and brain of rats were taken in order to measure biochemical parameters.

Plasma corticosteron levels were increased according to the control group. L-NAME increased corticosteron level only in LCS group with respect to its control group, while Vitamin E decreased corticosteron levels in all stress groups compared with their respective control groups.

Brain and retina TBARS levels were significantly increased in all stress groups compared with the control group. L-NAME decreased lipid peroxidation in all stress groups, but increased only in CL group according to their corresponding control groups. Although, Vitamin E decreased significantly TBARS levels in all stress groups with respect to C group.

Compared with the control group, significant increases were observed in brain nitrit levels of all groups and in retina nitrit levels of IS group. It was observed that L-NAME and Vitamin E decreased the nitrit levels in both retina and brain of all stress groups with respect to their control groups.

It was observed that GSH-Px activities were affected by stress. On the other hand, effects of L-NAME was found to depend on the stress models.

All VEP components were prolonged in all stress groups compared with their control groups. L-NAME prolonged all VEP components in CL group with respect to C group. However, L-NAME and Vit E reduced VEP latencies in all stress groups respective to their control groups.

Among the peak-to-peak amplitudes of VEPs only P<sub>2</sub>N<sub>2</sub> amplitude was decreased in LC and in all stress groups respect to control group.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesindeki değerli katkı ve eleştirileriyle bana yol gösteren hocam Prof. Dr. Piraye YARGIÇOĞLU'na, özverili çabaları ve yardımları dolayısıyla;

Prof. Dr. Aysel AĞAR ve ekibine,

Doç. Dr. Saadet GÜMÜŞLÜ ve ekibine

Uzm. Şakir ATALAY şahsında tüm Deney Hayvanları Ünitesi çalışanlarına,

Erol NİZAMOĞLU'na,

Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Ayrıca, teknik olanakları ile bu çalışmanın gerçekleşmesini sağlayan Fizyoloji ve Biyokimya Anabilim Dalları'na

teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	SAYFA
<b>ÖZET</b>	iv
<b>ABSTRACT</b>	v
<b>TEŞEKKÜR</b>	vi
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b>	vii
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b>	viii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	x
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	xi
<b>GİRİŞ</b>	1
<b>GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Stres	3
2.1.1. ACTH Hormonu ve Stres	6
2.1.2. Streste Kortizolün Rolü	7
2.1.3. Stres Sistemleri ve Diğer MSS Bileşenleri	7
2.1.4. Stres ve Serbest Radikaller	9
2.2. Serbest Radikaller	10
2.2.1. Serbest Radikallerin Hücrelere Etkisi	11
2.3. Antioksidan Savunma Sistemi	12
2.4. Nitrik Oksid	16
2.5. Görsel Sistem ve Görsel Uyarılma Potansiyelleri	22
2.5.1. Görsel Sistem	22
2.5.2. Görsel Uyarılma Potansiyelleri	26
<b>GEREÇLER VE YÖNTEMLER</b>	29
3.1. Görsel Uyarılma Potansiyellerinin Kaydedilmesi	30
3.2. Kan Basıncı Ölçümleri	30
3.3. Biyokimyasal Yöntemler	31
3.3.1. Doku Thiobarbitürik Asid Reaktif Ürünlerinin Ölçümleri	31
3.3.2. Nitrit Tayini	31
3.3.3. Kortikosteron Tayini	32
3.3.4. GSH-Px Enzim Aktivitesi Tayini	32
3.3.5. Protein Tayini	32
3.4. İstatistiksel İşlem	33
<b>BULGULAR</b>	34
4.1. Genel Görünüm	34
4.2. Besin Tüketimi	34
4.3. Ağırlık Değişimi	34
4.4. Kan Basıncı	34
4.5. Plazma Kortikosteron Sonuçları	34
4.6. Nitrit Sonuçları	36
4.7. GSH-Px Enzim Aktivitesi Sonuçları	36
4.8. TBARS Sonuçları	39
4.9. VEP Sonuçları	42
<b>TARTIŞMA</b>	47
<b>KAYNAKLAR</b>	52
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	63

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Ach	Asetilkolin
ACTH	Adrenokortikotropik Hormon
AH	İndirgeyici Ajan
ANOVA	Varyans Analizi
ATP	Adenozin trifosfat
AVP	Arginin vazopresin
BS	Beyin kökü
CaBP	Kalsiyum Bağlayıcı Protein
CaM	Kalsiyum Kalmodulin
cAMP	siklik adenozin mono fosfat
CAT	Katalaz Enzimi
cGMP	Siklik Guanozin Mono Fosfat
CO	Karbonmonoksit
CRH	Kortikotropin Salgılatıcı Hormon
dLGN	Dorsal Lateral Genikulat Nükleus
E	Epinefrin
EDTA	Etilen Di-amin Tetra-asetik Asit
EEG	Elektroensefalografi
EP	Uyarılma Potansiyeli
EPSP	Eksitator Post-sinaptik Potansiyel
FVEP	Flaş Görsel Uyarılma Potansiyeli
GABA	Gamma Amino Butirik Asit
GC	Guanilat Siklaz
GH	Büyüme Hormonu
GHRH	Büyüme Hormonu Salgılatıcı Hormonu
Glu	Glutamat
G	G proteini
GSH	Glutatyon
GSH-Px	Glutatyon Peroksidaz Enzimi
GSNO	S-nitrosoglutatyon
GSSG-R	Glutatyon Redüktaz
GTP	Guanozin Tri Fosfat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksid
IL	İnterlökin
IPSP	İnhibitör Post-sinaptik Potansiyel
L <sup>•</sup>	Karbon Merkezli Radikal
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler
LC	Lokus ceruleus
LH	Luteinleştirici Hormon
L-NAME	NG <sup>-</sup> -nitro-L-arginin metil-ester
LOO <sup>•</sup>	Peroksil Radikali
LOOH	Lipid Hidroperoksid
mc	Magnoselluler
MDA	Malondialdehid
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Dinitrojen Trioksit
NE	Norepinefrin
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat redükte formu

NMDA	N-metil D-aspartat
NO	Nitrik Oksid
NO <sup>•</sup> <sub>2</sub>	Nitrojen Dioksid
NO <sup>+</sup>	Nitrozonyum Katyonu
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat
NOS	Nitrik Oksid Sentaz Enzimi
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Süperoksid Anyonu
O <sub>3</sub>	Ozon
•OH	Hidroksil Radikali
ONOO <sup>-</sup>	Peroksinitrit
OT	Oksitosin
pc	Parvoselluler
PDE	Fosfodiesteraz Enzimi
pGC	Partiküler Guanilat Siklaz
PKA	Protein kinaz A
PKC	Protein kinaz C
POMC	Proopiomelanokortin
PR-VEP	Patern Değişmeli Görsel Uyarılma Potansiyeli
PUFA	Poliansatüre Yağ Asidleri
PVN	Paraventriküler Çekirdek
RNOS	Reaktif Nitrojen Oksid Türleri
sGC	Çözünebilir (soluble) Guanilat Siklaz
SER	Düz endoplazmik retikulum
SIN-1	3-morpholino-sydnonimine
SNP	Sodyum Nitroprusid
SOD	Süperoksid Dismutaz Enzimi
SON	Supraoptik çekirdekler
TBARS	Thiobarbütirik Asid Reaktif Ürünleri
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
VEPs	Görsel Uyarılma Potansiyelleri
VP	Vazopresin



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Strese karşı oluşan entegre cevaplar.	4
Şekil 2.2. Hipotalamik-hipofizyal sistem	5
Şekil 2.3. ACTH etki mekanizması	6
Şekil 2.4. Zona glomerulosada hormon sentezi	6
Şekil 2.5. Stres sisteminin merkez bileşenleri	8
Şekil 2.6. Merkezi sinir sisteminde NO'nun etki mekanizması	17
Şekil 2.7. Antioksidatif GSNO yolağı	19
Şekil 2.8. NO'nun koruyucu etki mekanizması	20
Şekil 2.9. NO'nun fotoreseptördeki etki mekanizması	21
Şekil 2.10. Retinanın nükleer tabakaları	22
Şekil 2.11. Çubukların ışığa adaptasyonu	23
Şekil 2.12. Lateral genikulat nukleus	24
Şekil 2.13. Primer görsel korteksin anatomik tabakaları	25
Şekil 2.14. Görsel uyarılma potansiyeli ve bileşenleri	27
Şekil 4.1. Plazma kortikosteron düzeyleri	37
Şekil 4.2. Kontrol ve deney gruplarının VEP kayıtları	43
Şekil 4.3. Kontrol ve deney gruplarının VEP kayıtları	44

## TABLULAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Strese gösterilen davranışsal ve fiziksel adaptasyonlar	3
Tablo 2.2. CRH reseptör alttipleri	4
Tablo 2.3. Stres sırasında artan kortizolün etkileri	7
Tablo 2.4. Eşlenmemiş elektron reaksiyonu	18
Tablo 4.1. Yem tüketimi ve ağırlık değişimi	35
Tablo 4.2. Kortikosteron değerleri	37
Tablo 4.3. Beyin ve retina nitrit değerleri	38
Tablo 4.4. Beyin ve retina GSH-Px değerleri	40
Tablo 4.5. Beyin ve retina TBARS değerleri	41
Tablo 4.6. Latens değerlerinin ortalama ve standart sapmaları	45
Tablo 4.7. Genlik değerlerinin ortalama ve standart sapmaları	46

## GİRİŞ

Strese maruz kalan kişilerde fizyolojik ve davranışsal bir takım değişiklikler gözlenir. Stresin bir çok etkileri olmakla birlikte en çarpıcı etkisi, hipotalamusun paraventriküler çekirdekleri (PVN)'nde kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH)'u salgılatarak adreno-kortikotropik hormon (ACTH)'un ön hipofizden salgılanmasına neden olmasıdır. ACTH ise böbrek üstü bezlerinden stres hormonları olarak isimlendirilen vücuttaki yağ, protein ve karbonhidrat mekanizmasını etkileyen glukokortikoidlerin salınmasına yol açar. Ayrıca streste, hipotalamusun düzenlediği vücut sıcaklığı, kardiyovasküler tonus, hormon salınımı, besin ve su alınımı gibi parametrelerin yanı sıra (1,2), nörotransmitter sistemlerinde de önemli değişikliklerin (2,3,4,5) olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Stresteki bu değişikliklere paralel olarak, lipid peroksidasyonun arttığı (6,7,8) ve bazı antioksidan enzimlerin azaldığı da (8,9) gösterilmiştir. Bütün bu etkilerin tetiklenmesine neden olan CRH artışında ve lipid peroksidasyonda, nitrik oksit (NO)'in önemli bir rolünün olduğu ileri sürülmektedir.

Nitrik oksit ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda, NO'nun serbest bir radikal olduğu, oksijen varlığında nitrit (NO<sub>2</sub>) ve nitrat (NO<sub>3</sub>) gibi çeşitli nitrojen türleri (RNOS) oluşturduğu ortaya konmuştur. NO/O<sub>2</sub> reaksiyonundan oluşan ara bileşiklerin DNA ve enzimlerin oksidasyonuna ve hatta zincir kırılmalarına neden olduğu bulunmuştur (10, 11). Otooksidasyondan oluşan bu reaktif türlere ek olarak NO'nun oksijen radikalleri ve süperoksitle reaksiyona girip, peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>)'i oluşturduğu da saptanmıştır. Peroksinitritin birçok biyolojik molekülü tahrip edebilen ve metal katalizinden bağımsız olarak hidroksil radikallerine ayrışabilen, güçlü bir oksidan olduğu ifade edilmiştir (12,13,14). Zararlı etkilerine karşın, NO'nun antioksidan özellikler gösterdiği de tespit edilmiştir (11,15,16,17). NO'nun, hemeproteinlerin hidrojen peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) tarafından tahribini engellediği ve fenton tipi oksidasyon reaksiyonlarını ortadan kaldırdığı belirtilmiştir (18). Ayrıca NO'nun tiol radikalleri ile etkileşimi sonucunda, glutatyon (GSH)'dan 100 kere daha kuvvetli bir antioksidan olan S-nitrosoglutatyon (GSNO)'u oluşturduğu da bulunmuştur. GSNO'nun peroksinitriti detoksifiye ederek ve fenton tipi reaksiyonları baskılayarak lipid peroksidasyonu engellediği gösterilmiştir (15,16). Dolayısıyla, son yıllarda yapılan bu çalışmalar NO'nun nöroprotektif etkisini destekler niteliktedir.

NO'nun hem radikal hem de antioksidan olduğunu belirten araştırmalar değerlendirildiğinde, bu konunun henüz yeterince aydınlatılamamış olduğu görülmüştür. Nitekim, bu gizemli molekülün paradoksal etkisini açıklayabilmek için bir takım farklı görüşler ortaya konmuştur. Özellikle son yıllarda, NO'nun farklı etkilerinin ortam koşullarına veya başka etkenlere bağlı olabileceği ileri sürülmüştür (11, 13, 19,20 ).

Nitrik oksid sentetaz (NOS)'ın üç tip izoformunun (eNOS, iNOS, nNOS) retinada bulunması (21,22) NO'nun görsel işlemlerde önemli bir rolünün olabileceğini düşündürmektedir. Streste NO sentezinin arttığı dikkate alındığında, retina fonksiyonlarının ve dolayısıyla görsel uyarılma potansiyelleri (VEPs)'nin etkilenebileceği en doğal beklentidir. VEP'lerin görsel sistem değişikliklerini en hassas biçimde ortaya koyan güvenilir bir elektrofizyolojik yöntem olduğu, çok sayıda araştırmacı tarafından ortaya konmuştur (23,24,25). Diğer yandan, bu potansiyellerin optik yoldaki patolojileri erken gösteren bir parametre olduğu da kabul edilmektedir (26,27). Ayrıca, sıçanlarda kaydedilen bu potansiyellerin insan görsel sistemin incelenmesi yönünden iyi bir model olduğu da vurgulanmıştır (28). Bu bilgilerin ışığı altında, çalışmamızda stres durumunda oluşması beklenen VEP değişiklikleri saptanacak ve bu değişikliklerde NO'nun muhtemel rolünün ne olabileceği NOS inhibitörü kullanarak aydınlatılmaya çalışılacaktır. Ayrıca araştırmamız, değişik stres modellerinde oluşan VEP değişikliklerini karşılaştırmalı olarak ortaya koyarak, literatüre yeni ve kapsamlı bilgiler katacaktır.

Bazı stres modellerinde lipid peroksidasyonun arttığını bildiren yayınlar (6, 8, 29, 30) olmasına rağmen, soğuk streste antioksidan sistemdeki artış nedeniyle lipid peroksidasyonun artmadığı Capel ve arkadaşları (31) tarafından gösterilmiştir. Dolayısıyla, farklı stres modellerinde lipid peroksidasyon değişimleri dikkate alınarak ve antioksidan ajan kullanılarak, streste oluşabilecek VEP değişikliklerinde lipid peroksidasyonun önemi belirlenmeye çalışılacaktır.

Serbest radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldıran antioksidan savunma sistemi içerisinde yer alan vitamin E en çok bilinen ve en önemli antioksidandır. Vit E'nin biyolojik membranlarda serbest radikal hasarının ilerlemesini engelleyen zincir-kıran antioksidan fonksiyonu birçok çalışmada gösterilmiştir (32, 33, 34). Bundan başka, Vit E'nin plazma lipoproteinlerindeki ve biyolojik membranların fosfolipidlerindeki poliansature yağ asitlerini (PUFAs) koruyan güçlü bir peroksil radikali temizleyicisi olduğu da saptanmıştır(34). İnsanlarda kronik vitamin E eksikliğinin biyokimyasal, nörolojik ve oftalmolojik anormallikler yanında, eritrositlerin yaşam sürelerinin kılmasına neden olduğu bildirilmektedir (33). Ayrıca VEP'lerin vitamin E eksikliğine bağlı komplikasyonlardan da etkilendiği gözlenmiştir (35).

Özetle, deneysel protokolümüz NO ve lipid peroksidasyonun rollerini aydınlatarak streste ortaya çıkması beklenen VEP değişikliklerinin mekanizmasına ışık tutacaktır.

## GENEL BİLGİLER

### 2.1. STRES

Stres, 1957 yılında Hans SELYE tarafından ortaya atıldıktan sonra tanımı üzerinde bir çok tartışma olmuştur. Stres, en geniş anlamı ile yaşamın devamı için çevresel değişimlere gösterilen zorunlu adaptasyondur. Stresin nedenleri çok fazla olmakla birlikte fiziksel travma, uzun süre soğuğa maruz kalma, uzun süreli ağır egzersiz, enfeksiyon, şok, oksijen kaynağının azalması, ağrı ve kavga gibi faktörler en temel olanlarıdır (36,37)

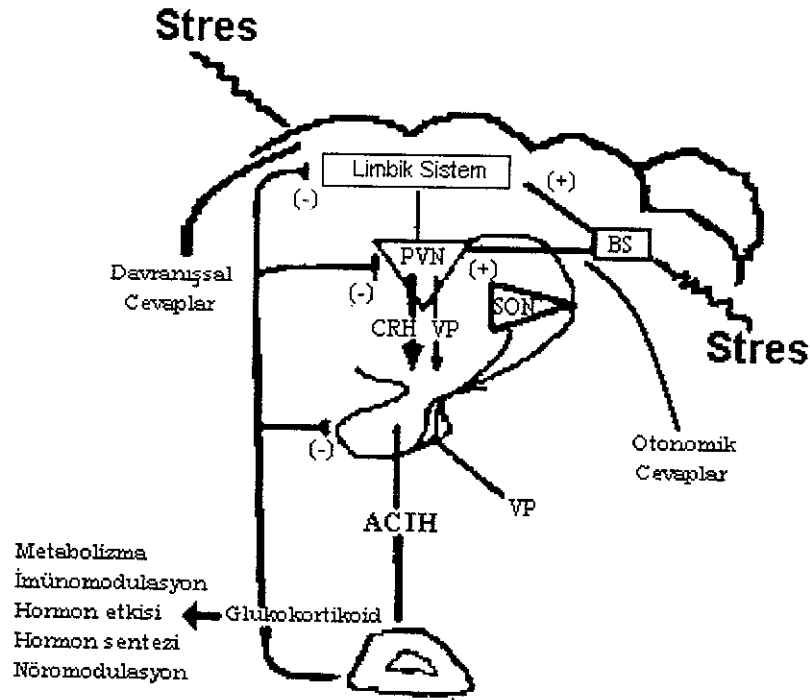
Soğuğa maruz kalmaya verilen cevapla, kavga veya enfeksiyona verilen cevabın farklı olması beklenir. Ancak her iki durumda da adrenal korteks tarafından salınan ve glukokortikoid hormonu olan kortisol salınımı artmaktadır. Bu durumda, stres terimi kortisol salınımını artıran herhangi bir olay olarak tanımlanabilir (36,37,38)

Stres sisteminin aktivasyonu, Tablo 2.1 de özetlendiği gibi genel adaptasyon veya stres sendromu denilen sınırlı bir süre için görülen davranışsal ve fiziksel değişiklikleri beraberinde getirir. Bu değişiklikler genellikle adaptifdir ve bireyin yaşam şansını artırıcı yöndedir. Stres sistemlerinin uyarılması stres türüne bağlı olsada, stresin dozu veya süresi arttıkça, strese özgü cevaplar azalır ve genel stres sendromları oluşur (38,39)

Tablo 2.1. Strese gösterilen davranışsal ve fiziksel adaptasyonlar (38).

Davranışsal Adaptasyon	Fiziksel Adaptasyon
Dikkatin artması	Oksijen ve besinler MSS ve stres bölgelerine yönlendirilir
Kognisyonun artması	Kardiovasküler ton değişir, kan basıncı ve kalp ritmi artar.
Euphoria veya dysphoria	Solunum artar
İsteklerin azalması	Glukoneogenesis ve lipolizis artar
Üreme davranışlarının azalması	Endojen veya ekzojen zehirli ürünler atılır.
	Büyüme ve üreme sistemleri durur.
	Sindirim azalır.

Strese verilen başlıca endokrin cevap, hipotalamik paraventricular çekirdekte (PVN) sentezlenen kortikotropin salgılatıcı hormonunun (CRH) salınmasıdır. CRH özel reseptörleri ile etki ederek ACTH salınımına neden olur. CRH, ACTH salınımının temel hipotalamik düzenleyicisidir (36, 39) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Strese karşı oluşan entegre cevapları gösteren şema (36) (SON:supra optic çekirdekler)

CRH reseptörlerinin (CRH-R) farmakolojik özellikleri ve dağılımları bakımından değişik başlıca iki alt tipi tanımlanmıştır (Tablo 2.2).

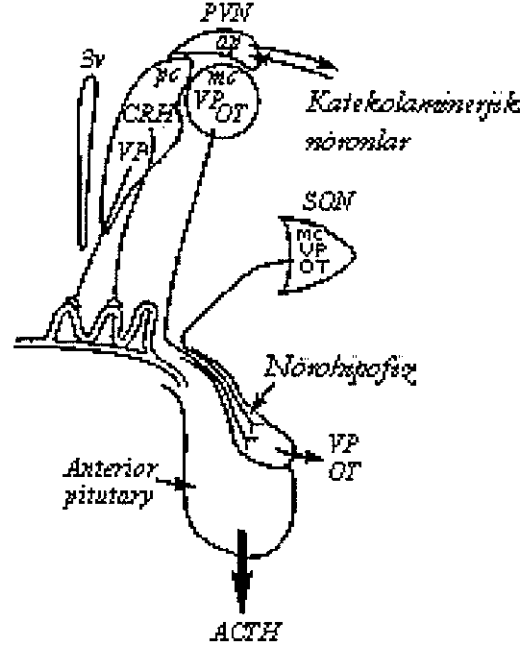
Tablo 2.2: CRH Reseptör Altıptleri (36)

	CRH-R1	CRH-R2	
		CRH-R2 $\alpha$	CRH-R2 $\beta$
Yapı	7 domain 415 aa	7 domain 411 aa	7 domain 431aa
Sinyal İletimi	cAMP-PKA-PLC	cAMP-PKA	cAMP-PKA
Yerleşim	Korteks, Limbik yapı	Hipotalamus	Kalp
	Serebellum	Lateral septum	Düz kas
	Duyusal yapılar	Olfaktor bulb	

CRH-R<sub>1</sub> reseptörleri hipofiz ve beyinde, CRH-R<sub>2</sub> reseptörleri ise periferde ve beyin bazı bölgelerinde bulunur (Tablo 2.2)

Şekil 2.2. de görüldüğü gibi PVN başlıca 3 kısımdan oluşur: 1)Anterior ve medial-dorsal parviselluler CRH nöronları; bunlar median eminence'de bulunan hipofizyal portal kapillerlere projekte olurlar. 2) Dorsolateral vazopressin ve oksitosin salgılayan magnoselluler hücreler; bunlar CRH salgırlar ve arka hipofize

projekte olurlar. 3) Dorsal, medial-ventral ve lateral parviselluler nöronlar; bunlar beyin sapına, medulla spinalise uzanan otonomik sinir sistemine ait CRH salgılayan nöronlardır (36)



Şekil 2.2. Hipotalamik-hipofizyal sistemin şematik gösterimi (SON:supraoptik çekirdekler) (36).

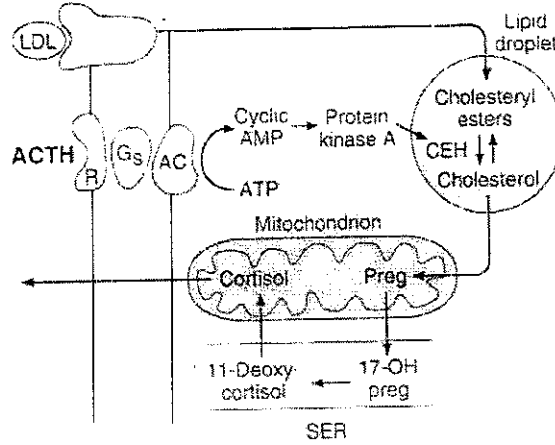
Kronik streste parvoselluler nöronlarındaki CRH ekspresyonu ACTH cevabı ile paralellik gösterir. Hareketsizlik ve soğuk akut stres tiplerinde CRH mRNA seviyesindeki artış ilk birkaç uyarıdan sonra sona ererken, ayak şoku kronik stres tipinde ise stresin sona ermesinden 24 saat sonra bile CRH'in yüksek kaldığı bulunmuştur (36).

CRH'in ACTH salınımını düzenleyici etkisi yanında, proopiomelanocortin (POMC) transkripsiyonu ve hücre mitozu üzerinde de etkileri söz konusudur. CRH'in bu etkilerini adenilat siklaz/cAMP/protein kinaz A'ya bağımlı mekanizmalar ile gösterdiği saptanmıştır (38).

Medial-dorsal parvocellular CRH nöronlarının %50'sine yakını ACTH salınımından sorumludurlar ve aynı zamanda VP de sentezletirler (36) (Şekil 2.2). İnsan ve sıçanlarda VP'nin zayıf ACTH uyararı olduğu, bazal veya CRH ile uyarılan POMC transkripsiyonunu hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (38).

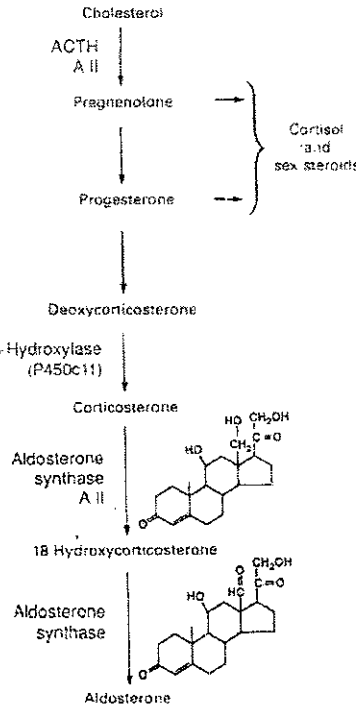
### 2.1.1. ACTH Hormonu ve Stres

Ön hipofizden salgılanan ACTH hormonu, hedef organı adrenal kortekste bulunan adrenokortikal hücrelerin plazma membran reseptörlerine bağlanır ve Adenilat siklaz ve cAMP yolağını aktive ederek protein kinaz A aktivasyonuna neden olur ACTH etki mekanizması ve sentez kademeleri Şekil 2.3 de gösterilmiştir (40, 41)



Şekil 2.3 ACTH'in kortizol salgılayan hücreler üzerine etki mekanizması (41)

Kolesterol esterlerden kortizol ve seks hormonlarının oluşması Şekil 2.4 de gösterilmiştir (41).



Şekil 2.4 Zona glomerulosa da hormon sentezi (41)

Yakın zamana kadar, streste ACTH in tek rolünün kortizol salgılatması olduğu düşünülüyordu. Fakat şimdi biliniyor ki ACTH,



kortizol salgılanmasının uyarılmasından bağımsız olarak, öğrenme ve hafızayı kolaylaştıran bir peptittir. Sonuçta, psikososyal stresin neden olduğu ACTH artışı, bireyin stresle başa çıkmak için uygun cevapları öğrenmesine yardımcı bir mekanizmadır (38).

### 2.1.2. Streste Kortizolün Rolü

Plasma kortizolünün artmasının başlıca etkileri Tablo 2 3 de özetlenmiştir. Kortizolün organik metabolizma üzerindeki etkisi, metabolitleri hareketlendirerek amino asit (a.a), glukoz, gliserol ve serbest yağ asitlerinin plazma konsantrasyonunu artırmaktır. Vücut protein kaynaklarının katabolizması ile a.a serbestlenmesi, glukoneogenesis ile glukoz kaynağı sağlamanın yanında olası bir yaralanma için potansiyel a.a kaynağı da oluşturur (39).

Tablo 2 3 Stres sırasında artan kortizolün etkileri (39)

1. Organik Metabolizma üzerine etkileri;
  - a) Protein katabolizmasının uyarılması
  - b) Amino asitlerin karaciğer tarafından alınması ve glukoneogenesisin uyarılması
  - c) Vücut hücrelerinde glukoz alınımının inhibisyonu ve oksidasyonu
  - d) Triaçilgliserol katabolizmasının uyarılması
2. Vasküler reaktivitede artış
3. Stresin zarar verici etkilerine karşı koruyucu etkisi
4. İnflamasyonun ve özel bağışıklık cevaplarının inhibisyonu

Vücudun optimal bir stres cevabı oluşturmasında; stresin hasar verici etkilerine direnebilmesi için, kortizol artışının neden bu kadar büyük rolü olduğu bilinmemektedir. Ancak, plazma kortizol artışının, şiddetli strese maruz kalan bireylerin ölüm insidanslarını azaltıcı bir etkisinin olabileceği ileri sürülmektedir (37, 39).

Glukokortikoidler hipotalamik CRH ve VP ekspresyonunu ve salınımını inhibe eder. Ayrıca glukokortikoidler POMC transkripsiyonunu ve ACTH salınımını inhibe eder (37, 38).

### 2.1.3. Stres Sistemi ve Diğer MSS Bileşenleri

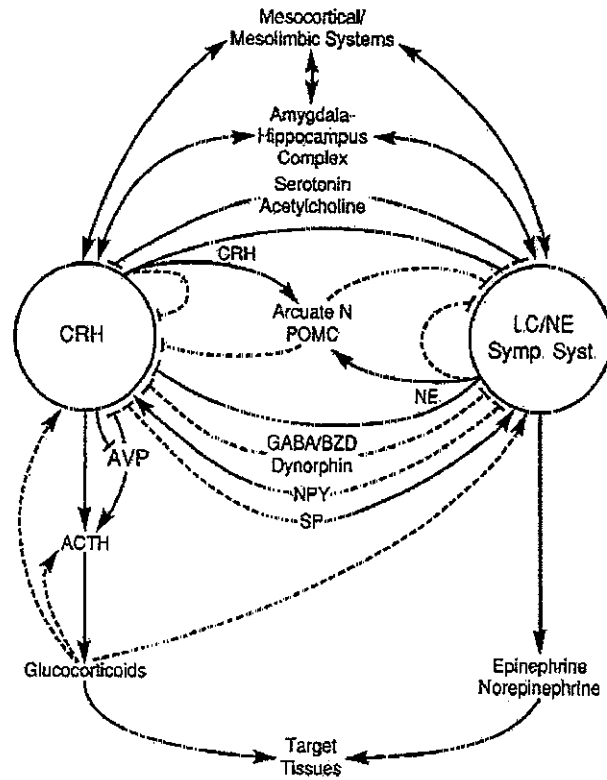
Stres sisteminin merkez bileşenlerini:

- 1) Hipotalamusun paraventriculer çekirdeğinde ki parvocellular CRH ve arginin-vasopressin (AVP) nöronları.

- 2) Medullanın paragigantocelluler ve parabranchial çekirdeklerinde ki CRH nöronları.
- 3) Locus ceruleus (LC) ve medulla-pons'un büyük oranda noradrenerjik (NE) hücre grupları

Çevresel bileşenlerini ise;

- 1) Hipotalamik-pitutory-adrenal (HPA) eksen
- 2) Efferent sempatik/adreno medullary sistem ve parasempatik sistem oluşturur (Şekil 2.5) (38).



Şekil 2.5. Stres sisteminin merkez bileşenleri (38)

Stres sistemi öte yandan diğer MSS bileşenleri ile de etkileşim içindedir. Bu MSS bileşenleri içinde mesokortikolimbik dopaminerjik sistem, amigdala, hipokampus, arcuate nucleus ve POMC nöral sistemi vardır. Hepsi stres sırasında aktif hale gelirler ve stres sistemini etkilerler. Bunlara ilaveten, stres sistemi MSS'nin ısı düzenleme ve açlık -tokluk merkezleri ile de ilişkidir (Şekil 2:5)(2, 38)

Amigdala stres sırasında beyin sapı veya kortikal asosasyon alanlarındaki katekolaminerjik nöronlar ile aktive olur ve mezokortikolimbik dopaminerjik sistemin aktivitesini etkiler. Ayrıca, amigdalada bulunan CRH peptiderjik nöronlarının glukokortikoidler

ile uyarılması korku, ansiyete ve stres sistemlerinin uyarılmasına neden olur (38, 39)

Dopaminerjik sistemin hem mesokortikal hem de mesolimbik bileşenleri, LC/NE ve PVN CRH sistemleri ve glukukortikoidler ile uyarılırlar. Mezokortikal sistemin, kognitif fonksiyonlarda önemli bir rolü olan prefrontal kortekse projeksiyonu stresi baskılayıcı bir role sahiptir. Diğer yandan, mezolimbik sistemin accumbens çekirdeğine inervasyonu motivasyon/ceza/ödül gibi davranışlarda temel rol alır (38).

Beyinde ve periferde, norepinefrin (NE), epinefrin (E) ve dopamin üreten katekolaminerjik sistemler de stres sırasında en hızlı aktive olan sistemler arasındadır. Mikrodiyaliz çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre stres sırasında hipokampusun ekstrasellüler sıvısında NE ve E düzeylerinin stres modeline bağlı olarak değiştiği vurgulanmıştır. Soğuk streste NE ve E'nin artmasına (42, 43, 44) karşın, hareketsizlik stresinde NE düzeyinin azaldığı saptanmıştır (4).

Bunlara ilaveten, asetilkolin (ACh)'in soğuk stresinde düştüğü (45) vurgulanmakla birlikte, farklı stres modeli kullanan bazı çalışmalarda ise ACh'in değişmediği veya azaldığı (46, 47) ortaya konmuştur.

#### 2.1.4. Stres ve Serbest Radikaller

Serbest radikallerin hedefleri içerisinde nükleik asitler, proteinler, karbohidratlar ve lipidler yer almaktadır. Ancak biyolojik membranlarda lipid oranı yüksek olduğundan, serbest radikallerden en çok bu yapılar etkilenir. Biyolojik membranların fosfolipidlerindeki veya trigliseridlerdeki doymamış yağ asitlerinin serbest radikallerle etkileşimi sonucu, lipid peroksidasyonu meydana gelmektedir. Bu da doğrudan membranın yapısını etkileyerek fonksiyonunda önemli değişikliklere yol açar (48, 49, 50, 51, 52).

Stresin oksidan üretimine katkısı, özellikle beyinde henüz iyi anlaşılmasına rağmen, deney hayvanlarının plazma, akciğer, mide ve beyinde lipid peroksidasyonun arttığı bir çok çalışmada belirtilmiştir. Sıçanlarda hareketsizlik stresi ile oksidatif hasar oluşturulmuş ve bu oksidatif hasar antioksidan uygulanması ile önlenmiştir. Hareketsizlik ve soğuk stresinde plazma ve beyinde lipid peroksidasyonun arttığı ve antioksidan enzimlerin azaldığı saptanmıştır (8, 9, 53).

Diğer yandan, stresin oluşturduğu oksidatif hasarın beyin bölgelerine bağlı olarak değiştiği vurgulanmıştır. Stres durumunda lipid peroksidasyonun beyin, orta beyinde, serebral korteks ve serebellumda önemli miktarlarda arttığı görülmüştür. Ayrıca protein

oksidasyonunda çeşitli beyin bölgelerinde arttığı ortaya konulmuştur(29).

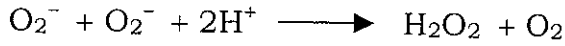
## 2.2. SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller bağımsız olarak bulunabilen, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip ve genellikle oldukça reaktif kimyasal türlerdir. Bu kimyasal yapılar, rastlantısal bir şekilde metabolizmanın yan ürünleri olarak veya belli bir amaca yönelik olarak(Ör. Fagositoz), hücre içerisinde sürekli üretilirler. Serbest radikaller üç yoldan oluşabilirler; (i) normal bir molekülün kovalent bağının homolitik ayrılmasıyla, (ii) normal bir molekülün bir elektron kaybetmesiyle, (iii) normal bir moleküle bir elektron eklenmesiyle (33).

### Süperoksit Anyonu ( $O_2^-$ )

Bu molekül güçlü bir indirgeyicidir ve sitokrom c ve ferrik-EDTA gibi çeşitli demir komplekslerini indirgeyebilmektedir

Süperoksit anyonu enzimatik olmayan spontan dismutasyonun yanı sıra, süperoksit dismutaz enzimi aracılığıyla enzimatik yoldan da ortamdan temizlenmektedir (12, 54).



Süperoksit anyonu, hücre membranlarından, kolay geçemediği için zararı en az olan radikaldir (52) Süperoksit, hidrojen peroksit kaynağı olarak görev yapar.

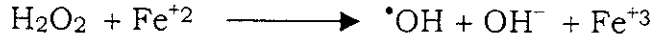
### Hidrojen Peroksit ( $H_2O_2$ )

Düşük elektriksel yükü ve non-iyonize özelliklerinden dolayı hücre membranlarından hızlı bir şekilde geçer. Geçiş grubu metal iyonlarının varlığında yüksek derecede reaktif serbest radikalleri oluşturur (12, 52, 55). Hidrojen peroksit katalaz, glutatyon peroksitaz (selenyum içeren), ve belli bazı peroksitazlar gibi enzimlerin aktivitesiyle hücrelerden temizlenir (12, 33, 34).

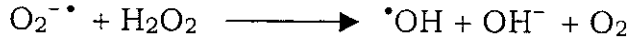
### Hidroksil Radikali( $^*OH$ )

Hidroksil radikali hücrede çeşitli yollardan oluşmasına karşın, önemli iki biyolojik kaynağı vardır;

Fenton reaksiyonu



Haber - Weiss reaksiyonu



### **Diğer Oksidan Ajanlar**

Ozon ve nitrojen oksitleri'nin de oksidan ajanlar olduğu ileri sürülmektedir (12, 56).

### **2.2.1. Serbest Radikallerin Hücrelere Etkisi**

Serbest radikallerin hücrenin temel yapı taşları olan lipidler, proteinler ve karbohidratlar, yanında DNA'da da ciddi hasarlara sebep olduğu belirtilmiştir.

### **Serbest Radikallerin Proteinlerle Reaksiyonu**

Peptid ve protein makromoleküllerinin yapı taşları olan aminoasitler de, serbest radikallerin hedefleri içerisinde. Aminoasitlerin oksidasyonu proteinlerde de fiziksel değişikliklere neden olmaktadır. Bu fiziksel değişiklikler üç gruba ayrılabilir; fragmentasyon, agregasyon ve proteolitik yıkıma duyarlılık (52, 57, 58, 59).

### **Serbest Radikallerin Lipidlerle Reaksiyonu**

Poliansature yağ asitlerinin (PUFAs) oksidatif yıkımı olan lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin poliansature yağ asitlerinin (LH) yan zincirindeki metilenik karbonlardan hidrojen atomu koparmasıyla başlar. PUFA'nın oksidasyonu, bir oksijen alarak çabucak peroksil radikale ( $\text{LOO}^\cdot$ ) dönüşebilen yağ asidi radikalinin ( $\text{L}^\cdot$ ) oluşmasına yol açar (33, 60). Bu peroksil radikali, membrandaki komşu yan zincirlerden hidrojen atomlarını koparıp peroksidatif zincir reaksiyonunu yaymaktadır. Peroksidasyon bir kere başladıktan sonra otokatalitik olarak yayılabilmektedir (33, 60, 61, 62).

Lipid hidroperoksidler de ( $\text{LOOH}$ ) yıkılarak  $\text{LO}^\cdot$ ,  $\text{LOO}^\cdot$  gibi radikaller ve aldehidlerin oluşmasına neden olurlar. Lipid hidroperoksid yıkım ürünleri membran komponentlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmalarına neden olmakta ve membranın bazı fonksiyonlarını değiştirmektedir. Ayrıca, DNA'nın

nitrojen bazları ile reaksiyona girmekte ve mutajenik, genotoksik ve karsinojenik etki göstermektedirler (62, 63).

### **Karbohidratların Peroksidasyonu**

Yapılan çalışmalarda,  $\alpha$ -hidroksialdehid yapıya sahip karbohidratların, metal iyonlarının varlığında hızlı bir şekilde otooksidasyona uğradıkları ve bunun sonucunda dikarbonil bileşikleri ve hidrojen peroksit oluşturdukları belirtilmiştir (52, 64)

### **Genomik ve Hücresel Yapıların Modifikasyonu**

Deoksiribonükleik asid hasarı, radyasyon ve kimyasallar gibi dış etkenlerin yanında, oksijen kaynaklı serbest radikaller gibi iç etkenlerin neden olduğu birçok faktörden kaynaklanmaktadır (52, 54, 65).

## **2.3. ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ**

Serbest radikallerin potansiyel zararlı etkilerini ortadan kaldıran maddelere genel olarak, antioksidan savunma sistemi denmektedir. Oksidatif strese karşı hücresel savunmadan sorumlu antioksidan sistemler, serbest radikaller kadar çeşitlidir (52). Hem hücre içinde hem de hücre dışında oluşan radikallerin zararlı etkileri antioksidan savunma sistemi öğelerinin ortaklaşa çalışmaları sonucu ortadan kaldırılır (48, 49, 50, 51, 52).

Araştırmacılar antioksidan savunma sistemini genel olarak aşağıdaki gibi sınıflandırmışlardır (52, 66, 67);

#### **I. Primer savunma:**

1. Antioksidan enzimler : SOD, CAT ve peroksidazlar.
2. Antioksidan bileşikler : Vitamin E, vitamin C, vitamin A, glutatyon, ürik asit, bilirubin, v s

#### **II. Sekonder savunma:**

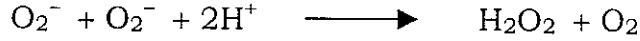
1. Lipolitik enzimler; fosfolipazlar.
2. Proteolitik enzimler; proteazlar, peptidazlar.
3. DNA tamir enzimleri; endonükleaz ekzonükleaz, ve ligaz

## I. Primer savunma

### i) Antioksidan Enzimler:

#### Süperoksit dismutaz (SOD)

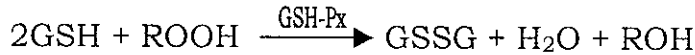
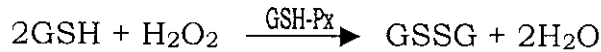
Oksijenli solunum yapan tüm canlılarda bulunur ve temel görevi dismutasyon reaksiyonunu katalizlemektir.



Süperoksit dismutazlar yapılarında bulundurdıkları metal iyonuna göre Bakır/çinko süperoksit dismutaz (Cu/Zn-SOD), Mangan süperoksit dismutaz (Mn-SOD), Demir süperoksit dismutaz (Fe-SOD) olmak üzere 3 sınıfa ayrılmıştır (52).

#### Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)

Birçok canlıda bulunan bu enzim, hücre içinde mitokondrial matriks ve sitozolde bulunur. Glutatyon peroksidaz organik hidroperoksidlerin ve hidrojen peroksid'in indirgenme reaksiyonlarını katalizler (52, 68).



Selenyuma bağımlı ve bağımsız olan iki tipinin bulunduğu belirtilmiştir (52, 62).

#### Katalaz (CAT)

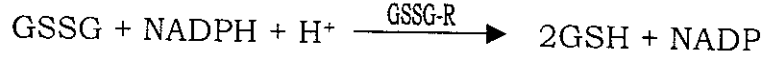
Primer savunma sistemin önemli bir enzimi olan katalaz, temelde  $H_2O_2$ 'in suya ayrışmasını katalizler. (33).



$H_2O_2$  seviyesinin düşük olduğu durumlarda organik peroksidler tercihen peroksidaz tarafından katalizlenirken,  $H_2O_2$  konsantrasyonunun yüksek olduğu koşullarda katalaz tarafından metabolize edilirler (52, 69).

### **Glutasyon redüktaz (GSSG-R)**

Glutasyon redüktaz yükseltgenmiş glutasyonu (GSSG) NADPH ( $\beta$ -nikotinamid adenin dinükleotid)'a bağımlı olarak indirgenmiş glutasyona katalizleyen bir flavoprotein'dir (70,71).



### **ii) Antioksidan Bileşikler:**

Bu antioksidan savunma enzimatik olmayan moleküller tarafından sağlanır.

**Vitamin C (Askorbik asit):** Askorbik asit, bir indirgeyici ve antioksidan ajan olarak,  $\text{O}_2^-$ ,  $\cdot\text{OH}$  ve çeşitli lipid hidroperoksidleriyle doğrudan reaksiyona girer. Buna ek olarak, yükseltgenmiş vitamin E'nin antioksidan özelliklerini yenilemesi en önemli fonksiyonudur (33, 34, 52, 72).

**Vitamin A (Karotenoidler):** Karotenoidler serbest radikalleri ve başta singlet oksijen olmak üzere, reaktif oksijen türlerini temizleyerek lipidleri peroksidasyona karşı korurlar. Özellikle ksantin oksidaz sisteminin oluşturduğu lipid peroksidasyon ürünlerini yakalayarak etkili bir biyolojik antioksidan rolü oynar (52).

**Glutasyon (GSH) :**  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve  $\cdot\text{OH}$  gibi birçok elektrofilik ve yükseltgeyici bileşiklerle etkileşime girerek etkili bir indirgeyici görevi görür. Redükte glutasyon doğrudan süperoksid anyonu, hidroksil radikali ve çeşitli organik radikaller ile reaksiyona girip yükseltgenebildiği gibi, vitamin A gibi çeşitli antioksidanların yükseltgenmiş formdan indirgenmiş forma geçmesinde görev olarak antioksidan etkinlik gösterir (52, 73).

**Diğer antioksidanlar :** Ürik asit, bilirubin, transferrin, ferritin, seruloplazmin, selenyum ve Vitamin E diğer önemli antioksidanlardır.

### **Vitamin E**

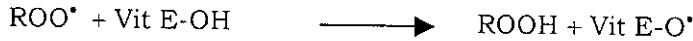
Vitamin E (vit E) doğada en yaygın olarak bulunan lipidde eriyebilir antioksidandır. İzomerleri içerisinde  $\alpha$ -tokoferol antioksidan aktivitesi en yüksek olanıdır. Tüm hücre lipid membranlarında,



hücre içi organellerden membran lipid içeriği fazla olan endoplazmik retikulum ve mitokondri membranlarında bol miktarda bulunur. (12, 33,52).

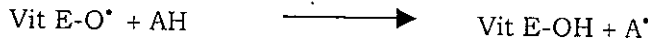
$\alpha$ -Tokoferol merkezi ve periferel sinir sistemlerinde eşit bir dağılım göstermemektedir. Medulla, spinal kordon ve serebellumda diğer bölgelere göre, daha az miktarda vit E bulunmaktadır. Vit E'nin nörolojik rolü ilk olarak 1928'de tespit edilmiştir (74). Kronik vit E eksikliği spinoserebellar dejenerasyonun yanında; halsizlik, ataksi, proprioseptif kayıp, refleks zayıflaması, retinal pigmentasyon, göz hareketlerinin bozulması (ophthalmoplegia) ve miyopati gibi birçok fonksiyon bozukluğuna yol açmaktadır. Ancak çoğunlukla emilim bozukluğu sonucu gelişen bu hasarların, vit E verildiğinde büyük oranda düzelme kaydettiği gözlenmiştir (75,76,77). Yapılan deneylerde vitamin E eksikliğinin insanda bilateral olarak P100 latensini uzattığı gözlenmiş ancak, tedaviden sonra latenslerin düştüğü, görme keskinliğinde ise herhangi bir değişikliğin olmadığı gözlenmiştir (76,78).

Vit E'nin biyolojik membranlarda serbest radikal hasarının ilerlemesini engelleyen zincir-kıran antioksidan fonksiyonu birçok çalışmada gösterilmiştir (32,33,34). Vit E, plazma lipoproteinlerindeki ve biyolojik membranların fosfolipidlerindeki poliansature yağ asitlerini (PUFAs) koruyan güçlü bir peroksil radikali temizleyicisidir. Lipid hidroperoksidlerinin yükseltgenmesiyle oluşan peroksil radikalleri (ROO<sup>\*</sup>), PUFA' lardan (RH) 1000 kat daha hızlı bir şekilde vit E (Vit E-OH) ile reaksiyona girmektedir (34). Tokoferolün fenolik hidroksil grubu organik peroksil radikali ile reaksiyona girerek, organik hidroperoksid ve tokoferoksil radikali oluşturur:



Böylece, vit E lipidlerin otooksidasyonunu engelleyerek zincir-kıran bir antioksidan fonksiyonu üstlenmektedir.

Membranlarda oluşan tokoferoksil radikali (Vit E-O<sup>\*</sup>) lipid çift tabakadan çıkarak sıvı kısma geçer. Burada, vitamin C veya diğer indirgeyicilerle (AH) reaksiyona girer. Vitamin C yükseltgenirken kendisi indirgenmiş haline döner;



Yükseltgenen vitamin C daha sonra metabolik süreçlerden geçerek indirgenir. Bu olgu bir vit E döngüsüne yol açarak antioksidan aktivitenin sürekliliğini sağlar (33, 52).

Doz aşımı durumunda vit E'nin *in vivo* herhangi bir yan etkisine rastlanmamıştır. Ancak bazı *in vitro* deneylerde, düşük

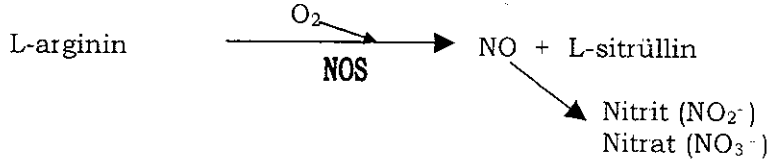
yoğunluklu lipoprotein (LDL)'lerin oksidasyonuna yol açtığı bulunmuştur (79).

## II. Sekonder Savunma

Sekonder savunmanın temel görevi oksidan stresin yarattığı hasarlı ve fonksiyonu bozulmuş çeşitli yapıları ortadan kaldırarak hücrede birikmesini engellemektir. Başlıca; lipolitik ve proteolitik enzimler olmak üzere iki gruba ayrılır (52, 80).

### 2.4. NİTRİK OKSİD

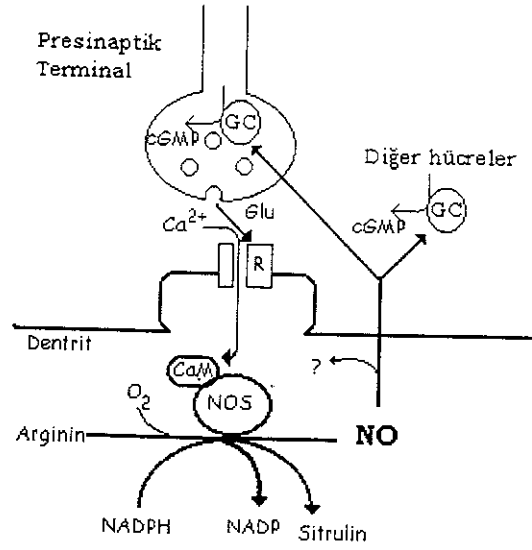
İlk olarak 1987 yılında Furchgott ve arkadaşları, daha önce endotel kaynaklı vazodilatör faktör olarak bilinen ve kan damarlarının gevşemesine sebep olan gizemli molekülün nitrik oksid (NO) olduğunu ortaya çıkarmışlardır (81). Nitrik oksit endotelial hücrelerde, glialarda ve bazı nöronlarda nitrik oksit sentetaz (NOS) tarafından L-arginin amino asidinden sentezlenen paramagnetik bir molekül ve suda eriyebilen bir gazdır.



Sitrüllinin hücre içinde kalıp, NOS tarafından substrat olarak kullanılmak üzere tekrar arginine dönüştürüldüğü, bunun yanında substrat sağlamak için argininin transport mekanizmaları ile hücre içine taşındığı saptanmıştır (82).

Küçük bir molekül olan NO'nun plazmadaki biyolojik aktif konsantrasyonunun 1-100 nM arasında değiştiği ve 3-10 sn'lik bir yarı ömrü olduğu tespit edilmiştir (83, 84, 85). Ayrıca NO'nun çözünabilir bir gaz olduğundan komşu hücrelere, bakterilere ve virüslere diffüzyonla kolayca girdiği ve hemoglobin, metilen mavisi ve süperoksid anyonuyla kısa sürede nötralize edildiği bulunmuştur.

NO'nun etki mekanizması ve kademeleri Şekil 2.6 da gösterilmiştir. Nitrik oksidin en iyi bilinen efektörleri guanilat siklaz ve cGMP olmasına rağmen, G proteinleri, çeşitli enzimler, transkripsiyon faktörleri, taşıyıcılar (transporter) ve iyon kanalları da hedefleri arasında yer almaktadır (82).



**Şekil 2.6.** Merkezi sinir sisteminde NO'nun etki mekanizması (82)  
(Glu:Glutamat)

Vücutta NOS'un iki izoformu bulunur: indüklenebilir NOS (iNOS) ve yapısal (constitutive) NOS (cNOS). Yapısal (c)NOS da, endotel NOS (eNOS) ve nöronal NOS (nNOS) olmak üzere ikiye ayrılır. iNOS kalsiyumdan bağımsız olarak aktive olurken, cNOS'un aktif olması için  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunun artması gerekmektedir (82).

NO yapımında görev alan nitrik oksid sentaz (NOS) enzimi, L-argininin uçtaki guanidin grubunu NO'ya dönüştürür (Şekil 2.6). Tüm NOS'lar homodimeriktir ve her monomerde redüktaz ve oksijenaz protein grubu (domain) içerirler. Redüktaz grubu NOS'un kofaktörleri olan FAD, NADPH ve FMN'yi bağlarken, oksijenaz grubu ise hem ve tetrahydrobiopterin ( $BH_4$ )'i bağlamaktadır. Bu iki grup da kalmodulin aracılığıyla birbirine bağlanır. Bu reaksiyon sırasında  $\omega$ -hidroksil-L-arginin ara bileşiği oluşur. Ayrıca NOS, substratı son ürünler olan NO ve L-sitrülin'i oksidize etmek için moleküler oksijeni kullanır (10, 83, 85). NOS'un L-N<sup>G</sup>-monometil-arginin (L-NMMA), N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin-metil ester (L-NAME) ve N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin (L-NNA) gibi kompetitif inhibitörleri vardır.

İndüklenebilir (i) NOS sentezi, bakteriyel lipopolisakkaridlerin (LPS) veya sitokinlerin (IL-1, IL-2, IL-6, TNF) immün hücrelerinin, özellikle makrofaj ve diğer hücrelerin (endotel hücreleri) yüzeyindeki reseptörleri uarması ile aktif hale gelir. Bu enzim, bütün izoformları için gerekli olan kalsiyum ve kalmodulini içinde barındırdığından sentezlenir sentezlenmez aktif hale gelir. iNOS'un uyarılmasından sonra salınan NO hedef hücrelere diffüze olup, o hücrelerdeki enzimlerin demir-sülfür merkezleriyle birleşir. Bu reaksiyon, mitokondrinin solunum zinciri enzimlerini ve DNA sentez enzimlerini inhibe ederek, viral ve bakteriyel istilacıların, aynı zamanda hücrenin kendisinin de ölümüne sebep olur (10, 83).

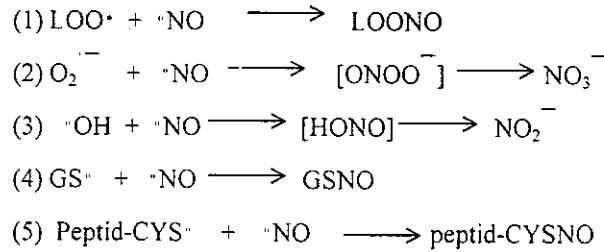
Endotel (e) NOS vasküler endotelyumda bulunan yapısal bir enzimdir. Damarların kolinerjik stimülasyonu, intraselüler serbest kalsiyum konsantrasyonunu artırarak, eNOS'u aktif hale getirir. Oluşan NO, diffüzyon ile düz kaslara geçerek düz kasların gevşemesini sağlar ve platelet agregasyonunu inhibe eder. Kısa süreli bir etkisi vardır (10, 83).

Enzimin üçüncü izoformu olan nöronal (n) NOS, eNOS gibi yapısal bir enzim olup merkezi sinir sistemindeki (MSS) ve otonom sinir sistemindeki birçok nöronda bulunur. nNOS'un beyinde öğrenmeyi ve hafıza oluşumunu düzenlediği ve nörodejeneratif hastalıklarda rol oynadığı bildirilmiştir (10, 81, 83).

NO'nun Paraventriküler çekirdekte (PVN) kortikotropin-salınma hormonu (CRH)'nin salgılanmasını kontrol ettiği gösterilmiştir (46, 83). NO, sadece birçok hipotalamik peptidin salınmasını uyarmakla kalmayıp, inhibitör nörotransmitter olan gamma amino butirik asid (GABA)'in de salınmasını uyarmaktadır. Buna ek olarak NO, medial bazal hipotalamustan norepinefrin ve dopamin salınmasını da inhibe etmektedir (83).

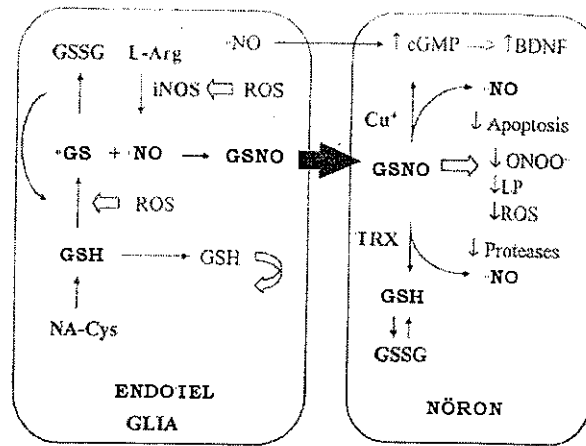
Nitrik oksid ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda, NO'nun serbest bir radikal olduğu, oksijen varlığında NO<sub>2</sub> ve NO<sub>3</sub> gibi çeşitli nitrojen türleri (RNOS) oluşturduğu ortaya konmuştur (Tablo 2.4). Otooksidasyondan oluşan bu reaktif türlere ek olarak NO'nun oksijen radikalleri ve süperoksitle reaksiyona girip, güçlü bir oksidan olan ve bir çok biyolojik molekülü modifiye edebilen peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>)'i oluşturduğu da saptanmıştır (Tablo 2.4). Dolayısıyla NO'nun oluşturduğu serbest radikallerin lipid peroksidasyona yol açarak hücre ölümlerine neden olabileceği ileri sürülmüştür (12, 13, 14). Nitekim, deneysel çalışmalar NO'nun NMDA reseptör-aracılı nörotoksitede ve fokal serebral iskemiden sonra görülen nöron ölümünde de yer aldığını göstermiştir. Yine yapılan deneylerde, spinal kord travmasından sonra dorsal boynuz nöronlarında yüksek düzeyde NOS'a rastlanmıştır. NOS'un inhibisyonu kesilen aksonlarda motonöronal ölümü azaltmaktadır. Bu sonuçlar NO'nun yaralanmadan sonra görülen nöronal ölümden sorumlu olduğunu göstermektedir (86).

Tablo 2.4 Eşlenmemiş elektron Reaksiyonu: NO, lipid, oksijen ve thiol radikallerini temizler (15).



Son yıllardaki çalışmalar ise, NO'nun antioksidan olduğunu, beyin nöronları yanında endotelial hepatik, retinal, gastrik ve

kardiyak hücrelerinde oksidatif hasarı engelleyerek hücreleri koruduğunu ortaya koymuştur. Nitropirosid dışındaki NO donörlerinin, ferrous sitrate, tiyl-demir ve hemoglobin gibi demir komplekslerini bağlayarak fenton tipi reaksiyonları inhibe ettiği ve hidrojen peroksitten OH oluşmasını engellediği gösterilmiştir. OH kısa ömürlü olmasına rağmen, sitotoksik serbest radikalleri oluşturan zincir reaksiyonlarını tetikleyen güçlü bir radikaldir. Ayrıca NO, süperoksit anyonu ve OH radikallerini nitrat ve nitrit gibi nonradikal forma çevirir (Tablo 2.4). Ancak hücre kültürlerinde nitrit ve nitratın çok fazla birikmesi oldukça toksik etkilere sahiptir. Zira bu NO donörlerinin hücrede depolanması, tirosinin nitratlanmasına neden olarak hücre ölümlerine neden olabilirler. Diğer yandan, NO tiol radikallerini (GS ve CYS) aktif S-nitrosothiolere çevirir. Yarı ömrü oldukça uzun olan GSNO'nun GSH'dan 100 kere daha kuvvetli bir antioksidan olduğu, ONOO<sup>-</sup> 'yu detoksifiye ederek nitrata dönüştürdüğü bulunmuştur, ayrıca GSNO'nun demir bileşiklerinin indüklediği fenton reaksiyonlarını baskılayarak lipid peroksidasyonu engellediği gözlenmiştir (Şekil 2.7) (15, 16).



Şekil 2.7 Antioksidatif GSNO yolağı (16)

Bu karşıt bulgular nitrik oksidin iki tarafı keskin bir kılıç gibi değerlendirilmesine neden olmuştur. NO'nun farklı etkilerinin NOS'un izoformlarından kaynaklandığını veya oksidatif stres, reaktif oksijen arabileşiklerinin oluşması ve antioksidan sistemin yetersiz kalması gibi durumlarda ortaya çıktığını iddia eden görüşler bulunmaktadır (10, 18):

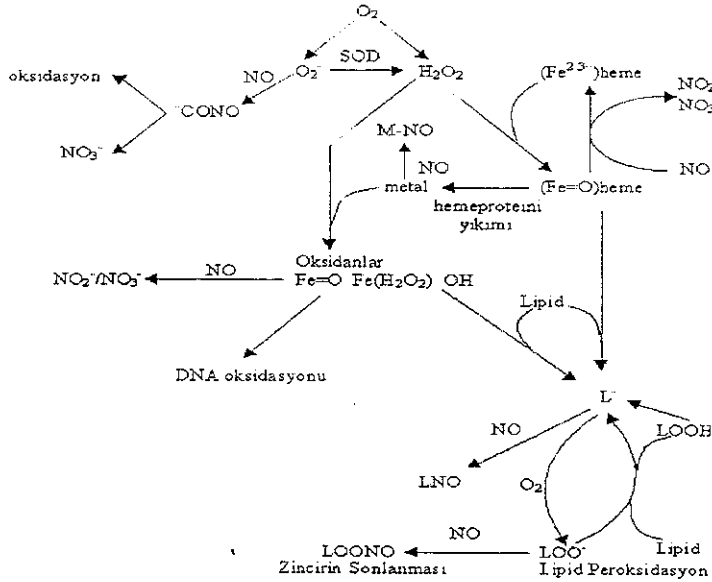
i) eNOS tarafından sentezlenen NO'nun fizyolojik etkilere sahip olduğu, buna karşın iNOS ve nNOS aracılığıyla sentezlenen NO'nun patolojik olabileceği ileri sürülmüştür (10)

ii) NO'nun etkileri arasındaki farkın bu molekülün farklı redox-ilişkili türlerine ve farklı kimyasal aktivitelerine bağlı olduğu iddia edilmiştir. NO fizyolojik ortamda bir serbest radikal olan nitrojen monoksit ( $\text{NO}^\bullet$ ) veya nitrozonyum katyonu ( $\text{NO}^+$ ) formunda bulunur. Bu görüşe göre, eğer dokuda  $\text{NO}^\bullet$  oluşumu daha baskın olursa nitrik

oksid nörotoksik bir etki; fakat, ortamda NO<sup>+</sup> oluşumu daha fazlaysa nöroprotektif bir etki göstermektedir. Nitekim, nitrozonyum katyonunun NMDA reseptörlerini nitrozilleyerek ve inaktif hale getirerek, NMDA-aracılı nörotoksisiteyi inhibe ettiği gösterilmiştir (18, 19).

iii) NO'nun oksidatif etkisinin farklı nitrik oksid donörleri kullanmaktan kaynaklandığı ve bunların bazılarının fizyolojik koşullardaki nitrik oksid salınmasını temsil edemeyeceği ileri sürülmüştür (11, 87).

Bunlara ek olarak, NO'nun iki farklı etkisinin koşullara bağlı olduğu, NO'nun, O<sub>2</sub>'nin arttığı patolojik koşullarda radikal gibi, normal fizyolojik koşullarda ise antioksidan gibi davrandığı vurgulanmıştır. (Şekil 2.8). Bu etkisinin NO ile O<sub>2</sub> arasındaki oranla ifade edilebileceği, bu oranın birden küçük olması durumunda NO'nun oksidan, bire eşit ve büyük olduğu koşullarda ise antioksidan gibi davrandığı görülmüştür (11, 13, 17, 18)

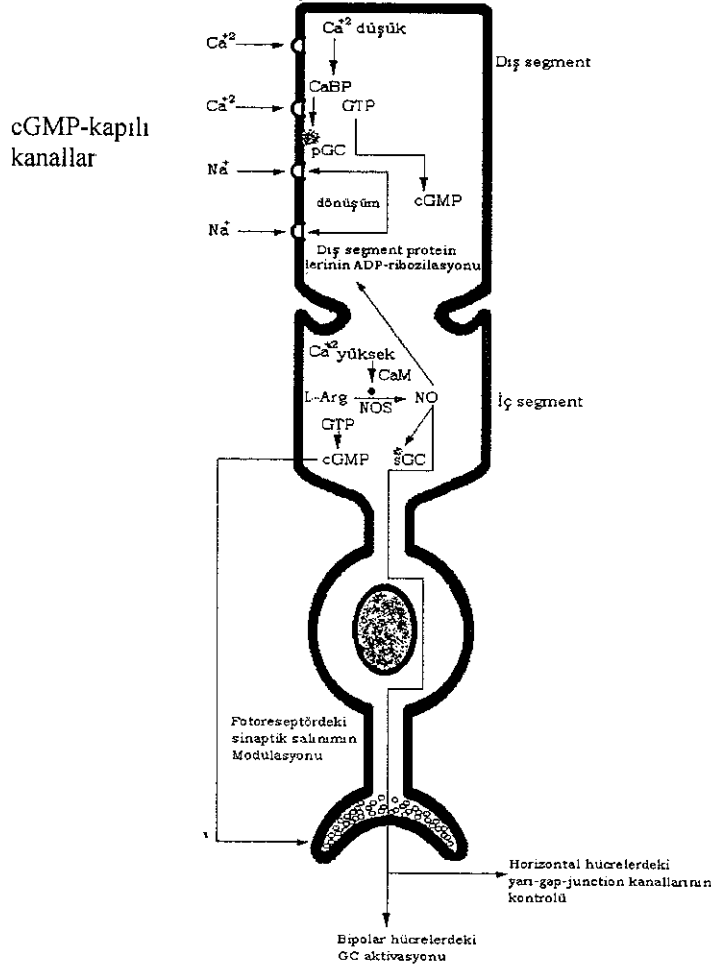


Şekil 2.8. NO'nun koruyucu etki mekanizması (11)

Nitrik oksid görsel sistem de dahil, insan fizyolojisinin hemen her sisteminde rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda, farklı memelilerin retina horizontal, amakrin ve ganglion hücrelerinde nNOS bulunduğu belirlenmiştir. Bunun yanında insan retinal dokularının da yapısal NOS ve iNOS'un mRNA'larını sentezleyebildiği belirlenmiştir (18)

NO'nun fotoreseptörlerde, ışık cevaplarının modifikasyonu ve fotoreseptörlerden bipolar ve horizontal hücrelere sinaptik iletimin modülasyonu gibi iki fonksiyonun olduğu ileri sürülmektedir (18, 19). Dış segmentlerde, ışık uyarını sonucu oluşan Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonundaki düşüş, partiküler guanilat siklaz (pGC)'in

aktivasyonuna yol açar pGC'nin aktivasyonu kalsiyum bağlayıcı protein (CaBP) tarafından düzenlenir. GTP'den cGMP oluşması ışığa bağlı cevabın yenilenmesini sağlar. İç segmentlerde,  $Ca^{2+}$  konsantrasyonundaki artış ve kalmodulin (CaM)'in etkisiyle NOS aktif hale gelir. Sonuçta oluşan NO'nun çözünbilir (soluble) guanilat siklaz (sGC)'in uyarılması ve fotoreseptördeki sinaptik iletimin modülasyonu gibi birçok etkisi vardır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. NO'nun fotoreseptördeki etki mekanizması (19)

NO'nun komşu hücrelere diffüzyonu bipolar hücreleri etkileyebilir (GC aktivasyonu) veya horizontal hücrelerdeki yarı-gap-junction kanallarını kontrol edebilir. Bunun yanında, dış segmentlere diffüze olup dış segment proteinlerinin ADP-ribozilasyonunu uyarabilir (19). Nitrik oksid, görsel sistemin tüm yolağında yer almaktadır. Histolojik çalışmalarda dLGN'ta ve kortikal bölgelerin tüm tabakalarında NOS aktivitesine rastlandığı bildirilmiştir (18).

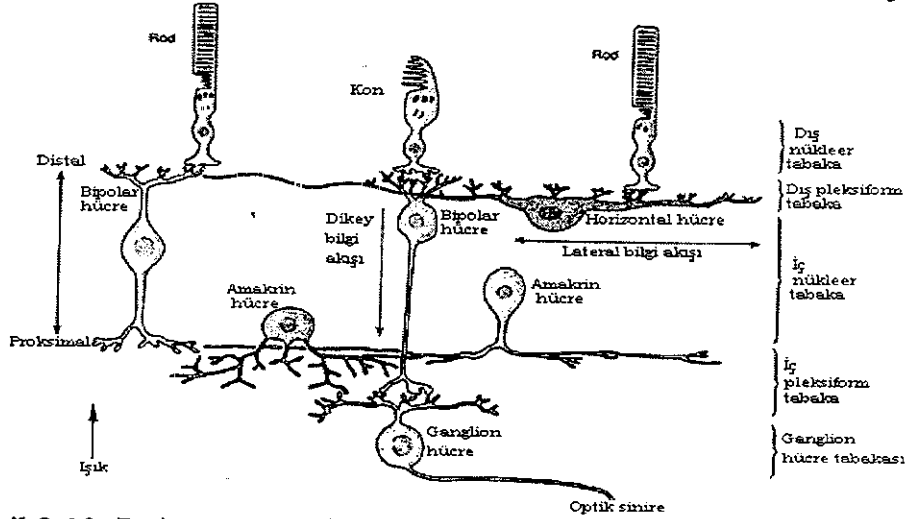
Yapılan bazı çalışmalarda,  $NO^+$ 'un retinada NMDA-kaynaklı akımları düşürdüğü ve nöroprotektif bir etki gösterdiği bildirilmiştir (19). Diğer yandan, başka bir grup araştırmacı nNOS'un retinadaki ekzitotoksistide önemli bir rol oynadığını, buna karşın eNOS'un herhangi bir etkisinin olmadığını ortaya koymuşlardır (88). Bunun yanında,  $NO$ 'nun dejeneratif retinal hastalıklarda ve retinal iskemide patofizyolojik bir rol üstlendiği ve anlamlı olmamakla birlikte VEP latensini uzattığı gözlenmiştir (20,89)

## 2.5. GÖRSEL SİSTEM ve GÖRSEL UYARILMA POTANSİYELLERİ

### 2.5.1. Görsel Sistem

Görsel sistem duyu sistemlerinin en kompleks olanıdır. Görsel sistemde bilginin işlenmesi retinada başlar. Tunica nervosa da denilen retina, göz yuvarlağının arka tarafındaki en iç tabakayı oluşturur. Retina renkli görmeden sorumlu koni hücrelerini ve temel olarak karanlıkta görmeden sorumlu çubuk hücrelerini (basiller) içermesi nedeniyle gözün ışığa duyarlı bölümüdür. Görmenin nöral yolağı çubuk ve koniler ile başlar. Bu fotoreseptörler birbirleriyle ve ikinci düzeydeki nöronlarla etkileşime girerek görsel bilgiyi optik sinir aracılığıyla lateral genikulat çekirdeğe (LGN), oradan da ilgili beyin bölgesi olan görsel kortekse ileten yapılardır (39, 90)

Retinada koni ve çubuklar gibi görme reseptörlerinin dışında Bipolar, horizontal, amakrin, ganglion hücreleri olmak üzere 4 çeşit nöron bulunur (Şekil 2.10). Fotoreseptörler bipolar hücrelerle sinaps



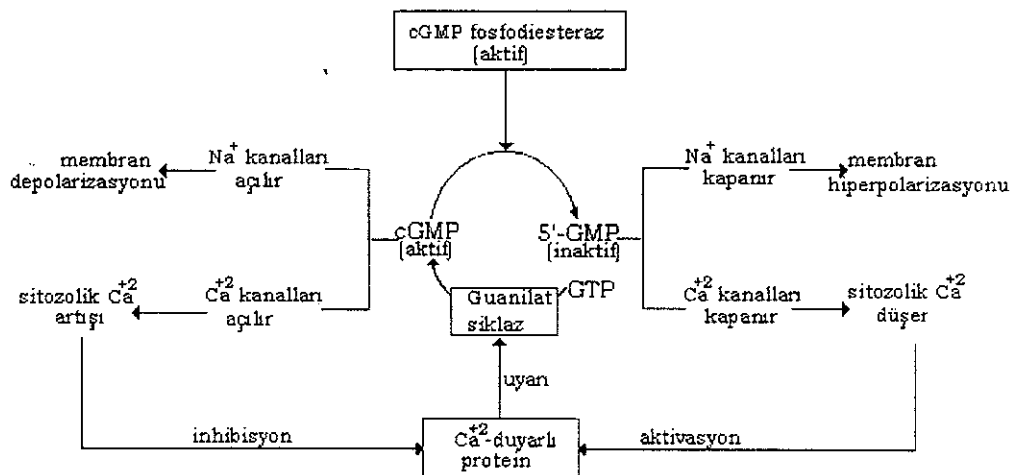
**Şekil 2.10.** Retinanın üç nükleer tabakası üç temel fonksiyonel nöron sınıfı oluşturur; dış nükleer tabakada fotoreseptörler, iç nükleer tabakada internöronlar ve ganglion hücre tabakasında ganglion hücreleri. Dış pleksiform tabakada internöronlar kendi aralarında sinaptik bağlantı yaparken, iç pleksiform tabakada bipolar, amakrin ve ganglion hücreleri bağlantı yaparlar (90)



kurmuşlardır. Bipolar hücreler de retinanın bir bölümünden diğer bölümlerine yatay olarak bilgi aktaran horizontal hücreler ve ganglion hücrelerle sinaps yapmışlardır. Amakrin hücreler ise, bipolar ve ganglion hücreler ile sinaps yaparlar. Fotoreseptörler ışığı absorbe eden pigmentler içerirler (Şekil 2.10).

Retinada biri basillerde (rodopsin) diğerleri konilerde olmak üzere dört farklı fotopigment vardır. Her fotopigment, opsin denilen ve bir kromofor (chromophore) molekülü bağlayan integral proteinlerden birini içerir. Fotopigmentin asıl ışığa duyarlı kısmı olan kromofor, bir vitamin A varyantı olan retinal'dir. Retinal'e gelen ışığı filtre eden opsin her fotopigment için farklıdır. Bu farklı opsinler fotopigmentlerin görünür spektrumun farklı kısımlarında ışığı absorbe etmelerini sağlarlar (39, 90, 91, 92).

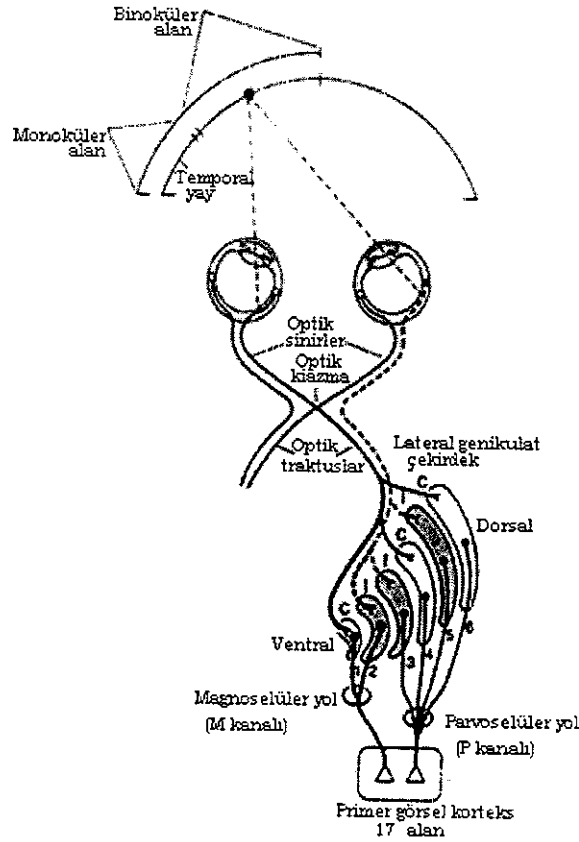
Genel olarak fototransdüksiyon birkaç aşamadan oluşur (93): Işığın emilmesi rodopsindeki 11-cis retinali all-trans konfigürasyonuna çevirir (52) Aktive olmuş rodopsin (metarodopsin II) cGMP fosfodiesteraz (PDE)'i aktif hale getiren G-proteinini (transdusin) etkin hale getirir. (94) Bu enzim siklik GMP'yi hidrolize ederek konsantrasyonunu düşürür. (95) cGMP kapılı kanallar ( $\text{Na}^+$  ve  $\text{Ca}^{+2}$ ) kapanır ve fotoreseptör hiperpolarize hale gelir. Hiperpolarizasyon fotoreseptörün ucuna pasif olarak iletilir ve hücreden nörotransmitter salınmasını düşürür. (33) Daha sonra kalsiyum kanallarının kapanması nedeniyle sitozolik  $\text{Ca}^{+2}$  konsantrasyonundaki düşüş, kalsiyuma duyarlı proteini aktifleştirerek, guanilat siklaz (GC)'a bağlanmasına ve daha fazla cGMP üretilmesine neden olur (Şekil 2.11). Bu da  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Ca}^{+2}$  kanallarının tekrar açılmasını sağlar. Böylece hücreler tekrar dinlenim durumuna döner (39, 96).



**Şekil 2.11.** Çubukların ışığa adaptasyonunda  $\text{Ca}^{+2}$ -duyarlı protein, guanilat siklaz ve kalsiyumun rolü (90).

Bu şekilde oluşan sinyaller en son iki tip olduğu saptanan ganglion hücrelerine ulaşırlar. Bunlardan ilki farklı türde konilerden

gelen yanıtları toplayan, hareket ve üç boyutlu görme ile ilişkili olan büyük ganglion hücreleri (Magno=M), ikincisi ise renk, yapı ve ince detaylarla ilgili olan küçük ganglion hücreleri (Parvo=P)'dir (39, 41, 97). Bu ganglion hücrelerinin aksonları optik sinir liflerini oluşturur ve retinadan aldıkları impulsu merkezi sinir sistemine iletirler. Retinanın nazal yarımından gelen lifler optik kiazmada çaprazlaşarak, temporal yarımından gelen lifler ise optik kiazmada çaprazlaşma yapmadan dorsal lateral genikülat nükleus'a (dLGN) girerler ve sinaps yaparlar. Bu nükleus altı nükleer tabakadan oluşmuştur. 2, 3 ve 5'inci tabakalar sinyalleri retinanın temporal bölgesinden alırken 1, 4 ve 6'ıncı tabakalar sinyalleri karşı gözün nazal retinasından alırlar (92). Ayrıca LGN'da P hücrelerinden sinyalleri alan parvoselüler (3 ve 4 üncü tabakalar), M hücrelerinden sinyalleri alan magnoselüler tabaka (1 ve 2'inci tabakalar) ve bu iki tabaka arasında kalan muhtemelen dendritleri parvoselüler tabakaya uzandığı için, P hücrelerinden sinyaller alan interlaminar tabaka olarak kabaca üç bölge ayırt edilir (Şekil 2.12) (41, 92, 98).



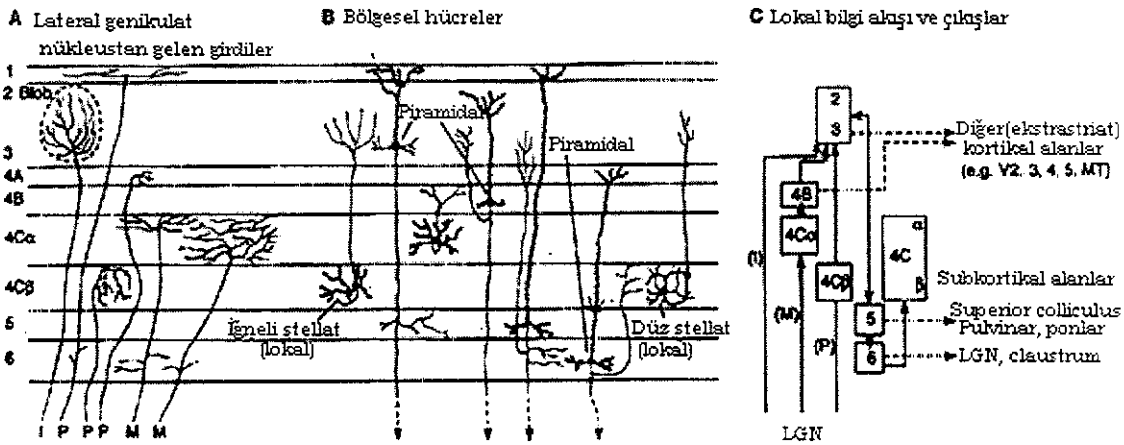
**Şekil 2.12.** Lateral genikülat nükleus; görsel bilginin işlendiği temel subkortikal bölgedir (90)

dLGN iki temel işlev görür.

1) Optik traktusun görsel bilgisini, optik radyasyon (Genikülokalkarin traktus) yolu ile görme korteksine iletmek.

2) Görsel bilgi sinyallerinin ne kadarının kortekse geçeceğini kontrol etmek. Bu işi yaparken iki temel kaynaktan sinyal alır. İlki primer görme korteksinden lateral genikülat'a uzanan kortikofügal lifler, ikincisi ise mezensefalon'un retiküler alanlarından gelen lifler. Bunların uyarımı ile dLGN görsel bilginin kortekse geçişini kontrol eder.

Dorsal lateral genikülat nükleus'tan çıkan görsel bilgi sinyalleri optik radyasyon yolu ile oksipital lob'un kalkarin bölgesindeki primer görme korteksine ulaşır. Bu bölge altı tabakadan oluşmuştur. dLGN'tan gelen aksonlar genellikle 4 üncü tabakada sonlanır. Bu tabakada a, b, c-alfa, c-beta olmak üzere 4 farklı katman ayırt edilir. dLGN'un parvoselüler tabakasından gelen aksonlar katman 4c'nin derin bölgelerinde sonlanırken, magnoselüler tabakadan gelen aksonlar ise genellikle daha yüzeysel bölümlerinde sonlanır (41). Yine dLGN'daki interlaminer alanlardan gelen aksonlar ise, bu bölgede mitokondrial bir enzim olan sitokrom oksidaz'ı bol miktarda içeren ve renk damlaları (blob'lar) adı verilen bölgelerde sonlanırlar. Primer görme korteksinde yer alan bu bölgenin renkli görme ile ilişkili olduğu tesbit edilmiştir (99, 100). Bunlara ek olarak görme liflerinin beynin farklı bölgelerine (Şekil 2.13): (1) Sirkadyen ritmin kontrolünü sağlamak üzere hipotalamusun suprakiazmatik nükleusuna, (2) Gözün odaklanması ve göz bebeğinin ışık refleksini sağlamak için pretektal çekirdeklere, (3) İki gözün hızlı doğrusal hareketlerini kontrol etmek için süperior kollikulusa, (4) Vücudun bazı davranışsal işlevlerini kontrole yardım etmek için talamusun ventral lateral genikülat nükleusuna gittiği gösterilmiştir (92).



Şekil 2.13. Primer görsel korteksin farklı anatomik tabakaları, girişleri ve çıkışları Parvoselüler (P), magnoselüler (M) ve interlaminer (I) (90).

Diğer duyuşal sistemlerin kortikal temsilinde olduğu gibi görme korteksi de primer ve sekonder olmak üzere ikiye ayrılır.

**Primer görme korteksi :** Primer görme korteksi kalkarin fissür alanında her bir korteksin medial bölümünde oksipital kutba doğru uzanır. Bu bölge Brodmann'ın 17'inci kortikal alanı ile aynı yerdedir ve 1. görme alanı ( V-1 ) olarak adlandırılır. Aynı zamanda çizgili görünüşünden dolayı striat korteks de denir (92, 100).

**Sekonder görme korteksi :** Bu alana görsel asosiyasyon alanları da denir. Primer görme korteksinin lateral, anterior, süperior ve inferiorunda uzanır. Görsel anlamların analizi için primer görme korteksinden gelen sinyallerin iletildiği alanlardır. Primer görme korteksini çepeçevre saran Brodmann'ın 18'inci alanı 2.görme alanı (V-2) olarak adlandırılır. Ayrıca V-3, V-4 gibi yarım düzineden fazla uzak sekonder görme alanları vardır (92, 100).

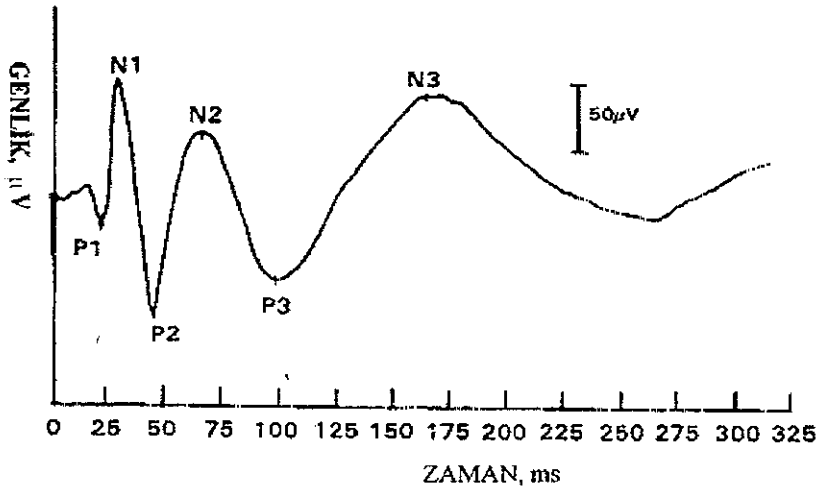
### 2.5.2. Görsel Uyarılma Potansiyelleri

Belirli bir uyarana cevap niteliğinde ortaya çıkan ve beyinden kaydedilen, ölçülebilir elektriksel büyüklüğe "Uyarılma Potansiyeli" veya kısaca EP adı verilmiştir. EP'ler genellikle uyarının cinsine göre sınıflandırılmaktadırlar.

İlk kez 1934 yılında Adrian ve Matthews tarafından tanımlanan görsel uyarılma potansiyelleri (VEPs) herhangi bir görsel uyarı ile oluşturulan EP'lerdir (101). Tek bir EP kaydı, uyarımın beyinin elektriksel aktivitesinde ortaya çıkardığı değişiklikler ile beyinin spontan aktivitesinin (EEG) toplamından oluşmaktadır. Tek bir UP deki dalga ve zirvelerin hangisinin uyarım sonucu meydana geldiğini anlamak çoğu zaman mümkün olmadığından, EEG'nin temizlenmesi ve yalnızca uyarıma ilişkin yanıt potansiyellerinin elde edilmesi gerekmektedir. Bu sorun, uyarılma potansiyellerinin EEG zemin aktivitesinden ayrılmasına olanak veren klasik ortalama yönteminin ilk kez 1954 yılında Dawson tarafından bilgisayara uyarlanmasıyla çözülmüştür (102). Bilgisayar teknolojisinin gelişimine paralel olarak, VEP'ler görsel sistem fizyolojisinin anlaşılması ve görsel yollardaki patolojilerin teşhisi için sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Bugün VEP'ler optik sinir hastalıklarının, kornea lezyonlarının, renk körlüğünün ve alan bozukluklarının teşhisi gibi birçok görsel sistem patolojisinin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (23, 24, 25, 26, 27)

Görsel sistemin elektrofizyolojik bir ölçümü olan VEP'lerde görsel uyarın olarak kısa süreli ve değişik şiddetlerde ışık (flaş) veya şekilli

uyaranlar kullanılır. Flaş ışığının kısa aralıklarla tekrarlanması ile kaydedilen potansiyellere Flaş Uyarılma Potansiyelleri (FVEP) denir. Şekilli uyaran olarak genellikle TV ekranında oluşturulan siyah beyaz karelerden meydana gelen dama tahtası şeklinde uyaranlar kullanılır. Bu şekillerin dönüşümlü olarak yer değiştirmesi ile kaydedilen potansiyellere Patern Değişmeli Görsel Uyarılma Potansiyelleri (PR-VEP) denir. Görsel uyarımı takiben ortaya çıkan dalgalar negatif (N) ve pozitif (P) olarak gösterilmektedirler. Görsel uyarılma potansiyelleri ortaya çıkış zamanlarına göre, üç gruba ayrılarak incelenmiştir (103). Görsel uyarıyı izleyen ilk 10 msn'lik süre içinde oluşan dalgalara "kısa latensli (erken) VEP" ler, görsel uyarıdan sonraki 10 ile 50 msn içinde oluşan dalgalara "orta-latensli VEP" ler, 50 ile 300 msn içinde oluşan dalgalara da "uzun latensli VEP" ler denir (Şekil 2.14). İnsan görsel uyarılma potansiyellerinde çok sayıda bileşen tanımlanmıştır (103). En iyi sınıflandırma; Halliday ve arkadaşları tarafından (103) yapılmıştır. Dalgaların tepe latensleri ve tepeden tepeye genlikleri kullanılan uyarı türüne göre farklılıklar gösterir. Flaş uyarılarla kaydedilen VEP'lerde latensler daha kısa, genlikler daha yüksektir. Kullanılan uyarının türünden başka veriliş sıklığı, süresi, şiddeti, elektrotların yerleşimi, yaş, cinsiyet, vücut sıcaklığı (74, 103, 104) gibi faktörlerde latens ve genlikleri etkiler.



Şekil 2.14. Görsel uyarılma potansiyeli ve bileşenleri.

Yapılan çalışmalarda, VEP'lerin P1 bileşeninin 17. alanın derin tabakalarından kaynaklandığı ve tabaka IV'teki depolarizasyon (EPSPs) sonucu ortaya çıktığı tespit edilmiştir. N1 bileşeninin ise genikulokortikal girişlerin 4 tabakadaki satelit hücrelerini depolarize etmesi sonucu ortaya çıktığı belirlenmiştir (106,107). Bununla birlikte, P2 bileşeninin GABA-aracılı yüzeysel hiperpolarizasyonu (IPSPs) yansıttığı ileri sürülmektedir (107). Diğer yandan, N2 ve N3 bileşenlerinin yine yüzeysel kortikal tabakalardan kaynaklandığı belirtilmiştir. N3 jeneratörlerinin yüzeysel tabakalar

boyunca dik olarak yayıldığı ve bu bileşenin, gövdeleri derin tabakalarda bulunan nöronların apikal dendritleri boyunca oluşan depolarizasyonu yansıttığı ifade edilmiştir(108).

Klinik çalışmalarda PR-VEP'ler tercih edilmektedir. Çünkü bu potansiyeller görsel yol lezyonlarını göstermede daha duyarlı olup, denekler arasında çok fazla değişkenlik göstermezler. Ayrıca, görsel sistemin temel fonksiyonlarından biri de, karşıtlıkları ve sınırları analiz etmek olduğundan, şekilli uyarının bazı özellikleri değiştirilerek daha fazla bilgi elde edilebilmektedir. PR-VEP'ler insanda temel olarak fovea ve konların aktivitesini göstermektedir (28). Ancak, PR-VEP'lerde yaklaşık 100 ms latenste oluşan P100 bileşeninin optik nöropatilerde, retrobulbar nöropatilerde ve multipl sklerozda (27, 74) daha klinik semptomlar ortaya çıkmadan uzaması, bu hastalıkların erken teşhisi yönünden önemli bir parametre olarak kabul edilmesine yol açmıştır.

Flaş uyarılma potansiyelleri insanlarda nadir kullanılmasına karşın, hayvanlarda tercih edilen bir yöntemdir. Özellikle sıçanların görsel sisteminin, insanlarınkine benzemesi nedeniyle, sıçanlardan kaydedilen VEP'lerin toksik ajanların insan sağlığı üzerine olan olumsuz etkilerini yansıtmada iyi bir model olduğu saptanmıştır (28, 109). VEP'lerin nörotoksik çalışmalarda kullanılması, ilk olarak karbonmonooksid'in (CO) merkezi sinir sistemine etkilerinin incelenmesi amacıyla başlamıştır. Bugün bilinen 36 adet nörotoksik maddenin VEP'leri etkilediği tesbit edilmiştir. Bunların içerisinde kurşun, kadmiyum, karbondisülfid, CO, civa, toluen gibi nörotoksik ajanlar yer almaktadır (24, 25, 109, 110). Bunun yanında VEP'in yaşlanmayla birlikte görsel sistemde oluşan değişiklikleri de yansıttığı bildirilmiştir. Yaşlanmayla birlikte VEP latenslerinin uzadığı ve görsel bilginin iletiminin yavaşladığı gözlenmiştir(35).

## GEREÇLER VE YÖNTEMLER

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik, Fizyoloji ve Biyokimya laboratuvarlarında gerçekleştirilen bu çalışmada 3 aylık 120 adet dişi albino sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar herbirinde 10'ar hayvan olmak üzere 12 eşit gruba bölünmüştür. Böylece;

1. Kontrol grubu (K)
2. L-NAME alan kontrol grubu (KL)
3. Vitamin E alan kontrol grubu(KE)
4. Soğuk strese maruz bırakılan grup (S)
5. Soğuk strese maruz bırakılan ve L-NAME alan grup(SL)
6. Soğuk strese maruz bırakılan ve Vitamin E alan grup (SE)
7. Hareketsizlik stresine maruz bırakılan grup (H)
8. Hareketsizlik stresine maruz bırakılan ve L-NAME alan grup (HE)
9. Hareketsizlik stresine maruz bırakılan ve Vitamin E alan grup (HL)
10. Hareketsizlik ve soğuk stresine maruz bırakılan grup (HS)
11. Hareketsizlik ve soğuk stresine maruz bırakılan ve L-NAME alan grup (HSL)
12. Hareketsizlik ve soğuk stresine maruz bırakılan ve Vitamin E alan grup (HSE)

olmak üzere 12 grup oluşturulmuştur.

Soğuk stres Finlay ve ark. (42), hareketsizlik stresi ise Inoue ve ark. yöntemlerine göre (111) gerçekleştirilmiştir.

Soğuk stres: Sıçanlar 15 gün boyunca günde 15 dakika 5 °C'lik soğuk odada bırakılmışlardır.

Hareketsizlik stresi: Hayvanlar 15 gün boyunca örgü tel yardımı ile günde 3 saat hareketsiz bırakılmışlardır.

Hareketsizlik ve soğuk stresi: Soğuk ve hareketsizlik stres modelleri birlikte uygulanmıştır. Soğuk stres 3 saatlik hareketsizlik süresinin son 15 dakikasında uygulanmıştır.

Deney süresince;

- i) KL, SL, HL ve HSL gruplarına 10 mg/kg/gün L-NAME intraperitoneal
- ii) KE, SE, HE ve HSE gruplarına 30 mg/kg/gün vitamin E intramusküler

iii) K, S, H ve HS gruplarına serum fizyolojik intraperitoneal olarak injekte edilmiştir.

15 günlük deney süresince her kafeste birer hayvan olmak üzere sıçanlar, ticari sıçan yemi ve musluk suyu ile beslenmişlerdir. Bu süre boyunca günlük yem, su tüketimleri ve vücut ağırlıklarındaki günlük değişiklikler kaydedilmiştir.

24 saat açlığı takiben eter anestezisi verilerek görsel uyarılma potansiyelleri kayıtlarına geçilmiştir.

### **3.1. GÖRSEL UYARILMA POTANSİYELLERİNİN KAYDEDİLMESİ**

Görsel uyarılma potansiyelleri hafif eter anestezisi altında hayvanların kafalarına yerleştirilen iğne elektrotları (NE-223S, 5mm Nihon Kohden) ile Biopac MP100 Data Acquisition cihazında kaydedilmişlerdir. Aktif ve referans elektrotlar bregmanın 0.5 cm arkasına ve önüne yerleştirilmiştir. Toprak elektrodu ise hayvanların kuyrukları üzerine konulmuştur. Flaş uyarısı Nova-Strobe AB stroboskobu ile hayvanların pupillalarının tümü aydınlatılacak şekilde 15 cm mesafeden uygulanmıştır. Flaş uyarısı saniyede bir kere ve en düşük şiddette (0.1 J) olacak şekilde ayarlanmıştır.

Flaşla oluşturulan görsel uyarılma potansiyelleri (FVEP) sağ ve sol göz olmak üzere monooküler uyarılarak kaydedilmiştir. Deney süresince flaş verilmeyen diğer göz bir pamuk ve karbon kağıdı yardımıyla kapatılmıştır. Bu esnada hayvanların vücut sıcaklıkları ısıtıcı yardımıyla 37 ile 38.5 °C arasında tutulmuştur (104).

Çalışmada kullanılan cihazın amplifikatörünün frekans limitleri 1 Hz-3KHz, kazancı 5000x, analiz zamanı 300 ms olarak ayarlanmıştır. FVEP'ler 100 kez ortalama alınarak kayıtlanmıştır. Kayıt alındıktan sonra FVEP'ler digital olarak kesim frekansı 100 Hz olan alçak geçiren filtre ile işlenmiştir.

VEP'lerin tekrarlanabilirliğini sağlamak amacı ile her kayıt en az iki kez yapılmıştır. izoelektrik çizginin üzerindeki potansiyel tepeleri (pikleri) negatif (N), altındakiler pozitif (P) kabul edilmiştir. Tepe latensleri stimulus artifaktından itibaren milisaniye (ms) birimiyle, birbirini izleyen ters polaritedeki dalgaların genlikleri tepeden-tepeye mikrovolt ( $\mu$ V) birimiyle hesaplanmıştır.

### **3.2. KAN BASINCI ÖLÇÜMLERİ**

Sıçanların kan basınçları MP100 Data Acquisition sistemi ile carotid arter kanülasyonu yapılarak kaydedilmiştir.



### 3.3. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER

Hayvanlar 1 g/kg üretan verilerek anestezi edildikten sonra, Kortikosteron tayini için abdominal aortdan kan alınmıştır. Bu işlemten sonra tiobarbitürik asit reaktif ürünleri (TBARS), nitrit ve GSH-Px ölçümleri için beyin ve retina dokuları çıkarılarak deneye son verilmiştir. Üç kez serum fizyolojikle yıkandıktan sonra beyin ve retina dokularının bir kısmı nitrit ve TBARS ölçümleri için hemen kullanılırken, diğer kısmı GSH-Px analizi yapıncaya kadar Heraeus marka D-7468 Balingen model derin dondurucuda -68 °C'de saklanmıştır. Plazma örnekleri de kortikosteron tayini yapılanaya kadar aynı şekilde muhafaza edilmiştir.

TBARS ve nitrit için ayrılan dokular EDTA'nın sodyum tuzunu içeren potasyum fosfat tamponunda (100 mM, pH: 7.5) homojenize edilmişlerdir. Homojenize edilen dokular +4 °C ve 14.000 rpm'de 10 dakika santrifuj edilmişlerdir.

#### 3.3.1. Doku Thiobarbitürik Asit Reaktif Ürünlerinin (TBARS) Ölçümleri

1 ml distile su içeren tüpe 50 µl doku süpernatantı konulduktan sonra, 1 ml 2-tiobarbitürik asit (TBA, 29 mmol/L) eklenmiştir. Tüp iyice karıştırıldıktan sonra, 1 saat süreyle 95-100°C arasında kaynatılmıştır. Numuneler soğutulduktan sonra 25 µl HCl (5 mol/L) ve 2 ml n-bütanol eklenerek 5 dakika süresince vortekslenmiş, bu işlemi takiben 3000xg'de 10 dakika santrifuj edilerek, bütanol fazı ayrılmıştır. Bütanol ekstraktının floresansı, eksitasyon dalga boyu 525 nm, emisyon dalga boyu 547 nm olarak spektrofloreometre'de (Shimadzu RF-5000) okunmuştur. 1,1,3,3-tetrametoksi-propan standardı aynen numune gibi çalışılarak standart grafiği oluşturulmuştur. Dokuların TBARS miktarı bu grafik yardımıyla hesaplandıktan sonra nmol/g protein olarak saptanmıştır. (112).

#### 3.3.2. Nitrit Tayini

1 ml süpernatant alınarak üzerine 0.5 ml 4-hidroksikumarin (% 0.04) ilave edilmiştir. Karışım 5 dakika buz banyosunda bekletildikten sonra 50 µl sodyumthiosülfat (% 8) eklenmiş ve 5 dakika oda ısısında beklenmiştir. Daha sonra, 0.5 ml NaOH (1.5 M) eklenerek numuneler yine oda ısısında 10 dakika bekletilmişlerdir. Numunelerin floresansı 340 nm eksitasyon ve 453 nm dalga boyları kullanılarak spektrofloreometrede ölçülmüştür. Numunelerin içerdiği

nitrit miktarı standart grafiğinden yararlanarak hesaplandıktan sonra nmol/g protein olarak tayin edilmiştir. (113, 114).

### **3.3.3.Kortikosteron Tayini**

Kortikosteron ölçümünde fare ve sıçanlar için kullanılan Gamma-B<sup>125</sup>I-Kortikosteron RIA kiti kullanılmıştır. Sıçan plazmasından alınan 100 µl örnek <sup>125</sup>I-kortikosteron ve kortikosteron antiserumu ile 4 °C'de 18 saat inkübe edilmiştir. Bu işlemi takiben 100 µl lik ikinci antikor ile oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon yapıldıktan sonra tüpe 1 ml izotonik solusyon eklenerek, 1500xg de 4 °C'de 15 dakika santrifüj yapılmıştır. Daha sonra supernatant atılarak, elde edilen peletin 1 dakika boyunca radyoaktivitesi (Gama-Counter GC-20) sayılmıştır. Kortikosteron miktarı uygun konsantrasyonlarda hazırlanan kortikosteron standartlarına göre ng/ml olarak belirlenmiştir.

### **3.3.4.GSH-Px Enzim Aktivitesi Tayini**

GSH-Px için ayrılan dokular küçük parçalara ayrıldıktan sonra, 5 mM fosfat tamponunda (pH:7.4; 0.5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0.15 M NaCl ) Ti-R Stir-R marka K43 model homojenizatörü ile homojenize edilmişlerdir. Doku homojenatları +4°C'de 20000xg'de 60 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen supernatantdan 50 µl alınarak, 750 µl reaksiyon karışımı (0.3 mM EDTA + 0.1mM NADPH + 0.5 mM glutatyon redüktaz + 0.5 mM NaN<sub>3</sub>) ve 100 µl redükte glutatyon (GSH) içeren birinci tüpe eklenmiştir. Bu tüpe, 100 µl t-bütil hidroperoksit ilave edilerek, spektrofotometrede 37 °C'de 340 nm'de 5 dakika boyunca okuma yapılmıştır. Ayrıca, GSH yerine 100 µl distile su konularak hazırlanan ikinci tüpe de aynen birinci tüpedeki maddeler ilave edilerek okuma işlemi yapılmıştır. GSH-Px aktivitesi U/g protein olarak tayin edilmiştir (115).

### **3.3.5.Protein Tayini**

Protein tayini, albümin standard olarak alınıp Lowry yöntemine (116) göre yapılmıştır.

### 3.4. İSTATİKSEL İŞLEM

İstatistiksel değerlendirme SPSS paket programı kullanılarak yapılmıştır. Parametrelerin sağ-sol ve grup farklılıkları "Varyans Analizi (ANOVA)" ile incelenmiştir. İkili grupların karşılaştırılmasında ise, "Tukey's HSD" testi kullanılmış ve sonuçlar, ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

## **BULGULAR**

### **4.1. Genel Görünüm**

Deney süresince, K ve KL gruplarında bulunan sıçanların genel görünüm ve davranışlarında herhangi bir farklılık görülmemekle birlikte, strese maruz kalan hayvanların gergin oldukları ve daha hızlı hareket ettikleri dikkati çekmiştir. Diğer yandan, vitamin E alan grupları (KE, SE, HE, HSE) oluşturan hayvanların diğer hayvanlara göre tüylerinin daha parlak ve sağlıklı oldukları gözlenmiştir.

### **4.2. Besin Tüketimi**

2 haftalık deney süresi boyunca tüm grupların günlük yem tüketimleri takip edilmiş, bulgular 100 gram vücut ağırlığı esas alınarak g/gün olarak değerlendirilmiştir.

Tüm grupların besin tüketimleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bir farklılığın olmadığı görülmüştür (Tablo 4.1).

### **4.3. Ağırlık Değişimi**

Bütün gruplardaki hayvanların ağırlıklarının deney süresince arttığı, ancak ağırlık değişimlerinin gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir (Tablo 4.1)

### **4.4. Kan Basıncı**

L-NAME alan gruplarda bulunan hayvanların, kan basıncı değerlerinin kontrollerine göre anlamlı bir fark göstermediği gözlenmiştir.

### **4.5. Plazma Kortikosteron Sonuçları**

Plazma kortikosteron değerlerinin bütün deney gruplarında kontrole göre anlamlı olarak yükseldiği görülmüştür (Tablo 4.2, Şekil.4.1).

**Tablo 4.1.** Kontrol ve deney grubu hayvanlarının günlük yem tüketimleri ve ağırlık değişimleri.

GRUPLAR	Günlük Yem Tüketimi (g/gün/100g)	Başlangıçtaki Vücut Ağırlığı (g)	Son Vücut Ağırlığı (g)
Kontrol (K)	7.82±1.01	225,00±23,93	241,67±22,50
Kontrol L-NAME (KL)	7.27±0.88	231,67±15,28	260,00±19,54
Kontrol Vit E (KE)	7.03±0.91	230,00±25,94	240,00±24,12
Soğuk Stresi (S)	7.07±0.53	235,00±24,31	246,67±25,35
Soğuk Stresi L-NAME (SL)	7.46±0.80	220,00±30,41	232,22±39,62
Soğuk Stresi Vit E (SE)	7.06±0.81	210,00±31,97	230,00±32,66
Hareketsizlik Stresi (H)	7.89±1.13	220,91±23,86	227,27±31,97
Hareketsizlik Stresi L-NAME (HL)	8.12±0.74	237,27±29,36	253,64±24,61
Hareketsizlik Stresi Vit E (HE)	7.92±0.91	215,34±25,05	240,45±22,50
Hareketsizlik-Soğuk Stresi (HS)	7,98±1.23	217,46±21,25	225,52±22,34
Hareketsizlik-Soğuk Stresi L-NAME (HSL)	8.16±0.83	251,21±29,47	270,32±35,24
Hareketsizlik-Soğuk Stresi Vit E (HSE)	7,56±0,94	237,26±32,15	262,91±32,48

Kortikosteron düzeylerinin L-NAME alan stres gruplarında KL grubuna göre önemli ölçüde arttığı saptanmıştır. Stres grupları kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında L-NAME'in sadece SL grubunda kortikosteron düzeyini önemli ölçüde yükselttiği, diğer stres gruplarında ise herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Diğer yandan stres grupları kendi kontrol grupları ile karşılaştırıldığında vitamin E'nin kortikosteron düzeylerini bütün stres gruplarında önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir.

#### **4.6. Nitrit Sonuçları**

Beyin ve retina nitrit değerleri Tablo 4.3 de verilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında beyin nitrit seviyelerinin bütün stres gruplarında, retina nitrit seviyelerinin ise sadece H grubunda önemli ölçüde arttığı izlenmiştir. Diğer yandan, beyin ve retina nitrit değerlerinin KL ve KE gruplarında kontrole göre anlamlı olarak azaldığı görülmüştür.

Stres grupları kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında, L-NAME ve Vit E'nin bütün stres gruplarında beyin ve retina nitrit değerlerini farkedilir düzeyde düşürdüğü gözlenmiştir.

L-NAME alan stres grupları karşılaştırıldığında beyin nitrit değerleri arasında önemli bir farklılık görülmemiştir. Ancak, HL ve HSL gruplarında retina nitrit düzeylerinin SL grubuna göre daha düşük olduğu dikkati çekmiştir.

Diğer yandan, stres grupları içerisinde, Vit E'nin en fazla HSE grubunu etkilediği izlenmiştir. Ayrıca, Vit E'nin HE grubunu SE grubuna göre daha fazla etkilediği bulunmuştur.

#### **4.7. GSH-Px Enzim Aktivitesi Sonuçları**

Beyin ve retina GSH-Px enzim aktiviteleri Tablo 4.4 de sunulmuştur. İstatistiksel değerlendirme sonucunda beyin ve retina GSH-Px aktivitelerinin kontrole göre S grubunda arttığı, H grubunda ise azaldığı tespit edilmiştir. Bunun yanında, beyin ve retina GSH-Px aktivitelerinin HS grubunda da kontrole göre arttığı görülmüş, ancak retina GSH-Px aktivitesi için bu artışın anlamlı olmadığı göze çarpmıştır.

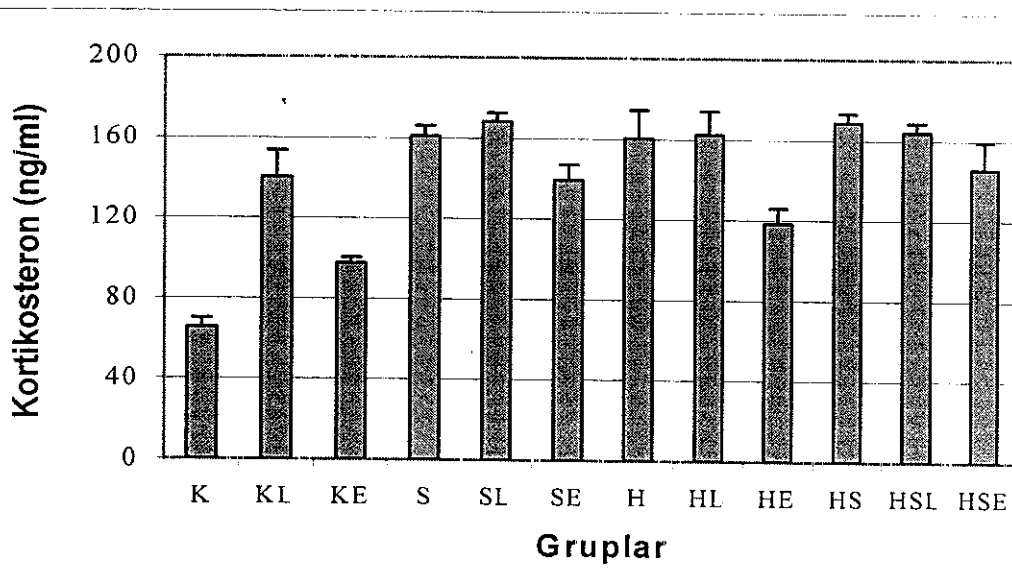
L-NAME'in beyin ve retina GSH-Px düzeylerini kontrole göre KL grubunda anlamlı olarak düşürdüğü, SL ve HSL gruplarında ise önemli ölçüde arttırdığı görülmüştür. Ayrıca, kontrol ile karşılaştırıldığında L-NAME'in HL grubunda beyin GSH-Px

**Tablo 4.2.** Kontrol ve deney grubu hayvanlarının plazma kortikosteron değerleri

GRUPLAR	Kortikosteron (ng/ml)
Kontrol (K)	2.24±0.18
Kontrol L-NAME (KL)	1.68±0.43 K <sup>#</sup>
Kontrol Vit E (KE)	1.53±0.48 K <sup>*</sup>
Soğuk Stresi (S)	2.55±0.25 K <sup>#</sup>
Soğuk Stresi L-NAME (SL)	1.80±0.27 K <sup>*</sup> , S <sup>*</sup>
Soğuk Stresi Vit E (SE)	1.31±0.11 K <sup>*</sup> , S <sup>*</sup>
Hareketsizlik Stresi (H)	2.64±0.13 K <sup>*</sup>
Hareketsizlik Stresi L-NAME (HL)	1.87±0.19 K <sup>#</sup> , H <sup>*</sup>
Hareketsizlik Stresi Vit E (HE)	1.45±0.42 K <sup>#</sup> , H <sup>*</sup>
Hareketsizlik-Soğuk Stresi (HS)	2.50±0.09 K <sup>#</sup>
Hareketsizlik-Soğuk Stresi L-NAME (HSL)	1.52±0.12 K <sup>*</sup> , HS <sup>*</sup>
Hareketsizlik-Soğuk Stresi Vit E (HSE)	1.55±0.23 K <sup>*</sup> , HS <sup>*</sup>

(<sup>#</sup> p<0.005 ; <sup>\*</sup> p<0.001)

Not : Fazla grup olması nedeniyle istatistiksel farklılıkların belirtilmesi için grup kısaltmaları kullanılmıştır. Örneğin SL grubunda, K, KL, S gibi grup kısaltmaları bu grubun o gruplara göre istatistiksel yönden farklı olduğunu gösterir.



**Şekil 4.1.** Kontrol ve deney hayvanlarının plazma kortikosteron düzeyleri

**Tablo 4.3.** Kontrol ve deney grubu hayvanlarının beyin ve retina nitrit değerleri.

GRUPLAR	Beyin Nitrit nmol / g protein	Retina Nitrit nmol / g protein
Kontrol (K)	2.24±0.18	1.68±0.27
Kontrol L-NAME (KL)	1.68±0.43 K <sup>#</sup>	0.97±0.16 K <sup>#</sup>
Kontrol Vit E (KE)	1.53±0.48 K <sup>*</sup>	0.93±0.05 K <sup>#</sup>
Soğuk Stresi (S)	2.55±0.25 K <sup>#</sup>	1.82±0.23
Soğuk Stresi L-NAME (SL)	1.80±0.27 K <sup>*</sup> , S <sup>*</sup>	1.05±0.11 K <sup>#</sup> , S <sup>*</sup>
Soğuk Stresi Vit E (SE)	1.31±0.11 K <sup>*</sup> , S <sup>*</sup>	0.81±0.13 K <sup>*</sup> , S <sup>#</sup>
Hareketsizlik Stresi (H)	2.64±0.13 K <sup>*</sup>	1.94±0.12 K <sup>#</sup>
Hareketsizlik Stresi L-NAME (HL)	1.87±0.19 K <sup>#</sup> , H <sup>*</sup>	0.78±0.11 K <sup>*</sup> , SL <sup>#</sup> , H <sup>*</sup>
Hareketsizlik Stresi Vit E (HE)	1.45±0.42 K <sup>#</sup> , H <sup>*</sup>	0.67±0.17 K <sup>*</sup> , KE <sup>#</sup> , SE <sup>#</sup> , H <sup>*</sup>
Hareketsizlik-Soğuk Stresi (HS)	2.50±0.09 K <sup>#</sup>	1.83±0.12
Hareketsizlik-Soğuk Stresi L-NAME (HSL)	1.52±0.12 K <sup>*</sup> , HS <sup>*</sup>	0.85±0.10 K <sup>*</sup> , SL <sup>#</sup> , HS <sup>*</sup>
Hareketsizlik-Soğuk Stresi Vit E (HSE)	1.55±0.23 K <sup>*</sup> , HS <sup>*</sup>	0.45±0.05 K <sup>*</sup> , KE <sup>*</sup> , SE <sup>*</sup> , HE <sup>*</sup> , HS <sup>*</sup>

(<sup>#</sup> p<0.01 ; \* p<0.005)

Not : İstatistiksel karşılaştırmalar için gerekli açıklamalar Tablo 4.2 de verilmiştir



aktivitesini anlamlı olarak arttırdığı, retina GSH-Px aktivitesini ise önemli ölçüde düşürdüğü gözlenmiştir.

L-NAME alan stres grupları kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında L-NAME'in retina ve beyin GSH-Px değerlerini SL grubunda anlamlı ölçüde azalttığı, HL grubunda ise önemli düzeyde artırdığı tespit edilmiştir.

Vit E'nin kontrole göre tüm gruplarda beyin GSH-Px düzeylerini etkilemediği, retina GSH-Px düzeylerini ise sadece HE grubunda önemli ölçüde düşürdüğü saptanmıştır.

Stres grupları kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında, istatistiksel değerlendirme Vit E'nin retina ve beyin GSH-Px değerlerini SE grubunda azaltırken, HE grubunda artırdığını ortaya koymuştur. Buna ilaveten, Vit E'nin HE grubuna göre sadece HSE grubunda beyin GSH-Px aktivitesini önemli derecede azalttığı izlenmiştir.

#### **4.8. Doku Thiobarbitürik Asit Reaktif Ürünleri (TBARS) Sonuçları**

Beyin ve retina TBARS değerleri Tablo 4.5 de sunulmuştur. Beyin ve retina TBARS değerlerinin bütün stres gruplarında kontrol grubuna göre önemli olarak arttığı saptanmıştır.

Stres grupları kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında L-NAME'in her üç stres grubunda da beyin ve retina TBARS düzeylerini anlamlı ölçüde düşürdüğü izlenmiştir. Diğer yandan kontrol ile mukayese edildiğinde L-NAME 'in beyin TBARS düzeyini KL grubunda bariz olarak arttırdığı dikkati çekmiştir.

Vitamin E'nin bütün stres gruplarında kontrollerine göre beyin ve retina TBARS değerlerini önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. Ancak Vit E'nin sadece KE grubunda retina TBARS değerini kontrole göre anlamlı olarak azalttığı göze çarpmıştır.

Stres grupları kontrolle karşılaştırıldığında, retina TBARS düzeylerinin her üç stres modelinde de aynı oranda arttığı izlenirken, beyin TBARS değerlerinin en fazla hareketsizlik stresinde arttığı görülmüştür. Diğer yandan, stres grupları kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında L-NAME ve Vit E'nin beyin ve retina TBARS değerlerini azaltıcı etkisinin de en fazla hareketsizlik stresinde olduğu gözlenmiştir.

**Tablo 4.4.** Kontrol ve deney grubu hayvanlarının beyin ve retina GSH-Px değerleri .

GRUPLAR	Beyin GSH-Px mU / mg	Retina GSH-Px mU / mg
Kontrol (K)	54.41±2.92	5.04±0.48
Kontrol L-NAME (KL)	44.52±3.21 K*	2.80±0.16 K*
Kontrol Vit E (KE)	56.16±4.02	5.36±0.10
Soğuk Stresi (S)	62.33±2.05 K*	6.05±0.15 K*
Soğuk Stresi L-NAME (SL)	59.12±3.42 K#, KL*, S#	5.24±0.28 KL*, S#
Soğuk Stresi Vit E (SE)	57.27±1.31 S#	5.12±0.61 S#
Hareketsizlik Stresi (H)	47.39±3.52 K#, S*	2.28±0.06 K*, S*
Hareketsizlik Stresi L-NAME (HL)	59.05±4.25 K#, KL*, H*	4.22±0.21 K#, KL*, SL*, H*
Hareketsizlik Stresi Vit E (HE)	52.31±4.54 KE#, SE#, H#	4.89±0.43 K#, KE#, H*
Hareketsizlik-Soğuk Stresi (HS)	63.47±2.22 K#, H*	5.34±0.67 H#
Hareketsizlik-Soğuk Stresi L- NAME (HSL)	60.73±0.79 K*, KL*	5.63±0.37 K#, KL*, SL#, HL*
Hareketsizlik-Soğuk Stresi Vit E (HSE)	55.33±1.82 HS*	5.17±0.27 KE#

(# p<0.01 ; \* p<0.005)

Not : İstatistiksel karşılaştırmalar için gerekli açıklamalar Tablo 4.2 de verilmiştir

**Tablo 4.5.** Kontrol ve deney grubu hayvanlarının beyin ve retina TBARS değerleri.

GRUPLAR	Beyin TBARS nmol/g protein	Retina TBARS nmol/g protein
Kontrol (K)	2.31±0.11	2.02±0.60
Kontrol L-NAME (KL)	5.50±1.28 K*	2.22±0.52
Kontrol Vit E (KE)	1.76±0.70	1.03±0.06 K#
Soğuk Stresi (S)	4.10±0.55 K*	2.92±0.16 K#
Soğuk Stresi L-NAME (SL)	3.64±0.57 K#, KL*, S#	1.95±0.09 S#
Soğuk Stresi Vit E (SE)	2.66±0.53 KE#, S*	1.52±0.45 KE#, S#
Hareketsizlik Stresi (H)	5.59±1.14 K*, S#	2.91±0.38 K#
Hareketsizlik Stresi L-NAME (HL)	3.27±0.47 K#, KL*, H*	1.21±0.43 K#, KL#, SL#, H*
Hareketsizlik Stresi Vit E (HE)	1.79±0.59 SE#, H*	1.31±0.24 K#, H*
Hareketsizlik-Soğuk Stresi (HS)	4.06±0.51 K*, H#	2.52±0.14 K#, S#, H#
Hareketsizlik-Soğuk Stresi L-NAME (HSL)	2.87±0.42 K#, KL*, SL#, HS*	1.31±0.31 K#, KL*, SL#, HS*
Hareketsizlik-Soğuk Stresi Vit E (HSE)	2.26±0.58 KE#, HS*	1.18±0.23 K#, HS*

(# p<0.005 ; \* p<0.002)

**Not :** İstatistiksel karşılaştırmalar için gerekli açıklamalar Tablo 4.2 de verilmiştir

#### 4.9. VEP Sonuçları

VEP'ler sağ ve sol gözler flaş uyararı ile ayrı ayrı uyarılarak monoküler olarak kaydedilmiştir. Sekiz grup için elde edilen VEP'lere ait birer örnek Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te sunulmuştur.

VEP parametrelerinin sağ-sol ve grup farklılıkları varyans analizi (one-way ANOVA) ile değerlendirilmiştir. VEP'lerin latens ve genlikleri karşılaştırıldığında aynı grup için sağ ve sol VEP'ler arasında fark gözlenmemiş, ancak gruplar arasında farklar olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, daha sonraki istatistiksel analizler sağ ve sol gözden kaydedilen VEP parametrelerinin ortalaması alınarak yapılmış ve değerlendirilmiştir.

VEP'lerin latens ve genliklerinin ortalama değerleri, standart sapmaları ve Tukey testi sonuçları Tablo 4.6 ve Tablo 4.7'de görülmektedir. Stres grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her üç stres grubunda da VEP'lerin tüm bileşenlerinin latenslerinin önemli düzeyde uzadığı görülmüştür.

L-NAME'in kontrol ile karşılaştırıldığında KL grubunda tüm VEP bileşenlerini anlamlı biçimde uzattığı görülmüştür. L-NAME'in stres grupları kontrolleri ile karşılaştırıldığında, SL grubunda P<sub>1</sub>, N<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> ve P<sub>3</sub> bileşenlerinin latenslerini, HL ve HSL gruplarında ise tüm VEP bileşenlerinin latenslerini anlamlı olarak kısalttığı saptanmıştır.

Bunun yanında, Vit E'nin kontrole göre KE ve stres gruplarını etkilememekle birlikte, stres grupları kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında, bütün stres gruplarında tüm VEP bileşenlerinin latenslerini önemli ölçüde kısalttığı bulunmuştur.

Tepeden-tepeye genlik değerleri incelendiğinde; P<sub>2</sub>N<sub>2</sub> genliğinin KL ve tüm stres gruplarında kontrol grubunun genlik değerine göre önemli ölçüde düştüğü izlenmiştir. Buna ilaveten, bütün stres gruplarında P<sub>2</sub>N<sub>2</sub> genlik değerlerinin kontrollerine göre önemli olarak arttığı tespit edilmiştir. Diğer genlik değerlerinde ise gruplar arası bir farklılık gözlenmemiştir (Tablo4.7).

**Tablo 4.6.** Kontrol ve deney gruplarından kaydedilen VEP'lerin tepeden-tepeye latens değerlerinin ortalama ve standart sapmaları ( $p<0.01$ )

GRUPLAR	P <sub>1</sub> (ms)	N <sub>1</sub> (ms)	P <sub>2</sub> (ms)	N <sub>2</sub> (ms)	P <sub>3</sub> (ms)
Kontrol (K)	18.52±1.53	31.21±1.35	46.46±2.07	70.84±0.84	98.74±4.26
Kontrol L-NAME (KL)	27.34±0.72 K*	38.14±1.87 K*	55.04±2.01 K*	78.64±3.61 K*	118.76±3.74 K*
Kontrol Vit E (KE)	19.34±2.34	30.12±2.78	45.34±3.05	69.21±1.22	101.34±4.21
Soğuk Stresi (S)	24.12±2.75 K#	36.02±2.38 K#	52.76±2.98 K#	74.24±1.52 K#	112.47±2.85 K#
Soğuk Stresi L-NAME (SL)	21.35±1.99 K#, KL*, S#	33.05±2.04 KL#, S#	48.74±2.81 K#, KL*, S#	72.25±2.04 KL*	104.32±5.32 KL*, S#
Soğuk Stresi Vit E (SE)	20.05±1.22 S#	31.87±3.02 S#	45.92±1.97 S*	69.71±1.27 S#	100.42±4.21 S*
Hareketsizlik Stresi (H)	26.48±0.98 K*	39.01±2.42 K*, S#	54.23±1.87 K*	79.52±2.63 K*, S*	120.34±3.65 K*, S#
Hareketsizlik Stresi L-NAME (HL)	24.71±0.63 K*, KL#, SL#, H#	36.21±2.34 K, SL, H	50.21±2.23 K#, KL#, H#	75.37±1.32 K#, H#	106.62±4.21 K#, KL*, H*
Hareketsizlik Stresi Vit E (HE)	19.47±1.63 H*	30.33±2.21 H*	46.21±1.92 H*	69.81±2.36 H*	99.47±5.32 H*
Hareketsizlik -Soğuk Stresi (HS)	23.44±1.32 K*, H*	36.78±1.03 K#	53.32±1.21 K*	75.14±2.34 K#, H#	110.23±4.23 K*, H#
Hareketsizlik -Soğuk Stresi L-NAME (HSL)	20.01±0.72 K#, KL*, HL#, HS#	32.14±1.47 KL*, HL#, HS#	48.31±2.11 KL*, HS#	72.21±1.01 KL#, HL#, HS#	104.32±2.49 K#, KL*, HS#
Hareketsizlik -Soğuk Stresi Vit E (HSE)	19.12±1.11 HS#	30.97±1.22 HS#	46.22±2.41 HS*	70.47±1.73 HS#	102.21±3.41 HS#

(#  $p<0.01$  ; \*  $p<0.005$ )

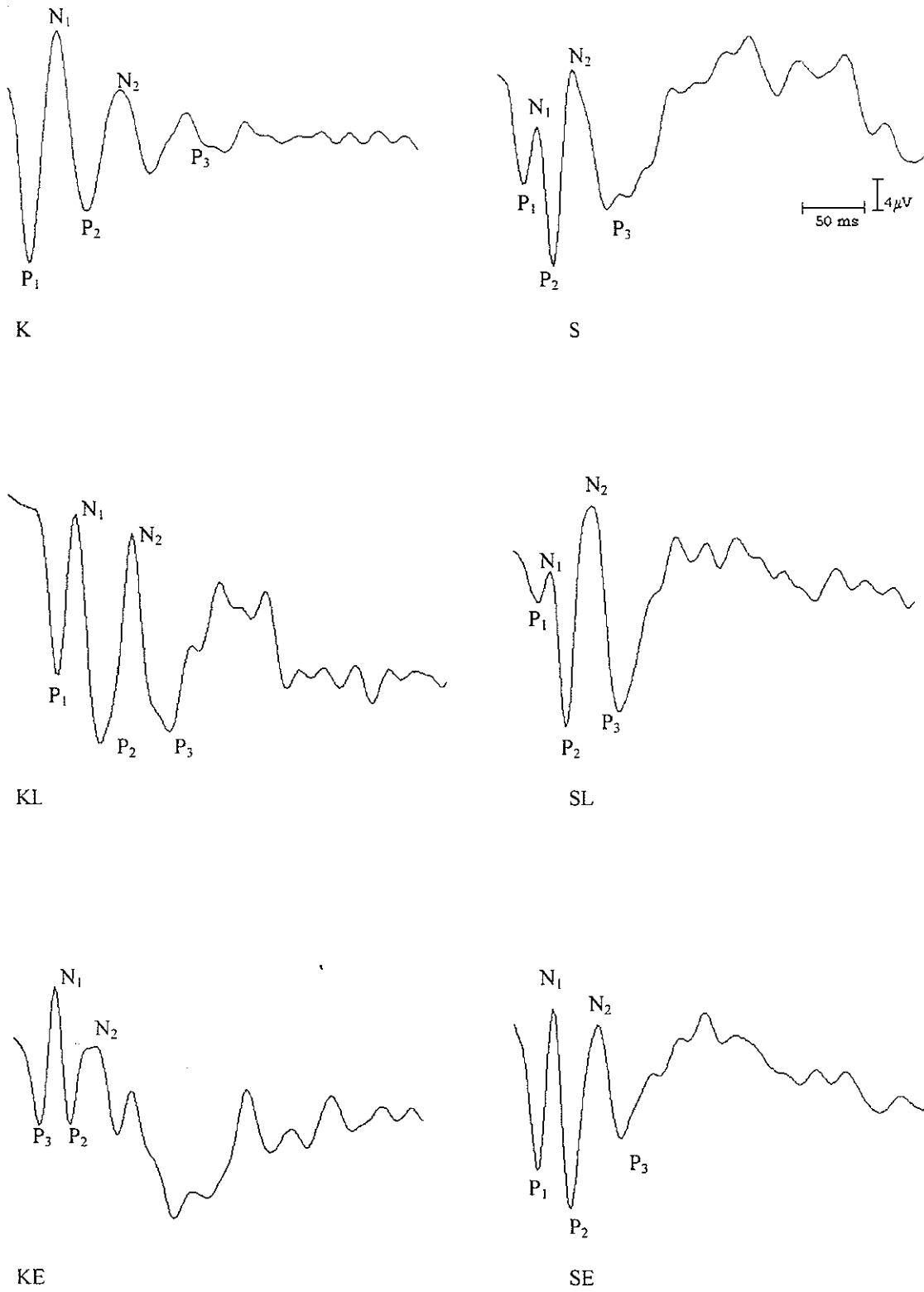
Not : İstatistiksel karşılaştırmalar için gerekli açıklamalar Tablo 4.2 de verilmiştir

Tablo 4.7. Kontrol ve deney grupları için gözlenen görsel uyarılma potansiyellerindeki tepeden-tepeye genlik değerlerinin ortalama ve standart sapmaları.

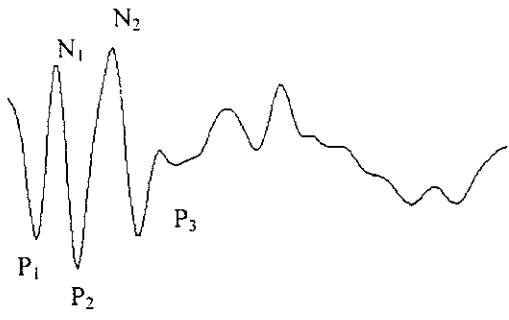
GRUPLAR	P <sub>1</sub> N <sub>1</sub> (μV)	N <sub>1</sub> P <sub>2</sub> (μV)	P <sub>2</sub> N <sub>2</sub> (μV)	N <sub>2</sub> P <sub>3</sub> (μV)
Kontrol (K)	4.25±1.23	5.09±2.01	7.26±3.12	9.68±3.12
Kontrol L-NAME (KL)	4.82±2.24	5.44±3.26	3.38±2.61 K <sup>#</sup>	12.84±5.07
Kontrol Vit E (KE)	5.12±2.10	6.67±3.78	7.67±3.94	10.62±2.18
Soğuk Stresi (S)	4.73±2.81	5.57±2.56	4.22±2.92 K <sup>*</sup>	8.21±3.14
Soğuk Stresi L-NAME (SL)	4.46±2.32	5.87±2.54	6.56±2.30	7.49±4.80
Soğuk Stresi Vit E (SE)	5.05±1.97	6.21±3.87	7.23±2.21 S <sup>#</sup>	8.07±4.50
Hareketsizlik Stresi (H)	5.73±2.89	6.98±3.12	3.83±2.61 K <sup>#</sup>	6.92±3.21
Hareketsizlik Stresi L-NAME (HL)	5.21±2.34	4.97±3.08	4.22±2.12 K <sup>*</sup>	8.42±2.32
Hareketsizlik Stresi Vit E (HE)	5.89±3.14	5.47±2.12	6.21±2.23 H <sup>*</sup>	8.97±4.51
Hareketsizlik-Soğuk Stresi (HS)	5.47±2.17	5.24±1.89	4.02±2.36 K <sup>*</sup>	7.78±3.01
Hareketsizlik-Soğuk Stresi L-NAME (HSL)	5.36±2.82	6.01±2.72	5.24±3.18	9.22±3.26
Hareketsizlik-Soğuk Stresi Vit E (HSE)	5.75±3.74	5.21±2.23	6.67±2.33 HS <sup>*</sup>	10.02±3.74

(<sup>#</sup> p<0.005 ; <sup>\*</sup> p<0.05)

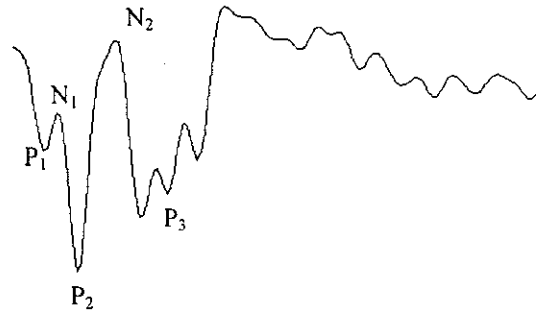
Not : İstatistiksel karşılaştırmalar için gerekli açıklamalar Tablo 4.2 de verilmiştir.



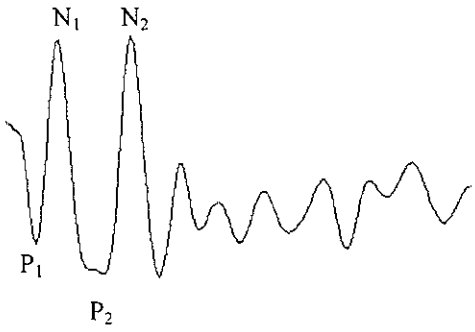
Şekil 4.2. Kontrol ve deney gruplarından kaydedilen VEP'ler ve bileşenleri



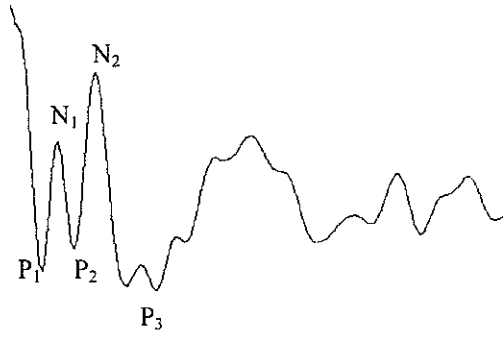
H



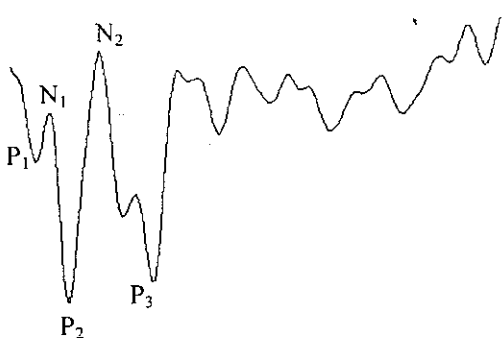
HS



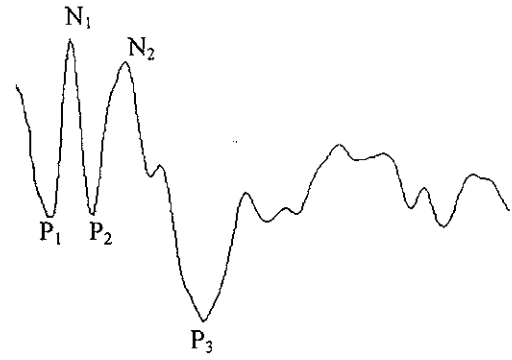
HL



HSL



HE



HSE

Şekil.4.3. Kontrol ve deney gruplarından kaydedilen VEP'ler ve bileşenleri



## TARTIŞMA

Stresin fizyolojik ve davranışsal bir takım değişikliklerle birlikte, lipid peroksidasyonu artırdığı (6, 7, 8) ve nörotransmitter sistemlerini etkilediği (2,3,47,117) çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Stresin, en çarpıcı etkisini HPA ekseninde göstererek böbreküstü bezlerinden glukokortikoidlerin salınımına neden olduğu bilinmektedir (42, 118). Bütün bu etkilerin tetiklenmesine neden olan CRH artışında, NO'nun önemli bir rolünün olabileceği ileri sürülmektedir. Diğer yandan, görsel sistemde de bulunan NO'nun radikal olduğunu gösteren yayınların (14, 120, 121, 122) yanısıra, antioksidan olduğunu ileri süren çalışmalarda (11,15,16,17) söz konusudur. Dolayısıyla, bu bilgiler strese oluşması beklenen görsel sistem değişikliklerinde NO'nun ve lipid peroksidasyonun rollerinin olabileceğini düşündürmektedir. Bu amaçla hazırlanan deneysel protokolümüzde NOS inhibitörü ve antioksidan kullanılarak literatürde henüz bilinmeyen bu soru aydınlatılmaya çalışılmıştır.

NO sentezini inhibe etmek amacıyla L-NAME verilmiştir. Kronik NOS inhibisyonunun hipertansiyon ve glomeruloskleroz'un yanısıra merkezi sinir sistemi hasarlarına da yol açtığı saptanmıştır (123). Örneğin 6 ay L-NAME alan gruplarda inme(stroke)'nin görülme sıklığının %100 olduğu ve 11 ay alan gruplarda ise %79 oranında motor fonksiyon bozukluklarının geliştiği gözlenmiştir (123). Literatürde daha yüksek dozda kullananlar da bulunmakla birlikte (90, 124), bu bulgular ve önceki deneysel çalışmalara (90, 125) dayanarak L-NAME'in dozu 10 mg/kg/gün olarak seçilmiştir. Nitekim, yapılan kan basıncı ölçümlerinde bu dozun sıçanlarda hipertansif bir etki göstermediği saptanmıştır.

Stresin etki mekanizmasında lipid peroksidasyonun önemli rolü olduğunu ifade eden çalışmaların ışığı altında, stresin oluşturduğu görsel sistem değişikliklerini önlemek amacıyla 30 mg/kg/gün dozunda antioksidan vitamin E kullanılmıştır. Seçtiğimiz dozaj bazı araştırmacılarla (126, 127) uygunluk içerisinde olmakla birlikte, 150-300 mg/kg/gün gibi yüksek dozda vitamin E kullanılan çalışmalar da mevcuttur.

Stres grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, besin tüketimi ve ağırlık artışı yönünden herhangi bir farklılık göstermemişlerdir. Ayrıca Vit E ve L-NAME alan stres grupları da kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık görülmemiştir (Tablo 4.1).

Her üç stres grubunda da kortikosteron düzeylerinin kontrole göre anlamlı düzeyde artması, stresin en önemli göstergelerinden birinin plazma kortikosteron seviyelerinin artışı olduğunu bildiren çalışmaları (42, 118) destekler niteliktedir. Diğer yandan L-NAME'in

kontrollerine göre KL ve soğuk stres grubunda kortikosteron düzeylerini artırdığı saptanmıştır. Daha önceki çalışmalarla (128, 129, 130) paralellik gösteren bu bulgumuz, L-NAME'in NO'nun CRH üzerindeki inhibitör etkisini ortadan kaldırarak bu etkisini oluşturabileceğini ortaya koymuştur. Ayrıca bu sonucumuz, soğuk stresi ile hareketsizlik stresinde L-NAME'in farklı etkilerinin olabileceğini ima etmektedir. Nitekim L-NAME ile epinefrin arasındaki ilişki dikkate alındığında, soğuk streste sempatik sistemin hareketsizlik sistemine göre daha aktif olması bu farklılığın nedeni olabilir (19).

Vit E'nin stres grupları kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında her üç stres grubunda da kortikosteronu düşürdüğü, kontrole göre ise KE grubunda da yükselttiği gözlenmiştir. Bu sonuç, streste kortikosteron yükselişinde serbest radikallerin de rolü olabileceğini ortaya koymuştur. Nitekim, stresle ilgili daha önceki çalışmalarda (9, 131, 132) vit E'nin plazma kortikosteroid düzeylerini düşürdüğü saptanmıştır.

NO oksijen aracılığıyla kolaylıkla nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) ve nitrat ( $\text{NO}_3^-$ )'a yükseltgenen yarı ömrü çok kısa olan bir moleküldür. Bu nedenle biyolojik dokularda doğrudan ölçülmesi zordur. Son yıllarda anında ölçüm yapan sensörler geliştirilmesine rağmen, NO yıkım ürünü olan nitriti ölçmeye dayanan dolaylı yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda NO indeksi olarak nitrit kullanılmıştır.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında beyin nitrit seviyelerinin bütün stres gruplarında, retina nitrit seviyelerinin ise sadece H grubunda anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. Bu bulgumuz stresin NOS'u indüklediğini gösteren daha önceki çalışmalarla uyum içerisindedir. (133,134,135,136)

Beyin ve retina nitrit değerlerinin L-NAME verilen gruplarda kontrollerine göre önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur. Literatürle de (124, 137, 138, 139) uyumlu olan bu bulgularımız nitrit tayininin NO seviyesini belirlemede uygun bir yöntem olduğunu göstermektedir. Beyin ve retina nitrit düzeylerinin, Vit E verilen gruplarda da anlamlı ölçüde düştüğü görülmüştür. Bu konu ile ilgili çalışmalar, antioksidan bir bileşik olan Vit E'nin oksidan bir radikal olan  $\text{NO}_2^-$ 'i ortamdan temizlediğini tespit etmişlerdir (138,140,141,142). Dolayısıyla, bulgumuz bu çalışmalarla uygunluk içerisindedir.

Beyin ve retina GSH-Px aktivitelerinin kontrole göre soğuk streste arttığı, hareketsizlik stresinde ise azaldığı görülmüştür. Bu bulgumuz literatürle uyum içerisindedir (143,144,145). Bunun yanında, soğuk ve hareketsizlik stresinin sadece beyin GSH-Px'ini kontrole göre arttırdığı izlenmiş, ancak literatürde bununla ilgili bir bilgi bulunamamıştır. L-NAME'in kontrollerine göre bu enzimi, KL ve SL gruplarında düşürürken, HL grubunda ise arttırdığı gözlenmiştir.

Diğer yandan, L-NAME'in hareketsizlik+soğuk stresinde bu enzim üzerine herhangi bir etkisi görülmemiştir. Vit E'nin ise kontrollerine göre retina ve beyin GSH-Px düzeylerini SE grubunda düşürürken, HE grubunda arttırdığı göze çarpmıştır. Ancak Vit E'nin, HSE grubunda HS'ye göre sadece beyin GSH-Px aktivitesini azalttığı saptanmıştır. Bu sonuçlarımız, stres modelleri arasında mekanizma yönünden bir farklılık olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Beyinde ve retinada serbest radikallerin hedefleri içerisinde yer alan poliansature yağ asitlerinin bol miktarda bulunması, bu dokuları oksidatif hasara daha duyarlı hale getirmektedir. Bu nedenle de, serbest radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldıracak çeşitli antioksidan mekanizmalar söz konusudur. Stresin mekanizması tam bilinmemekle birlikte, bir takım değişikliklere paralel olarak lipid peroksidasyonun arttığı (6,7,8) ve bazı antioksidan enzimlerin azaldığı (8, 9) bilinmektedir. Stres gruplarının TBARS düzeylerinde görülen istatistiksel artış, lipid peroksidasyonun arttığını gösteren önemli bir belirteçtir. Ancak, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, TBARS değerinin en fazla hareketsizlik stresinde arttığı gözlenmiştir. Bu stres modelinde GSH-Px'in ve glutatyonun azaldığı (7,8,145), soğuk streste ise arttığı (143, 144) dikkate alındığında bu beklenen bir sonuçtur. Ayrıca Vit E ve L-NAME'in de lipid peroksidasyonu bu grupta daha fazla azaltması, soğuk stres ile hareketsizlik streslerinin mekanizmalarının farklılığına bağlanabilir.

Yarı ömürlerinin kısa, konsantrasyonlarının düşük ve reaktif olmaları serbest radikallerin *in vivo* şartlarda ölçülmesini zorlaştırmaktadır. Bu yüzden, oksidan stresin oluşturduğu ikincil ürünlerin ölçülmesine dayanan dolaylı yöntemler geliştirilmiştir. Lipid peroksidasyon indeksi olarak kabul edilen malonil dialdehid (MDA)'i ölçmeye dayalı yöntem kullanılmakla birlikte, biyolojik örneklerde uygulanması bazı sorunlar teşkil etmektedir. Çünkü, thiobarbitürik asit lipid peroksidasyon son ürünü olan MDA dışında diğer bileşiklerle de (aminoasitler, şekerler, lipid oksidasyon ürünleri) etkileşime girmektedir. Dolayısıyla, birçok araştırmacı tarafından peroksidasyon indeksi olarak MDA yerine thiobarbitürik asit reaktif ürünleri (TBARS) adının kullanılması önerilmektedir (56, 146). TBARS yöntemi, ölçülen ürünlerin çoğunluğunu MDA teşkil ettiği için ve çok basit ve hızlı olması nedeniyle tercih edilen bir yöntemdir (147, 148).

Kontrolleri ile karşılaştırıldığında, NOS inhibitörü L-NAME'in KL grubunda lipid peroksidasyonu artırırken, bütün stres gruplarında azalttığı saptanmıştır. Bu sonucumuz, NO'nun normal fizyolojik koşullarda antioksidan gibi, patolojik bir durum olan streste ise, radikal olarak davrandığını ortaya koymuştur. Bu karşıt bulgu, NO'nun farklı koşullarda paradoksal etki göstermesiyle açıklanabilir. Çeşitli çalışmalarda, NO'nun farklı etkilerinin; *i*) NOS'un izoformlarına, *ii*) bu molekülün farklı redoks ilişkili türlerine,

iii) oksidatif strese ve antioksidan sistemin zayıflaması gibi faktörlere bağlı olabileceği ileri sürülmüştür.

i) eNOS tarafından sentezlenen NO'nun fizyolojik, iNOS ve nNOS aracılığıyla sentezlenen NO'nun patolojik olabileceği ileri sürülmüştür. ii) Fizyolojik koşullarda NO serbest radikal olan NO veya NO<sup>+</sup> şeklinde bulunmaktadır. Eğer dokunun redoks durumu NO oluşumuna uygun ise nörotoksik bir etki oluşurken, NO<sup>+</sup> oluşumuna elverişli olması NMDA reseptör aktivitesini baskılayarak nöroprotektif bir etki göstermektedir (19, 20). ii) NO<sub>2</sub> ve NO<sub>3</sub> gibi çeşitli reaktif oksijen türlerine ilaveten, NO, O<sub>2</sub> ile reaksiyona girerek güçlü bir oksidan olan peroksinitriti oluşturmaktadır (14). Bu durumda da, lipid radikalleri ile reaksiyona girebilecek NO miktarı azalmaktadır. Ancak ortamda SOD konsantrasyonu yüksek ise, peroksinitrit oluşumu önlenmektedir. Ayrıca ortamda GSH'ın bulunması oksidatif stresi engelleyen güçlü bir antioksidanın (GSNO) oluşmasını sağlamaktadır. GSNO'nun, ONOO'yu detoksifiye ederek nitrata dönüştürdüğü gibi, demir bileşiklerinin indüklediği Fenton reaksiyonlarını baskılayarak lipid peroksidasyonu engellediği gösterilmiştir (15, 16). Dolayısıyla, NO'nun radikal veya antioksidan davranışı koşullara bağlı olarak değişmektedir. Zira ortamda çok fazla süperoksid iyonu bulunması halinde NO'nun lipid peroksidasyona neden olduğu, süperoksid iyonunun az olduğu durumlarda ise antioksidan etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu etkinin NO ile O<sub>2</sub><sup>-</sup> arasındaki oranla ifade edilebileceği, bu oranın birden küçük olması durumunda NO'nun oksidan, bire eşit veya büyük olduğu durumlarda antioksidan gibi davrandığı öne sürülmüştür (11, 13, 17, 18). Sonuç olarak, daha önceki çalışmalara paralel olarak, NO'nun radikal veya antioksidan davranışının koşullara bağlı olarak değiştiği, yaptığımız bu çalışmada da ortaya konulmuştur.

Diğer yandan Vit. E verilen tüm gruplarda lipid peroksidasyonun azaldığı tespit edilmiştir. Bu bulgumuz Vit E'nin lipid peroksidasyonu önleyici etkisini teyit etmiştir (9, 149).

Çeşitli kimyasal ajanların ve toksik maddelerin görsel sistem üzerindeki etkilerini inceleyen birçok araştırma yapılmıştır (24, 25, 110, 150). Ancak, görsel sistemde bol miktarda bulunan ve görsel mekanizmanın her aşamasında önemli bir rolü olduğu bilinen NO'nun görsel sistem üzerindeki etkisi konusunda çok az yayın olmasının yanında, konuyu NO'nun stresle ilişkisi yönünden inceleyen bir çalışmaya da rastlanmamıştır. Dolayısıyla; NO'nun ve farklı stres modellerinin görsel sistemde oluşturacağı değişikliklerdeki rolünü ve lipid peroksidasyonla olan ilişkisini araştırmak için planlanan bu projemizde, elektrofizyolojik parametrelerden biri olarak görsel uyarılma potansiyelleri tercih edilmiştir. VEP'ler görsel sistemin fonksiyonel araştırılmasında ve optik yol patolojilerinin değerlendirilmesinde kullanılan duyarlı ve güvenilir bir yöntemdir.

Özellikle P<sub>100</sub> latensinin optik yol patolojisine paralel olarak uzadığı dolayısıyla bu parametrenin klinik amaçla kullanılabileceği birçok çalışmada vurgulanmıştır (27,28). Ayrıca, sıçanların görsel sisteminin insanlara benzer olması nedeniyle, sıçanlarda yapılan böyle bir çalışmanın insan görsel sisteminin incelenmesi yönünden iyi bir model olduğu da belirtilmiştir (28, 109).

Kontrol ile karşılaştırıldığında, her üç stres grubunda da tüm VEP bileşenlerinin uzadığı gözlenmiştir. Bu sonuç, stresin görsel sistemi önemli derecede etkilediğini ortaya koymuştur. Bunun yanında, stres grupları kontrolleri ile karşılaştırıldığında, her üç stres modelinin VEP'ler üzerindeki etkilerinin aynı olması, görsel sistemin de aynı oranda etkilenebileceğini işaret etmiştir. Kontrollerine göre L-NAME'nin KL grubunda tüm VEP latenslerini önemli ölçüde uzatırken, stres gruplarında kısalttığı dikkati çekmiştir. Bu bulgumuz iki önemli noktayı açıklığa kavuşturmuştur. Birincisi, daha öncede belirtildiği gibi, NO'nun normal fizyolojik koşullarda antioksidan, stres gibi patolojik koşullarda ise radikal gibi davrandığını göstermiştir. İkincisi, lipid peroksidasyonun VEP latenslerinin uzamasında önemli rolünün olduğunu ima etmiştir. Vit E'nin bütün stres gruplarında VEP bileşenlerinin latenslerini kontrol grubuna yaklaştırması, bu noktayı ayrıca destekleyen önemli bir parametredir.

VEP'lerin tepeden-tepeye genliklerinin, stresten çok fazla etkilenmediği görülmüştür. Zira, stres grupları kontrolleri ile karşılaştırıldığında sadece P<sub>2N2</sub> genliğinin düştüğü bulunmuştur. Diğer yandan, Vit E'nin bu bileşeni bütün stres gruplarında kontrollerine göre artırdığı, L-NAME'in ise herhangi bir etkisinin olmadığı saptanmıştır.

#### Çalışmamızın sonuçları şöylece özetlenebilir:

1. Her üç stres modelinin VEP parametrelerini aynı şekilde etkilediği görülmüştür.
2. Streste oluşan VEP değişikliklerinde lipid peroksidasyonun önemli rolünün olabileceğine işaret etmiştir.
3. Streste lipid peroksidasyonun önemli ölçüde arttığını bildiren çalışmaları desteklemiştir.
4. L-NAME ve Vit E'nin streste ortaya çıkan VEP değişikliklerini düzelttiği tespit edilmiştir.
5. Stresin etkilerinde NO'nun rolünün olduğu ortaya konmuştur.
6. NO'nun fizyolojik koşullarda antioksidan, patolojik koşullarda ise serbest radikal gibi davrandığını gösteren çalışmaları teyit etmiştir.
7. GSH-Px aktivitesinin stres modeline bağlı olarak değiştiği saptanmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Bowers, G., Cullinan, W.E., Herman, J.P. Region-specific regulation of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA expression in central stress circuits. *J Neurosci*, 18(15):5938-5947, 1998
2. Chaouloff, F. Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems. *Brain Res. Rev.*, 18:1-32, 1993
3. Gonzalez, AM, Pazos, A. affinity changes in muscarenic acetylcholinereceptors in the rat brain following acute immobilization stress: an autoradiographic study. *Euro J. Pharma.*, 214:261-268, 1992.
4. Hellrigell, ET, D'Mello, AP. The effect of acute, chronic, and chronic inintermittent stress on the central noradrenergic system. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 57:207-214, 1997.
5. Stillman, M.J., Shukitt-Hale, B., Coffey, B.P., Levy, A., Lieberman, H.R. In vivo hippocampal acetylcholine release during exposure to acute stress. *Stress* 1(4): 191-200, 1997
6. Baraboi, V.A. The role of lipid peroxidation in the mechanism of stress. *Fiziol Zh.* 35(5): 85-97, 1989
7. Liu J., Mori A. Stress, aging, and oxidative damage. *Neurochem. Res.* 24(11):1479-1497, 1999
8. Liu, J., Wang, X., Shigenaga, M.K., Yeo, H.C., Morri, A., Ames, B.N. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. *FASEB J.* 10: 1532-1538, 1996
9. Ohtsuka, A, Ohtani, T, Horiguchi, H, Kojima, H, Hayashi, K: Vitamin E reduces glucocorticoids-induced growth inhibition and lipid peroxidation in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, 44(2):237-247, 1998.
10. Green, I.C. and Chabrier, P.E.: Nitric oxide: from basic research to clinical application. *DDT.*, 4(2): 47-49, 1999.
11. Wink, D.A., Cook, J.A., Pacelli, R., DeGraff, W., Gamson, J., Liebmann, J., Krishna, M.C., Mitchell, J.B.: The effect of various nitric oxide-donor agents on hydrogen peroxide toxicity: A direct correlation between nitric oxide formation and protection. *Arch. Biochem. Biophys.*, 331(2): 241-248, 1996.
12. Gutteridge, J.M.C.: Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-Biol. Interact.*, 91: 133-140, 1994.
13. O'Donnell, V.B., Chumley, P.H., Hogg, N., Bloodsworth, A., Darley-Usmar, V.M., Freeman, B.A.: Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: Kinetics of reaction with lipid peroxy radicals and comparison with  $\alpha$ -tocopherol. *Biochemistry.*, 36: 15216-15223, 1997.

14. Rubbo, H, Radi, R, Trujillo, M, Telleri, R, Kalyanaraman, B, Barnes, S, Kirk, M, Freeman BA: Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.*, 269(42):26066-26075, 1994.
15. Chiueh, CC: Neuroprotective properties of nitric oxide. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 890:301-311, 1999.
16. Chiueh, CC, Rauhala, P: The redox pathway of S-nitrosoglutathione, glutathione and nitric oxide in cell to neuron communications. *Free Rad. Res.*, 31:641-650, 1999.
17. Kashii, S, Mandai, M, Kikuchi, M, Honda, Y, Tamura, Y, Kaneda, K, Akaike, A.: Dual actions of nitric oxide in N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity in cultured retinal neurons. *Brain Res.*, 711: 93-101, 1996
18. Cudeiro, J., Rivadulla, C.: Sight and insight-on the physiological role of nitric oxide in the visual system. *Trends Neurosci.*, 22: 109-116, 1999.
19. Goldstein, I.M., Ostwald, P., Roth, S.: Nitric oxide: A review of its role in retinal function and disease. *Vision Res.*, 36(18): 2979-2994, 1996.
20. Oku, H., Yamaguchi, H., Sugiyama, T., Kojima, S., Ota, M., Azuma, I.: Retinal toxicity of nitric oxide released by administration of a nitric oxide donor in the albino rabbit. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 38: 2540-2544, 1997.
21. Fujii, E., Wada, K., Ishida, H., Yoshioka, T., Muraki, T. Role of endogenous nitric oxide in the nitric oxide donor-induced plasma extravasation of mouse skin. *Eur. J. Pharmacol.* 37(2):219-222, 1983.
22. Parks, D.J., Cheung, M.K., Chan, C.C., Roberge, F.G.: The role of nitric oxide in uveitis. *Arch. Ophthalmol.*, 112: 544-546, 1994
23. Chiappa, K.H.: *Evoked potentials in clinical medicine* New York: Raven Press; 1983.
24. Otto, D.A., Hudnell, H.K., Boyes, W.K., Janssen, R., Dyer, R.: Electrophysiological measures of visual and auditory function as indices of neurotoxicity. *Toxicology.*, 49: 205-18, 1988.
25. Otto, D.A., Hudnell, H.K.: The use of visual and chemosensory evoked potentials in environmental and occupational health. *Environ. Res.*, 62:159-171, 1993.
26. Celesia, G.G.: Evoked potentials techniques in the evaluation of visual function. *J. Clin. Neurophysiol.*, 1: 55-76, 1984.
27. Halliday, A.M., McDonald, W.L., Mushin, J.: Delayed visual evoked response in optic neuritis. *Lancet*, 1: 982-985, 1972
28. Hudnell, H.K., Boyes, W.K., Otto, D.A.: Rat and human visual evoked potentials recorded under comparable conditions: A preliminary analysis to address the issue of predicting human neurotoxic effects from rat data. *Neurotoxicol and Teratol.*, 12: 391-398, 1990.

29. Kovacs, P, Juranek, I, Stankovicova, T, Svec, P. Lipid peroxidation during acute stress. *Pharmazie*, 51:51-53, 1996
30. Voronych, N.M., Iemel'ianenko, I.V. Lipid peroxidation and antioxidant system activity in the brain, stomach and heart tissues and blood serum of rats under stress. *Fiziol Zh* 40(5-6): 114-117, 1994
31. Capel, ID, Dorrell, HM, Smallwood, AE. The influence of cold restraint stress on some components of the antioxidant defence system in the tissues of rats of various ages. *J Toxicol Environ Health*, 11(3):425-436, 1983.
32. Behl, C.: Vitamin E and other antioxidants in neuroprotection. *Int. J. Nutr. Res.*, 69(3): 213-219, 1999.
33. Cheeseman, K.H., Slater, T.F.: An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.*, 49(3): 481-493, 1993.
34. Traber, M.G.: Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants. *Miner. Electrolyte Metab.*, 23: 135-139, 1997.
35. Diaz, F., Amenedo, E. Ageing effects on flash visual evoked potentials (FVEP) recorded from parietal and occipital electrodes. *Neurophysiol. Clin. Nov*; 28(5): 399-412, 1998.
36. Aguilera, G. Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. *TEM* 9(8):329-336, 1998
37. Mc Ewen, B, Albeck, D, Cameron, H, Chao, HM, Gould, E, Hastings, N, Kuroda, N, Luna, V. Stress and the brain: Aparadoxal role for adrenal steroids. *Ann. N Y Acad Sci*, 851:371-402, 1998.
38. Chrousos, GP. Stressors, stress, and neurodegenerative integration of the adaptive response. *Ann. N Y Acad Sci*, 851:311-335, 1998
39. Vander, A.J., Sherman, J.A., Luciano, D.S.: Part 2.9, The sensory systems. *Human Physiology*, pp: 249-257, 1996.
40. Busciglio, J, Andersan, JK, Schipper, HM, Gilad, GM, McCarty, R, Marzatico, F, Toussaint, O. Stress, aging, and Neurodegenerative disorders. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*
41. Ganong, W.F. : Section 3, Vision, pp: 287-354, *Review of Medical Physiology*, 1996.
42. Finlay, JM, Jedema, HP, Rabinovic, AD, Mana, MJ, Zigmon, MJ, Sved, AF: Impact of corticotropin-releasing hormone on extracellular norepinephrine in prefrontal after chronic cold stress. *J. Neurochem.*, 69(1):144-150, 1997.
43. Kanayama, N., Tsujimura R., She, L., Maehara, K., Terao, T. Cold-induced stress stimulates the sympathetic nervous system, causing hypertension and proteinuria in rats. *J. Hypertens*, 15(4):383-389, 1997
44. Rita, J.V, Stephen, L.F., Page, M.E. The locus coruleus as a site for integrating corticotropin-releasing factor and noradrenergic mediation of stress responses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 697:173-188, 1993



45. Stillman, MJ, Shukitt-Hale, B, Levy, A, Lieberman HR: Spatial memory under acute cols and restraint stress. *Physiol. Behav.*, 64(5):605-609, 1998.
46. Costa, E, Tagliamonte, N, Brunello, N, Cheney, DL: Effects of stress on the metabolism of acethylcholine in the cholinergic pathways of extrapyramidal and limbic systems. In: E. Usdin, Kvetnasky, R and Kopin, IJ(Eds.) *Catecholamines and Stress: Recent advances*, Elsevier, New York, 59-67, 1980.
47. Fatranska, M, Budai, D, Oprsalova, Z, Kvetnasky, R: Acethylcholine and its enzymes in some brain areas of the rat under stress. *Brain Research*, 424:109-114, 1987.
48. Lawrence, R.A., Parkhill, L.K., Burk, R.F.: Hepatic cytosolic non selenium-dependent glutathione peroxidase activity : its nature and the effect of selenium deficiency. *J.Nutr.*, 108(6): 981-7, 1978.
49. Leung, H.W., Morrow, P.E.: Interaction of glutathione and ascorbic acid in guinea pig lungs exposed to nitrogen dioxide. *Res Commun.Chem.Pathol. Pharmacol.*, 31(1): 111-8, 1981.
50. Leung, K.H., Post, G.B., Menzel, D.B.: Glutathione S-sulfonate a sulfurdioxide metabolite, as a competitive inhibitor of glutathione S-transferase, and its reduction by glutathione reductase. *Toxicol Appl. Pharmacol.*, 77(3): 388-94, 1985.
51. Leuno, H.W., Vang, M.J., Mavis, R.D.: The cooperative interaction between vitamin E and vitamin C in suppression of peroxidation of membrane phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta*, 664(2): 266-72, 1981.
52. Yu, B.P.: Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol.Rev.*, 74 (1): 139-162, 1994.
53. Ohtsuka, Y, Yabunaka, N, Fujisawa, H., Watanabe, I., Agishi, Y. Effect of thermal stress on glutathione metabolism in human erythrocytes. *Eur. J. Appl. Physiol.* 68(1): 87-91, 1994
54. Hassan, H.M., Fridovich, L: Chemistry and biochemistry of superoxide dismutases. *Eur. J. Rheumatol. Inflamm.*, 4(2): 160-72, 1981.
55. Auroma, O.L., Halliwell, B., Gajewski, E., Dizdaroğlu, M.: Copper ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, 273(Pt 3): 601-4, 1991.
56. Gutteridge, J.M.C.: Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.*, 41(12): 1819-28, 1995.
57. Marx, G., Chevion, M.: Site-specific modification of albumin by free radicals. Reaction with copper (II) and ascorbate. *Biochem.J.*, 236(2): 397-400, 1986
58. Wolff, S.P., Dean, R.T.: Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis, *Biochem J.*, 234(2): 399-403, 1986.

59. Zoppini, G., Targher, G., Monaune, T., Faccini, G., Pasqualini, E., Martinelli, C., Zenari, M., Muggeo, M.: Increase in circulating products of lipid peroxidation in smokers with IDDM. *Diabetes Care*, 19(11): 1233-36, 1996.
60. Koster, J.F., Biemond, P., Stam, H.: Lipid peroxidation and myocardial ischaemic damage: cause or consequence? *Basic Res. Cardiol.*, 82 Suppl 1: 253-60, 1987.
61. Clemens, M.R., Waller, H.D.: Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem. Phys. Lipids.*, 45(2-4): 251-68, 1987.
62. Freeman, B.A., Crapo, J.D.: Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, 47(5): 412-26, 1982.
63. Winyard, P., Lunec, J., Brailsford, S., Blake, D.: Action of free radical generating systems upon the biological and immunological properties of caeruloplasmin. *Int. J. Biochem.*, 16(12): 1273-8, 1984.
64. Sagone, A.L., Greenwald, J., Kraut, E.H., Bianchine, J., Sing, D.: Glucose : a role as a free radical scavenger in biological systems. *J. Lab. Clin. Med.*, 101: 97-104, 1983.
65. Kasai, H., Nishimura, S., Kurokawa, Y., Hayashi, Y.: Oral administration of the renal carcinogen, potassium bromate, specifically produces 8-hydroxydeoxyguanosine in rat target organ DNA. *Carcinogenesis*, 8(12): 1959-61, 1987.
66. Collins, A.R., Dusinska, M., Gedik, C.M., Stetina, R.: Oxidative damage to DNA: Do we have a reliable biomarker? *Environ. Health Perspec.*, 104(3): 464-469, 1996.
67. Davies, K.J., Goldberg, A.L.: Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 262(17): 8220-6, 1987.
68. Wendel, A., Cikryt, P.: The level and half-life of glutathione in human plasma. *FEBS-Lett.*, 120(2): 209-11, 1980.
69. Thomas, C.E., Aust, S.D.: Rat liver microsomal NADPH-dependent release of iron from ferritin and lipid peroxidation. *J. Free Radic. Biol. Med.*, 1(4): 293-300, 1985.
70. Ji, L.L., Stratman, F.W., Lardy, H.A.: Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise. *Arch. Biochem. Biophys.*, 263(1): 150-60, 1988.
71. Lopez-Torres, M., Perez-Campo, R., Fernandez, A., Barba, C., Barja de Quiroga, G.: Brain glutathione reductase induction increases early survival and decreases lipofuscin accumulation in aging frogs. *J. Neurosci. Res.*, 34(2): 233-42, 1993.
72. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Cross, C.E.: Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* 19(6): 598-620, 1992.

73. Al-Turk, W.A., Stohs, S.J., El-Rashidy, F.H., Othman, S., Shaheen, O.: Changes in glutathione reductase and glutathione-S-Transferase as a function of cell concentration and age. *Pharmacology*, 34(1): 1-8, 1987.
74. Sokol, R.J.: Vitamin E deficiency and neurologic disease. *Ann. Rev. Nutr.*, 8: 351-73, 1988.
75. Brin, M.F., Fetell, M.R., Green, P.H.A., Kayden, H.J., Hays, A.P., Behrens, M.M., Baker, H.: Blind loop syndrome, vitamin E malabsorption, and spinocerebellar degeneration. *Neurology*, 35: 338-342, 1985.
76. Kaplan, P.W., Rawal, K., Erwin, C.W., D'Souza, B.J., Spock, A.: Visual and somatosensory evoked potentials in vitamin E deficiency with cystic fibrosis. *Electroencephal. Clin. Neurophysiol.*, 71: 266-272, 1988.
77. Satya-Murti, S., Howard, L., Krohel, G., Wolf, B.: The spectrum of neurologic disorder from vitamin E deficiency. *Neurology*, 36: 917-921, 1986.
78. Larsen, P.D., Mock, M.D., O'Connor, P.S.: Vitamin E deficiency associated with vision loss and bulbar weakness. *Ann. Neurol.*, 18: 725-727, 1985.
79. Frei, B., Keaney, J.F., Retsky, K.L., Chen, K.: Vitamins C and E and LDL oxidation. *Vitamins and Hormones*, 52: 1-34, 1996.
80. Rivett, A.J.: High molecular mass of intracellular proteases. *Biochem. J.*, 263(3): 625-33, 1989.
81. Hölscher, C.: Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci.*, 20(7): 298-303, 1997.
82. Krukoff, T.L. Central action of nitric oxide in regulation of autonomic functions. *Brain Res Rev.* 30:52-65, 1999.
83. McCann, S.M.: The Nitric oxide hypothesis of brain ageing. *Exp. Gerontol.*, 32(4/5): 431-440, 1997.
84. Moncada, S., Higgs, A.: The L-arginine-nitric oxide pathway. *The N. Eng. J. Med.*, 30:2002-2012, 1993.
85. Rodeberg, D.A., Chaet, M.S., Bass, R.C., Arkovitz, M.S., Garcia, V.F.: Nitric oxide: An Overview. *The Am. J. Surgery*, 170: 292-303, 1995.
86. Kanda, K.: Expression of neuronal nitric oxide synthase in spinal motoneurons in aged rats. *Neurosci. Lett.*, 219: 41-44, 1996.
87. Van der Veen, R.C., Roberts, L.J.: Contrasting roles for nitric oxide and peroxynitrite in the peroxidation of myelin lipids. *J. Neuroimmunol.*, 95: 1-7, 1999.
88. Vorwerk, C.K., Hyman, B.T., Miller, J.W., Husain, D., Zurakowski, D., Huang, P.L., Fishman, M.C., Dreyer, E.B.: The role of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in retinal excitotoxicity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 38: 2038-2044, 1997.

89. Wang, Z.Y., Hakanson, R: Role of nitric oxide (NO) in ocular inflammation. *Br. J. Pharmacol.*, 116: 2447-2450, 1995.
90. Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. : Part 5, Central visual pathway. *Principles of Neural Science*, pp: 702-748 Appleton & Lange, 1991.
91. Carbe, C., Arnaud, F., Bolzinger, C.J.: Effect of a dopaminergic agonist, piribedil (Trivastal 50 mg LP) on visual and spatial integration in elderly subjects. *J. Neurol.* 239 (Suppl. 1): 22-27, 1992.
92. Guyton, A.C.: Section 9, The Nervous system, *Textbook of Medical Physiology.*, 1996.
93. Dice, J.F. Cellular and molecular mechanism of aging. *Physiol Rev.*, 73(1):149-159, 1993.
94. Kenneth, B.B. and Ames, N.B.: The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.*, 78(2): 547-581, 1998.
95. Schmidt, K.: Physiology and pathophysiology of senescence. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 69 (3): 150-153, 1999.
96. Darnell, J.: Sensory transduction: The visual and olfactory systems. *Molecular Cell Biology*, pp: 971-978, 1995.
97. Demonasterio, F.M., Schein, S.J., McCrane, E.P.: Staining of blue-sensitive cones of the macaque retina by a fluorescent dye. *Science.* 213(4513):1278-81, 1981.
98. Livingstone, M., Hubel, D.: Segregation of form, color, movement, and depth : Anatomy, physiology, and perception. *Science.* 240(4853): 740-9, 1988.
99. Horton, J.C., Hubel, D.H.: Regular patchy distribution of cytochrome oxidase staining in primary visual cortex of macaque monkey. *Nature.* 292 (5825): 762-4, 1981.
100. Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M.: Section VI, Perception, pp: 365-385, *Essentials of Neural Science and Behavior.* Appleton & Lange, 1995.
101. Yaltkaya, K, Balkan, S, Baysal, AI. Visual evoked potentials in diabetes mellitus. *Acta. Neurol. Scand.*, 77:239-241, 1988.
102. Dawson, G.E.: A summation technique for the detection of small evoked potentials. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 6: 65-84, 1954.
103. Halliday, AM.: Visually evoked responses in optic nerve disease. *Transactions of the ophthalmological society of United Kingdom.* 96 (3): 372-376, 1976.
104. Hetzler, BE, Boyes, WK, Creason, J, Dyer, RS: Temperature dependent changes in visual evoked potentials of rats. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 70, 137-154, 1988.
105. Sokol, S.: Visually evoked potentials: Theory, techniques and clinical applications. *Sur. Ophthalmol.*, 21: 18-43, 1976.
106. Dyer, R.S.: The use of sensory evoked potentials in toxicology. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 5: 24-40, 1985.

107. Dyer, R.S., Clark, C.C., Boyes, W.K.: Surface distribution of flash-evoked and pattern-reversal evoked potentials in hooded rats. *Brain Res. Bull.*, 18: 227-234, 1987.
108. Dyer, R.S., Jensen K.F., Boyes, W.K.: Focal lesions of visual cortex: Effects on visual evoked potentials in rats. *Exp. Neurol.*, 95(1): 100-115, 1987.
109. Boyes W.: Testing visual system toxicity using visual evoked potentials. In *vulnerable brain. Vol: 1 (Malnutrition and Toxins)*. R. Isaasson and K. Jensen EDS. Pleauin. New York. 1991.
110. Xintaras, C., Johnson, B.L., Ulrich, C.E., Terril, R.E., Sobbecki, M.F.: Application of evoked response technique in air pollution toxicology. *Toxicol. App. Pharmacol.*, 8: 77-87, 1966.
111. Inoue, T, Koyoma, T, Muraki, A, Yamashita, I. Effects of single and repeated immobilization stress on chorticotropin-releasing factor concentrations in discrete rat brain regions. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatry* 17(1):161-170,1993.
112. Wasowicz, W., Jean, N., Peratz, A.: Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum. Importance of extraction pH and influence of sample, preservation and storage. *Clin. Chem.*, 39(12): 2522-2526, 1993.
113. Ho, FM, Liu, SH, Liau, CS, Huang, PJ, Shiah, SG, Lin-shiau, SY. Nitric oxide prevent apoptosis of human endothelial cells from high glucose exposure during early stage. *J. Cell. Biochem.*, 75(2):258-263, 1999.
114. Lancelot, E., Revaud, M.L., Boulu, R.G., Plotkine, M., Callebert, J.: A microdialysis study investigating the mechanisms of hydroxyl radical formation in rat striatum exposed to glutamate. *Brain Res.*, 809: 294-296, 1998.
115. Paglia, DE, Valentine, WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70:158-169, 1967.
116. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Far, A.L., Randel, R.J.: Protein measurement with folin-phenol reagent. *J Biol. Chem*, 193: 265-275, 1951.
117. Cabib, S, Kempf, E, Schleef, C, Oliverio, A, Allegra, SP. Effects of immobilization stress on dopamine and its metabolites in different brain areas of the mouse: role of genotype and stress duration. *Brain Res.*, 441:153-160, 1988.
118. Kirby, L.G., Chou-Green, J.M., Davis, K., Lucki, I. The effects of different stressors on extracellular 5-Hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Brain Res.* 760(1-2): 218-230,1997
119. Bruhwylter J, Chleide E, Liegeois JF, Carreer F. Nitric oxide: a new messenger in the brain. *Neurosci Biobehav Rev.* 17(4):373-84. 1993.

120. Gupta, MP, Evanoff, V, Hart, M. Nitric oxide attenuates hydrogen peroxide-mediated injury to porcine pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol*, 272(16):L1133-L1141, 1997.
121. Fernandez, LP. Stress and neurodegeneration: pharmacologic strategies. *An R Acad Nac Med (Madr)*, 116(2):417-428, 1999
122. Matsumoto, K, Yobimoto, K, Huong, NT, Abdel-Fattah, M, Van Hien, T, Watanabe, H. Psychological stress-induced enhancement of brain lipid peroxidation via nitric oxide systems and its modulation by anxiolytic and anxiogenic drugs in mice. *Brain Res.*, 839(1):74-84, 1999.
123. Zatz, R., Baylis, C.: Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension*, 32(6): 1-14, 1998.
124. Yamada, K., Noda, Y., Nakayama, S., Komori, Y., Sugihara, H., Hasegawa, T., Nabeshima, T.: Role of nitric oxide in learning and memory and in monoamine metabolism in the rat brain. *Br. J. Pharmacol.*, 115: 852-858, 1995.
125. Yamada, K., Nabeshima, T.: Simultaneous measurement of nitrite and nitrate levels as indices of nitric oxide release in the cerebellum of conscious rats. *J. Neurochem*, 68: 1234-1243, 1997.
126. Rose, G.P., Dewar, A.J., Stratford, I.J.: Protection against misonidazole-induced neuropathy in rats: a biochemical assessment. *Toxicol Lett.*, 17(1-2): 181-5, 1983.
127. Suzuki, J., Abiko, H., Mizoi, K., Oba, M., Yoshimoto, T.: Protective effect of phenytoin and its enhanced action by combined administration with mannitol and vitamin E in cerebral ischaemia. *Acta Neurochir (Wien)*, 88(1-2): 56-64, 1987.
128. Budziszewka, B, Leskiewicz, M, Jaworska, LF, Lason W. the effect of L-NAME on morphine induced changes in the plasma corticosterone and testosterone levels in mice. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*. 107(1):75-79, 1999.
129. Bugaski, J, Borycz, J, Gadek, MA, Glod, R. effect of L-NAME on CRH-elicited ACTH and corticosterone secretion. *J Physiol Pharmacol*, 49(4):607-616, 1998.
130. Bugaski, J, Gadek, MA, Glod, R, Borycz, Z, Bugaski, AJ. Blockade of nitric oxide formation impairs adrenargic-induced ACTH and corticosterone secretion. *J Physiol Pharmacol*, 50(2):327-334, 1999.
131. Ainsah, O, Nabishah, BM, Osman CB, Khalid, BA: Naloxane and vitamin E block stress induced reduction of locomotor activity and elevation of plasma corticosterone. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 107(7): 462-467, 1999.
132. Petrova, VA, Maltshv, VV, Manukhin, BN, meerson, FZ. Limiting stress activation of the adrenargic and pituitary-adrenal systems by alpha-tocopherol. *Vopr Med Khim*, 31(6):115-118, 1985.

133. Kshimoto, J, Tsuchiya, T, Emson, PC, Nakayama, Y. Immobilization-induced stress activates neuronal nitric oxide synthase (NOS) mRNA and protein in HPA axis in rats. *Brain Res* 720(1-2):159-171, 1996.
134. Lopez-Figueroa, MO, Itoi, K, Watson, SJ: Regulation of nitric oxide synthase messenger RNA expression the rat hippocampus by glucocorticoids. *Neuroscience*, 87(2):439-446, 1998.
135. Olivenza, R, Morro, MA, Lizasoain, I, Lorenzo P, Fernandez, AP, Bosca, L, Leza, JC. Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex.
136. Tsuchiya, T, Kishimoto, J, Koyama, J, Ozawa, T. Modulatory effect of L-NAME, a specific nitric oxide synthase (NOS) inhibitor, on stress induced changes in plasma ACTH and corticosterone levels in rats: physiological significance of stress induced NOS activation in HPA axis. *Brain Res*. 776(1-2):68-74, 1997.
137. Gorbunov, N., Esposito, E.: Activation of glutamate receptors stimulates the formation of nitrite in synaptosomes from rat cerebellum. *J. Neurochem.*, 62: 2205-2211, 1994.
138. Grisham, M.B., Ware, K., Gilleland, H.E., Gilleland, L.B., Abell, C.L., Yamada, T.: Neutrophil-mediated nitrosamine formation: Role of nitric oxide in rats. *Gastroenterology*, 103: 1260-66, 1992.
139. Santamaria, A., Santamaria, D., Diaz-Munoz, M., Espinoza-Gonzalez, V., Rios, C.: Effects of N $\omega$ -nitro-L-arginine and L-arginine on quinolinic acid-induced lipid peroxidation. *Toxicol. Lett.*, 93: 117-124, 1997.
140. Chow, C.K., Hong, C.B., Reese M.E., Gairola, C.: Effect of dietary vitamin E on nitrite-treated rats. *Toxicol. Lett.*, 23: 109-117, 1984.
141. Mergens, W.J.: Efficacy of vitamin E to prevent nitrosamine formation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 393: 61-69, 1982.
142. Meydani, M., Macauley, J.B., Blumberg, J.B.: Influence of dietary vitamin E, selenium and age on regional distribution of  $\alpha$ -tocopherol in the rat brain. *Lipids.*, 21(12): 786-791, 1986.
143. Bondarenko, TI, Miliutina, NP, Shustanova, Mikhaleva, II: Effect of delta sleep-inducing peptide on lipid peroxidation xanthine oxidase activity in rat tissues during cold stress. *Russ. Fiziol. Zh Im I M Sechenova*, 85(8):1080-1084, 1999.
144. Ohno, H., Kondo T., Fujiwara, Y., Tagami, S., Kroshima, A., Kawahami, Y. Effect of cold stress on glutathione and related enzymes in rat erythrocytes. *Int. J. Biometeorol*, 35(2):111-113, 1991.
145. Sosnovskii, AS, Balashova, TS, Pirogova, GV, Kubatiev, AA, Pertsov, SS. Antioxidant enzymatic activity in the limbic-reticular structures of the rat brain after short term immobilization. *Biull Eksp Biol Med*, 115(6):612-614, 1993.

146. Bonnefont, D., Legrand, A., Peynet, J., Emerit, J., Delattre, J., Galli, A.: Distribution of thiobarbituric acid-reactive substances in lipoproteins and proteins in serum. *Clin. Chem.*, 35: 2054-2058, 1984.
147. Esterbauer, H., Cheeseman, K.: Determination of aldehydic lipid-peroxidation products malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods. Enzymol.*, 186: 407-421, 1990.
148. Holley, A.E., Cheeseman, K.H.: Measuring free radical reactions in vivo. *Br. Med. Bull.*, 49(3): 494-505, 1990.
149. Siu, AW, Reiter, RJ, To, CH: Pineal indolamines and vitamin E reduce nitric oxide induced lipid peroxidation in rat retinal homogenates.
150. Rebert, C.S.: Multisensory evoked potentials in experimental neurotoxicology. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 5: 659-671, 1983



## ÖZGEÇMİŞ

Nazmi YARAŞ 22.01.1974 yılında Sivas'ın Yıldızeli ilçesinde dünyaya geldi. İlk öğrenimini Hamdullah Suphi İlkokulunda Ankarada tamamladıktan sonra, Bahçelievler Cumhuriyet Lisesi'nden 1991 yılında mezun oldu. Aynı yıl Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde üniversite eğitime başladı. Lisan diplomasını 1998 yılında alarak, Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitime kaydoldu. Halen, Akdeniz Üniversitesi Tıp fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizcedir. Bekardır.