

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

**BESİNLERLE FARKLI DOZLARDA ALINAN  
SÜLFİTİN GÖRSEL UYARILMA POTANSİYELLERİ  
ÜZERİNE ETKİSİ**

**Nihal ÖZTÜRK**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Antalya, 2008**

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

**BESİNLERLE FARKLI DOZLARDA ALINAN SÜLFİTİN  
GÖRSEL UYARILMA POTANSİYELLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**Nihal ÖZTÜRK**

**Yüksek Lisans Tezi**

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

**Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim  
Birimi**

**tarafından desteklenmiştir ( Proje No:2006.02.0122.010 )**

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir.”

**Antalya, 2008**

**Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;**

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyofizik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 12.02.2008

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

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

**Üye:** Prof. Dr. Nimet İZGÜT-UYSAL  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Fizyoloji Anabilim Dalı

**Üye:** Doç. Dr. Murat CANPOLAT  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyofizik Anabilim Dalı

**Üye:** Doç. Dr. Mutay ASLAN  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı

**Onay:**

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

**Prof. Dr. Nurettin OĞUZ**  
**Enstitü Müdürü**

# BESİNLERLE FARKLI DOZLARDA ALINAN SÜLFİTİN GÖRSEL UYARILMA POTANSİYELLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Nihal ÖZTÜRK

## ÖZET

Çalışmamızda besin yoluyla farklı dozlarda alınan sülfitin etkilerinin elektrofizyolojik ve biyokimyasal parametreler yardımıyla aydınlatılması hedeflenmiştir.

Çalışmamızda 60 adet wistar sıçan kullanılarak, kontrol grubu (K), 10 mg/kg/gün sülfid verilen grup (S1), 100 mg/kg/gün sülfid verilen grup (S2) ve 260 mg/kg/gün sülfid verilen grup (S3) olmak üzere dört grup oluşturulmuştur. Deney gruplarına sülfid, K grubuna ise distile su 35 gün süresince gavaj yoluyla verilmiştir. Deney süresinin sonunda sıçanların görsel uyarılma potansiyelleri (VEPs) kaydedilmiş, biyokimyasal analizler için beyin ve retina dokuları çıkartılmıştır.

Sülfür dioksidi maruz kalmanın bir göstergesi olarak kabul edilen plazma-S-sülfonat düzeylerinin S1 dışındaki gruplarda K grubuna göre anlamlı derecede arttığı saptanmıştır. Tiyoarbitürik asit reaktif ürünleri (TBARS) ve 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE) oluşumuna bakılmış ve K ile karşılaştırıldığında, 10 mg/kg sülfid TBARS değerlerini etkilemediği gözlenmiştir. Diğer yandan, retina ve beyin TBARS değerleri S2 grubunda K ve S1 gruplarına göre, S3 grubunda ise K, S1 ve S2 gruplarına göre anlamlı düzeyde artmıştır. Deney gruplarının beyin ve retina dokularında 4-HNE miktarının önemli düzeyde arttığı belirlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, beyin dokusundaki redükte glutatyon/okside glutatyon oranlarında anlamlı düzeyde olmayan doza bağlı bir azalma görülmüştür. Kontrolle karşılaştırıldığında VEP latenslerinin S1 grubunda değişmediği, ancak S2 grubunda K ve S1 gruplarına göre, S3 grubunda ise K, S1 ve S2 gruplarına göre uzadığı bulunmuştur. Ayrıca, VEP latenslerinin tüm bileşenleri ile doku TBARS değerleri arasında pozitif bir ilişki olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda, sülfid dozuna bağlı olarak lipid peroksidasyonun arttığı ve buna paralel olarak VEP latenslerinin uzadığı tespit edilmiştir. Bu veriler sülfid toksisitesinde lipid peroksidasyonunun önemli rolünün olabileceğine işaret etmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Sülfid, Görsel uyarılma potansiyelleri, Lipid peroksidasyonu

# DOSE-DEPENDENT EFFECT OF NUTRITIONAL SULFITE INTAKE ON VISUAL EVOKED POTENTIALS

**Nihal ÖZTÜRK**

## ABSTRACT

The goal of this study was to clarify the dose-dependent effect of sulfite ingestion by means of electrophysiological and biochemical parameters.

In the presented study, 60 wistar rats were divided into four groups as follows; control (K), 10 mg/kg/day sulfite treated (S1), 100 mg/kg/day sulfite treated (S2), and 260 mg/kg/day sulfite treated (S3). Control rats were administered distilled water, while the other three groups were given sulfite via gavage for a period of 35 days. Following the experimental period, visual evoked potentials (VEPs) were recorded and brain, retina tissues were extracted for biochemical analyses.

Plasma-S-sulfonate levels, an indicator of sulfurdioxide exposure, were increased in sulfite-treated groups other than S1 in dose-dependent manner. Thiobarbuturic acid reactive products (TBARS) and 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) were also measured and 10 mg/kg sulfite was observed not to have influence on TBARS levels. However, retina and brain TBARS levels were elevated in S2 compared to K and S1 groups. Likely, TBARS values were significantly higher in S3 group regarding S1 and S2 groups. Furthermore, sulfite caused a considerable increase in 4-HNE amounts in tissues of experimental groups. Though not significant, glutathione/oxidized glutathione ratios were decreased with sulfite treatment. Despite the absence of change in VEP latencies of S1 group, all VEPs components were prolonged in S2 and S3 groups regarding S1 and control groups. VEPs latencies were significantly greater in S3 group when compared to S2. Analyses indicated a positive correlation between VEPs latencies and TBARS values of brain and retina tissues.

In conclusion, sulfite treatment caused dose-dependent increase in lipid peroxidation and VEPs latencies in rats. This data indicate that lipid peroxidation could play an important role in sulfite toxicity.

**Keywords:** Sulfite, Visual evoked potentials, Lipid peroxidation

## **TEŞEKKÜR**

Bu araŐtırmanın gerekleŐmesinde yol gösteren ve araŐtırmanın her aŐamasında destek olan hocam Prof. Dr. Piraye YARGIŐOĐLU'na, özverili çalıŐmalarından dolayı Prof. Dr. Aysel AĞAR'a, bana her aşamada yardımcı olan Doç. Dr. Narin DERİN, Doç. Dr. Mutay ASLAN, AraŐ. Gör. Deniz AKPINAR ve AraŐ. Gör. AyŐegül ÇÖRT'e, teknik olanakları ile bu çalıŐmanın belirli basamaklarının gerçekleŐmesini sağlayan Merkez Araştırma Laboratuvarı ve Deney Hayvanları Ünitesi çalıŐanlarına teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>ÖZET</b>	iv
<b>ABSTRACT</b>	v
<b>TEŞEKKÜR</b>	vi
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b>	viii
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b>	x
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	xi
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	xiii
<b>GİRİŞ</b>	1
<b>GENEL BİLGİLER</b>	5
2.1. Görsel Sistem ve Görsel Uyarılma Potansiyelleri	5
2.1.1. Görme Sistemi	5
2.1.2. Sıçan Görme Sistemi	16
2.1.3. Elektrofizyolojik İncelemeler	16
2.1.3.1. Elektoretinogram (ERG)	16
2.1.3.2. Elektroensefalogram ve Uyarılma Potansiyelleri	17
2.1.3.3. Görsel Uyarılma Potansiyelleri	18
2.1.3.4. VEP Kayıtları	19
2.1.4. VEP'leri Etkileyen Faktörler	21
2.2. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Mekanizmaları	23
2.2.1. Serbest Radikal Kavramı	23
2.2.2. Serbest Radikal Oluşumu	23
2.2.3. Oksijen ve Oksijen Radikalleri	23
2.2.3.1. Moleküler Oksijenin Özellikleri	23
2.2.3.2. Serbest Oksijen Radikalleri	24
2.2.4. Serbest Radikallerin Etkileri	27
2.2.5. Antioksidan Savunma Sistemi	29
2.3. Sülfid	32
2.3.1. Endojen Sülfid Oluşumu	33
2.3.2. Eksojen Sülfid Alımı	36
2.3.3. Sülfidin Metabolizması	36
2.3.4. Sülfid Radikallerinin Oluşumu	39
2.3.5. Sülfid Toksikitesi	42
<b>GEREÇLER VE YÖNTEMLER</b>	44
3.1. Gruplandırma	44
3.2. Deney Protokolü	44
3.3. Sülfid Verilmesi	44

3.4. Görsel Uyarılma Potansiyellerinin Kaydedilmesi	45
3.5. Biyokimyasal Yöntemler	45
3.5.1. Doku Tiyobarbitürik Asit Reaktif Ürünlerinin (TBARS) Ölçümleri	46
3.5.2. 4-hidroksinonenal (4-HNE) Aktivitesinin Tayini	46
3.5.3. Redükte Glutasyon ( GSH ) ve Okside Glutasyon ( GSSG ) Tayini	47
3.5.4. Plazma-S-Sülfonat Tayini	48
3.5.5. Protein Tayini	49
3.6. İstatistiksel İşlem	49
<b>BULGULAR</b>	<b>50</b>
4.1. Genel Görünüm	50
4.2. Besin Tüketimi	50
4.3. Ağırlık Değişimi	50
4.4. Doku Tiyobarbitürik Asit Reaktif Ürünleri (TBARS) Sonuçları	50
4.5. 4-Hidroksi-2-nonenal (4-HNE) Aktivitesi Sonuçları	52
4.6. Redükte Glutasyon (GSH) ve Okside Glutasyon (GSSG) Aktivitesi Sonuçları	56
4.6.1. Beyin Redükte Glutasyon (GSH) ve Okside Glutasyon (GSSG) Aktivitesi Sonuçları	56
4.6.2. Retina Redükte Glutasyon (GSH) ve Okside Glutasyon (GSSG) Aktivite Sonuçları	56
4.7. Plazma-S-Sülfonat Aktivite Sonuçları	57
4.8. VEP Sonuçları	58
4.9. VEP Latensleri ile Beyin ve Retina TBARS Seviyeleri Arasındaki Bağlılıklar	62
4.10. Vep Latensleri İle Plazma-S-Sülfonat Düzeyleri Arasındaki Regresyon Denklemleri	62
4.11. Beyin ve Retina TBARS'ları İle Plazma-S-Sülfonat Değerleri Arasındaki Regresyon Denklemleri	62
<b>TARTIŞMA</b>	<b>72</b>
<b>SONUÇLAR</b>	<b>78</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>79</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>89</b>



## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>4-HNE</b>	: 4-hidroksi-2-nonenal
<b>ADI</b>	: günlük kabul edilebilir doz
<b>BAEP</b>	: beyin sapı uyarılmış potansiyeller
<b>Ca</b>	: kalsiyum
<b>CAT</b>	: katalaz
<b>cGMP</b>	: siklik guanilat monofosfat
<b>CO</b>	: karbon monoksit
<b>Cu/Zn-SOD</b>	: bakır-çinko süperoksit dismutaz
<b>dLGN</b>	: dorsal genikülat nükleus
<b>DP</b>	: dipeptidaz
<b>EEG</b>	: elektroensefalogram
<b>EP</b>	: uyarılmış potansiyeller
<b>ERG</b>	: elektoretinogram
<b>FAO/WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü Besin Katkı Maddeleri Komitesi
<b>Fe-SOD</b>	: demir süperoksit dismutaz
<b>FVEP</b>	: flaş VEP
<b>GC</b>	: guanilat siklaz
<b>GPx</b>	: glutasyon peroksidaz
<b>GR</b>	: glutasyon redüktaz
<b>GS<sup>•</sup></b>	: glutathionyl radikali
<b>GSH</b>	: glutasyon
<b>GSNO</b>	: S-nitrosoglutasyon
<b>GSOO<sup>•</sup></b>	: glutasyon thiyperoksil radikali
<b>GSOOH</b>	: glutasyon sülfenil hidroperoksit
<b>GSSG</b>	: okside glutasyon
<b>GSSG<sup>•-</sup></b>	: glutasyon disülfid anyon radikali
<b>GSSO<sub>3</sub></b>	: S-sülfoglutasyon
<b>GST</b>	: glutasyon S-transferaz
<b>GT:</b>	: $\gamma$ -glutamil transpeptidaz
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: hidrojen peroksit
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub></b>	: sülfüröz asit
<b>HSO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	: bisülfid
<b>K<sup>+</sup></b>	: potasyum
<b>K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	: potasyum metabisülfid
<b>KHSO<sub>3</sub></b>	: potasyum bisülfid
<b>L<sup>•</sup>:</b>	: yağ asidi radikali
<b>LOO<sup>•</sup></b>	: peroksil
<b>LOOH</b>	: lipid hidroperoksitler
<b>MDA</b>	: malondialdehit
<b>Mn-SOD</b>	: mangan süperoksit dismutaz
<b>Na</b>	: sodyum

<b>Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	: sodyum metabisülfid
<b>NaHSO<sub>3</sub></b>	: sodyum bisülfid
<b>NaSO<sub>3</sub></b>	: sodyum sülfid
<b>NO</b>	: nitrik oksit
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	: süperoksit anyon radikali
<b><sup>-</sup>O<sub>3</sub>SOO<sup>•</sup></b>	: peroksil radikali
<b><sup>-</sup>O<sub>3</sub>SOO<sup>•</sup></b>	: peroksil
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	: peroksi nitrit
<b>PAH</b>	: polisiklik aromatik hidrokarbon
<b>PRVEP</b>	: Şekil değişmeli VEP
<b>PUFA</b>	: poliunsatüre fatty asit
<b>SEP</b>	: somatosensoryel uyarılmış potansiyeller
<b>SO<sub>2</sub></b>	: sülfür dioksit
<b>SO<sub>3</sub><sup>•-</sup></b>	: sülfür trioksit anyon radikali
<b>SO<sub>3</sub><sup>2-</sup></b>	: sülfid
<b>SO<sub>4</sub><sup>•-</sup></b>	: sülfat anyon radikali
<b>SO<sub>4</sub><sup>-2</sup></b>	: sülfat
<b>SOD</b>	: süperoksit dizmutaz
<b>TBARS</b>	: tiobarbütirik asit reaktif ürünleri
<b>TT</b>	: tiol transferaz
<b>VEPs</b>	: görsel uyarılma potansiyelleri

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 2.1.	Gözün yapısı	5
Şekil 2.2.	Retinal nöronların organizasyonu	6
Şekil 2.3.	Basil ve konilerin bölümleri	9
Şekil 2.4.	Basildeki rodopsin-retinal döngüsü	10
Şekil 2.5.	cGMP'nin görmedeki rolü	11
Şekil 2.6.	Retinanın nöral organizasyonu	12
Şekil 2.7.	Gözlerden görme korteksine giden temel görme yolları	13
Şekil 2.8.	Lateral genikulat nukleus görsel bilginin işlendiği temel subkortikal bölgedir	15
Şekil 2.9.	Elektroretinogram sinyalleri	17
Şekil 2.10.	Görsel uyarılma potansiyelleri ve bileşenleri	20
Şekil 2.11.	ROS	25
Şekil 2.12.	Antioksidan enzim sistemleri	29
Şekil 2.13.	Süperoksit dismutaz enziminin yapısı ve fonksiyonu	30
Şekil 2.14.	Vücutta endojen sülfid oluşumu	34
Şekil 2.15.	Sülfitojenik yollar	35
Şekil 2.16.	Sülfid oksidazın sülfidi sülfata oksitlemesi	37
Şekil 2.17.	Glutasyonun S-sülfosisteine dönüşümü	39
Şekil 2.18.	Glutasyonun zincir reaksiyonları	42
Şekil 3.1.	SDS-PAGE ve western blot analizi	47
Şekil 4.1.a	Beyin dokusu protein boyaması	53
b.	Retina dokusu protein boyaması	53
Şekil 4.2.a.	Beyin dokusu 4-HNE western blot analizi	54
b.	Beyin dokusu 4-HNE western blot dansitometrik analizi	54
Şekil 4.3.a.	Retina dokusu 4-HNE Western Blot Analizi	55
b.	Retina dokusu 4-HNE western blot dansitometrik analizi	55
Şekil 4.4.	Beyin GSH: GSSG VE GSH/GSSG değerleri	56
Şekil 4.5.	Retina GSH, GSSG ve GSH/GSSG değerleri	57
Şekil 4.6.	Plazma-S-sülfonat düzeyleri	57
Şekil 4.7.	Kontrol ve deney grubu hayvanlarından kaydedilen VEP'ler ve bileşenleri	59
Şekil 4.8.	Beyin TBARS miktarı ile P1 latensinin regresyon grafiği	63
Şekil 4.9.	Beyin TBARS miktarı ile N1 latensinin regresyon grafiği	63
Şekil 4.10.	Beyin TBARS miktarı ile P2 latensinin regresyon grafiği	64
Şekil 4.11.	Beyin TBARS miktarı ile N2 latensinin regresyon grafiği	64
Şekil 4.12.	Beyin TBARS miktarı ile P3 latensinin regresyon grafiği	65
Şekil 4.13.	Retina TBARS miktarı ile P1 latensinin regresyon grafiği	65
Şekil 4.14.	Retina TBARS miktarı ile N1 latensinin regresyon grafiği	66
Şekil 4.15.	Retina TBARS miktarı ile P2 latensinin regresyon grafiği	66

<b>Şekil 4.16.</b>	Retina TBARS miktarı ile N2 latensinin regresyon grafiği	<b>67</b>
<b>Şekil 4.17.</b>	Retina TBARS miktarı ile P3 latensinin regresyon grafiği	<b>67</b>
<b>Şekil 4.18.</b>	Plazma-S-sülfonat düzeyleri ile P1 latensinin regresyon grafiği	<b>68</b>
<b>Şekil 4.19.</b>	Plazma-S-sülfonat düzeyleri ile N1 latensinin regresyon grafiği	<b>68</b>
<b>Şekil 4.20.</b>	Plazma-S-sülfonat düzeyleri ile P2 latensinin regresyon grafiği	<b>69</b>
<b>Şekil 4.21.</b>	Plazma-S-sülfonat düzeyleri ile N2 latensinin regresyon grafiği	<b>69</b>
<b>Şekil 4.22.</b>	Plazma-S-sülfonat düzeyleri ile P3 latensinin regresyon grafiği	<b>70</b>
<b>Şekil 4.23.</b>	Plazma-S-sülfonat düzeyleri ile beyin TBARS değerlerinin regresyon grafiği	<b>70</b>
<b>Şekil 4.24.</b>	Plazma-S-sülfonat düzeyleri ile retina TBARS değerlerinin regresyon grafiği	<b>71</b>

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 2.1.</b>	Rodlar ve koniler arasındaki farklar	<b>7</b>
<b>Tablo 2.2.</b>	VEP'leri etkileyen faktörler	<b>22</b>
<b>Tablo 2.3.</b>	Reaktif oksijen türlerinin simgeleri ve elektron yapıları	<b>24</b>
<b>Tablo 2.4.</b>	Değişik canlı türlerinin farklı dokularındaki sülfite oksidaz aktiviteleri	<b>38</b>
<b>Tablo 4.1.</b>	Yem tüketimleri ve ağırlık değişimleri	<b>51</b>
<b>Tablo 4.2.</b>	Beyin ve retina TBARS değerleri	<b>52</b>
<b>Tablo 4.3.</b>	VEP latensleri	<b>60</b>
<b>Tablo 4.4.</b>	VEP genlikleri	<b>61</b>
<b>Tablo 4.5.</b>	VEP latensleri ile beyin ve retina TBARS değerleri arasındaki regresyon denklemleri	<b>62</b>
<b>Tablo 4.6.</b>	VEP latensleri ile Plazma-S-sülfonat düzeyleri arasındaki regresyon denklemleri	<b>62</b>
<b>Tablo 4.7.</b>	Beyin ve retina TBARS değerleri ile Plazma-S-sülfonat düzeyleri arasındaki regresyon denklemleri	<b>62</b>

## GİRİŞ

Çevre kirliliğinin önemli bir bileşeni olarak bilinen ve besinlerle sülfid ( $\text{SO}_3^{-2}$ ) tuzları şeklinde alınan sülfür dioksit ( $\text{SO}_2$ ), serbest radikal oluşumuna yol açan önemli faktörlerden biridir. Ayrıca besinlerle  $\text{SO}_3^{-2}$  tuzları şeklinde alınan  $\text{SO}_2$ 'in çeşitli iyonlarla yaptığı tuzları gıda ve ilaç endüstrisinde koruyucu amaçlarla yaygın olarak kullanılmaktadır (1, 2). Sülfid çözeltilerde sülfid iyonu, bisülfid iyonu ( $\text{HSO}_3^-$ ) ve sülfüroz asit ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ) formunda bulunmakta, ancak asidik pH'larda ve düşük sıcaklıklarda  $\text{SO}_2$ e dönüşmektedir (3). Sıcaklığın yükseltilmesi ve pH'nın düşürülmesi daha fazla  $\text{SO}_2$  oluşturduğundan, mide ve ağız gibi asidik ortamlarda  $\text{H}_2\text{SO}_3$  göre daha fazla  $\text{SO}_2$  ortaya çıkar. Oluşan  $\text{SO}_2$  gastrointestinal sistem tarafından absorbe edilerek sistemik dolaşıma geçer ve dokulara dağılır (4).

Sülfid eksojen olarak alınabildiği gibi (2, 3, 5), vücutta da sistein ve metionin aminoasitlerinden sentezlenir (2). Eksojen olarak alınan veya endojen olarak üretilen  $\text{SO}_3^{-2}$ , mitokondriyal bir enzim olan sülfid oksidaz tarafından oksidasyona uğrar ve zararsız bir bileşik olan inorganik sülfata ( $\text{SO}_4^{-2}$ ) dönüştürülür (2). Sülfid oksidaz enziminin yetersizliğinde veya çok fazla  $\text{SO}_3^{-2}$ 'ye maruz kalındığında,  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin oksidasyonu non-enzimatik serbest radikal mekanizmalar ile gerçekleşir (2). Sülfidin peroksidazlar tarafından katalizlenen oksidasyonu sonucunda sülfür trioksit anyon radikali ( $\bullet\text{SO}_3^-$ ) (6), bunu takip eden zincir reaksiyonlarında peroksil radikali ( $\text{O}_3\text{SOO}\bullet$ ) ve sülfat anyon ( $\text{SO}_4^{-\bullet}$ ) radikali ortaya çıkar (6). Ayrıca,  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin peroksinitrit ile birçok reaksiyonu sonucunda da sülfür merkezli serbest radikaller meydana gelir (7). Serbest radikaller, hücrenin yapı taşları olan lipidler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitlere zarar verip fonksiyonlarını bozmaktadır (8). Özellikle beyin ve retinada doymamış yağ asitlerinin bol miktarda bulunması (9, 10), bu dokuları serbest radikallere karşı daha duyarlı hale getirmektedir. Böylece, membran lipidlerinin oksidasyonu sonucu oluşan lipid peroksidasyon ürünleri membran fonksiyonlarında önemli değişikliklere yol açmaktadır. Dolayısıyla,  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin oluşturduğu görsel sistem değişikliklerinde lipid peroksidasyonun rolünün olabileceği en doğal beklentidir. Nitekim  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin görsel sistemi etkilediği, daha önce yapılan elektrofizyolojik çalışmalarımızda gösterilmiştir (10, 11).

Sülfidin toksik etkileri daha çok solunum sistemi üzerinde çalışılmıştır. İnhalasyonla alınan  $\text{SO}_2$  gazının bronkokonstriksiyon, alveol hiperplazisi, akciğer ödemi, akciğer kanserine yatkınlık gibi pek çok direkt etkisi gösterilmiştir. Ek olarak, akciğer ve kalp hastalıklarındaki artmış mortalite ve morbitide oranları ile havanın  $\text{SO}_2$  düzeyi arasındaki ilişki epidemiyolojik çalışmalarda gösterilmiştir (12, 13, 14). Oldukça reaktif bir molekül olan  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin solunum sistemi dışında, *in vitro* ve *in vivo* olarak başta nükleik asitler olmak üzere pek çok biyolojik moleküle reaksiyona girerek toksik etki gösterdiği pek çok çalışma ile teyit edilmiştir. Örneğin, *in vitro* çalışmalarda,  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin DNA'daki sitozin ve RNA'daki urasil ile reaksiyona girdiği, serbest radikal mekanizmalarıyla DNA ve RNA zincirlerine zarar verdiği, sülfür içeren proteinlerin disülfid bağlarının parçalanmasına sebep olduğu bildirilmiştir

(15,16). Sülfitin birçok dokuda olduğu gibi nöronlar üzerinde de toksik etkileri söz konusudur (17,18). Genetik olarak sülfid oksidaz eksikliği olan hastalarda yapılan çalışmalarda, endojen  $\text{SO}_3^{-2}$ 'ye maruz kalma sonucu şiddetli nörolojik disfonksiyon, mental gerilik, beyin gelişiminin yavaşlaması (19) ve erken ölümle karakterize olan vakalar tespit edilmiştir (20). Tüm bu çalışmalarda  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin toksisitesinde kükürt ve oksijen merkezli serbest radikallerin önemli bir yer tuttuğu görülür.  $\text{SO}_3^{-2}$ 'ye maruz kalma ile oluşan doku hasarı hem serbest radikal artışına, hem de antioksidan kapasitenin azalmasına bağlanmaktadır (21-26).

Sülfid'in en önemli nörotoksik etkilerinden biri de, glutatyon (GSH) miktarını azaltmasıdır (27). Bilindiği gibi GSH, antioksidan savunma sisteminin önemli bir ögesi olup serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmayı korur. Sülfitin düşük moleküler ağırlıktaki tiollerin (glutatyon ve sistein) veya protein gibi makromoleküllerin disülfid bağlarıyla sülfidolizis reaksiyonuna girerek S-sülfonatları oluşturması GSH düzeyini düşürür (2, 28). Zira  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin okside glutatyon (GSSG) ile reaksiyona girerek oluşturduğu S-sulfoglutatyon ( $\text{GSSO}_3$ )'un glutatyon redüktaz (GR) tarafından tekrar GSH'ye dönüştürülememesi GSH'nin azalmasına yol açar. GSH'un bu mekanizma ile tüketilmesi, antioksidan savunma sisteminin zayıflamasına ve serbest radikallerin indüklenmesine yol açar. Bu etkiye ek olarak  $\text{GSSO}_3$  molekülünün benzo( $\alpha$ ) piren gibi polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) detoksifikasyonunda görev alan glutatyon S-transferaz (GST) enzimini inhibe ettiği bildirilmiştir (29). Bu bulgu Alzheimer hastalığında ksenobiyotik metabolizmasındaki bozuklukların gösterilmesi ile klinik olarak da desteklenmiştir (30). Bu iki etki beraber düşünüldüğünde hücrelerin toksinlerin etkilerine karşı oldukça dayanıksız olacağı açıktır. Nitekim bu düşünceden yola çıkılarak yapılan deneysel çalışmalarda GSH içeriği azaltılmış sıçan mezensefalik hücre dizilerinde  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin hücre canlılığını önemli oranda azalttığı gösterilmiştir (31). Çalışmamızda, serbest radikallerin artışına paralel olarak antioksidan kapasitenin azaldığı da dikkate alınarak, farklı dozlarda  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin, okside-redükte GSH mekanizmalarına olan etkileri araştırılmış ve literatüre yeni bilgiler eklenmesi planlanmıştır. Bu amaçla,  $\text{SO}_2$ 'ye maruz kalmanın bir göstergesi olarak kabul edilen ve tüm canlı dokularında saptanan S-sülfonat düzeyleri de ölçülmüştür.

Çeşitli motor nöron hastalıklarında, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarda kükürt içeren aminoasit metabolizmasında anormallikler saptanmış olması  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin nörotoksite açısından önemini işaret etmektedir (18, 32). Böylece, daha önce yapılan çalışmalar doğrultusunda,  $\text{SO}_3^{-2}$ 'ye maruz kalmanın yaratacağı toksik etkilerden korunmak için hava ve besindeki miktarları için limitler konmuştur. Bu limitlere göre,  $\text{SO}_2$  ile kirliliğin günün herhangi bir diliminde 0.14 ppm'i, iş yerlerinde ise 2 ppm'yi geçmesi (33), besinlerle alınımı durumunda ise, Dünya Sağlık Örgütü Besin Katkı Maddeleri Komitesince (FAO/WHO) günlük kabul edilebilir (acceptable daily intake=ADI) doz olarak belirlenen 0.7 mg  $\text{SO}_2$ /kg düzeyini geçmesi toksik olarak kabul edilmiştir (34). Günümüzde Dünya Sağlık Örgütü'nün maksimum 0.7 mg/kg olarak kabul ettiği günlük  $\text{SO}_2$  alımı düzeyi, Til ve arkadaşlarının sıçanlarda yaptığı çalışmadan (35) elde ettikleri sonuçlara dayanmaktadır. Bu araştırmacı grubunun kullandıkları ve herhangi bir zararlı etki bulamadıkları % 0.25  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  içeren yemin tüketilmesi, yaklaşık olarak günde 72 mg  $\text{SO}_2$ /kg alımına karşılık gelmektedir (36). Dünya Sağlık Örgütü'nün ilgili komitesi buna 100 katlık bir

güvenlik faktörünü de ekleyerek 0.7 mg SO<sub>2</sub>/kg alımının zararlı bir etkisi olmayacağını bildirmiştir. Çeşitli deneysel ve klinik araştırmalar sonucu ortaya konan bu rakamların doğrultusunda, besin katkı maddesi olarak SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>, Genellikle güvenli olarak kabul edilen (Generally Recognized as Safe-GRAS) maddeler arasında kabul edilmektedir. Sülfitin güvenli katkı maddeleri arasında sayılmasına iki noktada eleştiri yapılmaktadır. Bunlardan ilki, günlük SO<sub>3</sub><sup>-2</sup> alımının yukarıda verilen rakamlarla uyumlu olmadığı şeklindedir. Yapılan çalışmalarda, besin alışkanlıklarının farklılığından dolayı SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>'ye maruz kalmanın bireyden bireye değişebileceği ve normal bir restaurant öğünündeki SO<sub>3</sub><sup>-2</sup> düzeyinin bile 25 ile 100 mg arasında farklılık gösterebileceği bildirilmiştir. (1, 9) Ayrıca, pek çok besinin değişik düzeylerde SO<sub>3</sub><sup>-2</sup> içerdiği (1, 4) dikkate alındığında beslenme alışkanlığına göre örneğin sos, sucuk, kurutulmuş meyve, bira ve şarap gibi gıdaları tüketenlerde günlük kabul edilebilir (0.7 mg SO<sub>2</sub>/kg) alımın kolaylıkla aşılabileceği açıktır. Nitekim, günlük SO<sub>3</sub><sup>-2</sup> tüketiminin hesap edildiği az sayıdaki çalışmada bu sınırın hayli üstüne çıktığı görülmüştür. Bu çalışmalarda bir restoran öğününün dahi 200 mg SO<sub>3</sub><sup>-2</sup> içerebileceği ve bir tahminle Amerikan popülasyonunun % 99'unun yiyecek ve içeceklerle günlük ortalama 163 mg SO<sub>3</sub><sup>-2</sup> tükettiği hesaplanmıştır (1, 4). Yiyecek ve içeceklerle birlikte hava kirliliği ve SO<sub>3</sub><sup>-2</sup> içeren çeşitli ilaçlar birlikte düşünüldüğünde, SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>'ye maruz kalmanın 163 mg/gün düzeyinin de üzerine çıkması kuvvetli bir olasılıktır.

Bu bilgiler ışığında, SO<sub>3</sub><sup>-2</sup> içeren yiyeceklerin tüketiminin arttığı günümüzde insan sağlığının olumsuz yönde etkilenebileceği beklenen bir sonuçtur. Bu nedenle, çalışmamızda besin yoluyla farklı dozlarda alınan SO<sub>2</sub>'nin etkilerinin elektrofizyolojik ve biyokimyasal parametreler yardımıyla aydınlatılması hedeflenmiştir.

Farklı dozlarda verilen SO<sub>2</sub>'nin görsel sistemde oluşturduğu değişikliklerde lipid peroksidasyonun rolü ve mekanizmasına ışık tutmak amacıyla planlanan bu çalışmamızda, elektrofizyolojik parametrelerden biri olan görsel uyarılma potansiyelleri (VEPs) kullanılmıştır. Görsel uyarılma potansiyellerinin tercih edilme nedeni, görsel sistem değişikliklerini ortaya koyan duyarlı ve güvenilir bir yöntem olarak bir çok araştırmacı tarafından kabul edilmesidir (37-39). Özellikle VEP latenslerinin optik yol patolojisine paralel olarak uzadığı ve bu nedenle VEP'lerin klinik amaçla kullanılabilmesi birçok çalışmada ortaya konmuştur (38, 40-42). Ayrıca, sıçanların görsel sisteminin insanlara benzer olması nedeniyle, sıçanlarda kaydedilen VEP'lerin insan sağlığı üzerine olan olumsuz etkileri yansıtmada iyi bir model olduğu vurgulanmaktadır (43). VEP'lerin nörotoksik çalışmalarda kullanılması, ilk olarak karbonmonoksit'in (CO) merkezi sinir sistemine etkilerinin incelenmesi amacıyla başlamıştır (39).

Bu çalışmamızda lipid peroksidasyonu değerlendirmek için tiyobarbitürik asit reaktif ürünleri (TBARS) ve 4-hidroksi-2-nonanal (4-HNE) düzeyleri ölçülmüştür. Daha önceki bazı araştırmalarda, tiobarbitürik asitin malondialdehid (MDA) dışında diğer bileşiklerle de (aminoasitler, şekerler, lipid oksidasyon ürünleri) etkileşime girmesi nedeniyle, TBARS yönteminin yeteri kadar duyarlı olmadığı ileri sürülmektedir. Dolayısıyla, son yıllarda, daha duyarlı olduğu kabul edilen bazı yöntemler geliştirilerek TBARS yerine bunların lipid peroksidasyon indeksi olarak kullanılması önerilmektedir. Ancak, daha özel yöntemler geliştirilmesine karşın, çok basit ve hızlı olması, ölçülen ürünlerin çoğunluğunu MDA'nın teşkil etmesi



nedeniyle, TBARS halen bir çok araştırmada tercih edilmekte ve kullanılmaktadır (44, 45). Bu bilgilerin ışığı altında, verilerin güvenilir olabilmesi amacıyla TBARS yöntemi yanında, daha duyarlı olduğu vurgulanan yöntemlerden biri olan 4-HNE tayini araştırmamızda tercih edilerek,  $SO_3^{-2}$ 'nin beyin ve retina dokularında oluşturabileceği moleküler oksidasyonun tespit edilmesi amaçlanmıştır.

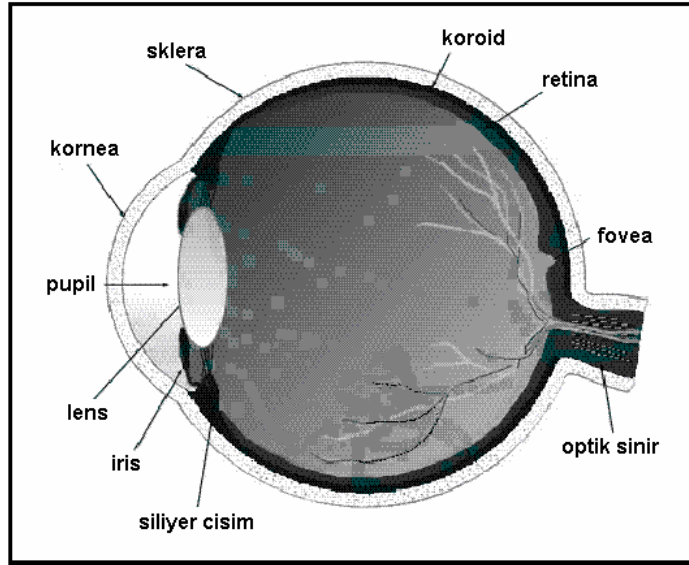
Özet olarak, deneysel protokolümüzde farklı dozlarda  $SO_3^{-2}$ 'ye maruz kalan sıçanların beyin ve retina dokularında oluşan moleküler oksidasyon, elektrofizyolojik ve biyokimyasal yöntemler ile değerlendirildi ve VEP değerliklerinin mekanizması aydınlatılmaya çalışıldı. Çalışmamızda, serbest radikallerin artışına paralel olarak antioksidan kapasitenin azaldığı da dikkate alınarak, farklı dozlarda  $SO_3^{-2}$ 'nin, okside-redükte GSH düzeylerine olan etkileri araştırılarak literatüre yeni ve kapsamlı bilgiler katılması hedeflenmiştir. Buna ilaveten,  $SO_2$ 'ye maruz kalmanın bir göstergesi olarak kabul edilen ve tüm canlı dokularında saptanan S-sülfonat formu (28) da ölçülerek  $SO_3^{-2}$ 'nin dozu ile elektrofizyolojik değerlikler arasındaki ilişki açıklanmaya çalışılmıştır.

## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Görsel Sistem Ve Görsel Uyarılma Potansiyelleri

#### 2.1.1. Görme Sistemi

Görme organı olan göz, ışığı odaklayacak mercek sistemine, bu ışığı algılayan reseptör tabakasına ve bu uyarıları merkeze iletecek sinir sistemine sahip bir organdır (46). Göz, dıştan içe doğru sklera, koroid ve retina olmak üzere üç tabakadan oluşur (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Gözün yapısı

Sklera gözün ön tarafında korneayı oluşturur. Göz merceği ve kornea gelen ışığı kırarak retinanın üzerine düşmesini sağlarlar. Işığı retinanın üzerine düşürmek için merceğin şeklini değiştirmesine akomodasyon denir. Merceğin şekli, zonular liflerle bağlı, silyer kaslarla kontrol edilir. Yakın cisimlerde kaslar kasılır ve merceğin küreselliği artar (46). Silyer kas, hemen tümüyle beyin sapındaki üçüncü kafa çiftinin çekirdeğinden (edinger westpal) göze iletilen parasempatik sinir sinyalleri ile kontrol edilir. Parasempatik sinirlerin uyarılması silyer kasın kasılmasına ve mercek bağlarının gevşemesiyle merceğin kırma gücünün artmasına yol açar. Kırma gücünün artması ile göz, yakın nesnelere odaklanma özelliği kazanır. Bu nedenle, uzakta yer alan bir nesne göze yaklaştıkça, gözün nesneyi

odaklayabilmesi için, silyer kasa ulaşan parasempatik impulsların sayısı gittikçe artmalıdır (47).

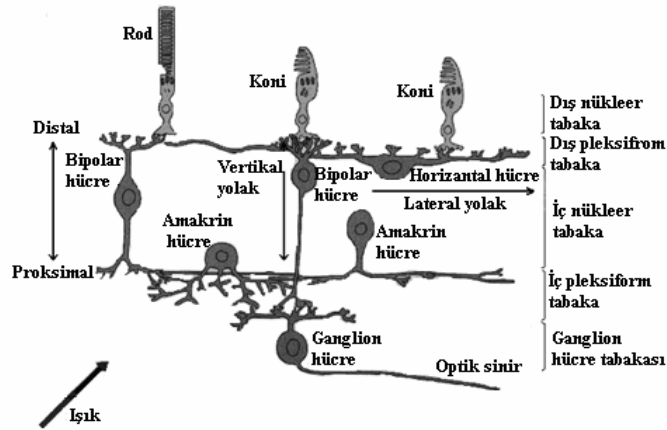
Göze giren ışığın miktarı ise pigmentli bir kas olan iris tarafından kontrol edilir. İrisin ortasında ışığın göze girdiği bölge olan pupil vardır. Göze fazla ışık geldiği zaman pupil daralarak fazla ışık girmesini engeller, az ışık geldiği zaman ise genişler (46).

### Retina Gözün Reseptör Tabakasını İçerir

Işık, kornea ve mercek tarafından odaklanarak göz çukurunu dolduran vitreus sıvıdan geçerek retinadaki fotoreseptörlere ulaşır. Retinanın en alt katmanında bulunan pigment epitelyum hücreleri, siyah pigment melanin sıvısıyla doludur ve bu sıvı retinayı geçebilen tüm ışıkları soğurur. Bu, ışığın, gözün arka kısmından tekrar retinaya yansımaya engel olur.

Fotoreseptörler gözün arka kısmında, pigment epitelyumun hemen önünde olduğu için diğer tüm retina hücreleri fotoreseptörlerin önünde, merceğe yakın yüzeydedir. Bu nedenle, ışık fotoreseptörlere çarpmadan önce diğer retinal nöron katmanlarından geçer. Işık emilmeden veya dağılmadan (ki bu durum görüntüyü bozar) fotoreseptörlere ulaşmasına imkan vermek için, retinanın proksimal katmanlarındaki nöronların aksonları miyelinize edilmemiştir, böylece bu hücre katmanları göreceli olarak saydam (transparan) olur. Ayrıca, fovea' da proksimal retinal nöronların hücre gövdelerinin yanlara doğru kayması oradaki fotoreseptörlerin en az zarar görmüş şekilde görüntüyü almalarına imkan verir. Bu kayma en çok fovea'nın merkezi olan foveola'da belirgindir. Bu nedenle insanlar ilgilendikleri şeyin görüntüsünün fovea'ya düşmesi için sürekli olarak gözlerini oynatırlar. Retinada ayrıca, optik disk adı verilen, optik sinir liflerinin retinayı terk ettiği, bir bölüm vardır. Bu bölgede fotoreseptör yoktur ve görsel anlamda kör noktadır (48).

Retinanın tabakalar halinde düzenlenmiş işlevsel bileşenleri Şekil 2.2'de gösterilmiştir. Işık ilk olarak ganglion hücrelerinden, pleksiform ve nükleer tabakadan ve son olarak koni ve basil tabakasına ulaşmadan önce sınırlayıcı zarlardan geçer.



Şekil 2.2. Retinal nöronların organizasyonu (48)

## İki Tür Fotoreseptör Vardır: Rodlar ve Koniler

İnsan retinası iki tür fotoreseptör içerir; rodlar ve koniler. Koniler gündüz görüşünden sorumludur ve konilerin fonksiyonunu doğru olarak yerine getiremediği kişiler renk körü olarak adlandırılır. Rodlar gece görüşünü kontrol eder ve tamamen kaybedilmesi sadece gece körlüğüne neden olur. Rodlar özellikle ışığa duyarlıdır bu nedenle pek çok uyarıcının konileri harekete geçirmek için fazla zayıf kaldığı akşam üzeri veya gece loş ışıkta fonksiyonlarını daha iyi yerine getirir.

Koniler, loş uyarıcıların fark edilmesi dışındaki tüm görsel işlemlerde rodlardan daha başarılıdır. Konilerle görüş, rodlarla görüşten daha keskindir ve görüşteki ani değişiklikleri daha iyi çözümler. Koniler ayrıca renk görüşünü de kontrol eder. Her ne kadar rod sistemi koni sistemine göre ışığa daha duyarlı olsa da akromatiktir. Performanslar arasındaki bu fark hem rod ve konilerin özelliklerinden hem de retinadaki diğer nöronlarla olan bağlantılarından kaynaklanmaktadır. Bu farklılığa yol açan en önemli faktörler Tablo 1'de özetlenmiş ve aşağıda açıklanmıştır (48).

**Tablo.2.1.** Rodlar ve Koniler arasındaki farklar (48)

Rod	Koni
İşığa aşırı duyarlılık, özellikle gece görüşü için tasarlanmıştır.	Daha az duyarlılık, gündüz görüşü için tasarlanmıştır.
Daha fazla fotopigment içerirler, daha fazla ışık emer	Daha az fotopigment içerirler.
Daha fazla amplifikasyon, tek foton tespiti	Daha az amplifikasyon
Düşük geçici çözünürlük: yavaş tepki, uzun uyum süreci	Yüksek geçici çözünürlük: hızlı tepki, kısa uyum süreci
Dağılım ışığa karşı daha fazla duyarlılık	Direk aksiyal ışınlarla daha fazla duyarlılık
Rod sistemi	Koni sistemi
Düşük keskinlik: merkezi fovea'da bulunmaz, yüksek yakınsamalı retina yolu	Yüksek keskinlik: fovea'da odaklanmış, dağınık retina yolu
Akromatik: tek tip rod pigmenti	Kromatik: üç tür koni, her biri ışığın farklı bir kısmına duyarlı ayrı pigment

Rodlar, konilerden daha fazla sayıda ışığa duyarlı görsel pigment içerir ve böylece daha fazla ışık absorbe edebilir. Tek bir foton rodta fark edilebilir elektriksel bir tepki yaratabilirken, benzer bir tepkinin konide oluşması için onlarca, yüzlerce fotonun absorbe edilmesi gerekir. Pek çok rodun, bipolar hücre olarak bilinen aynı hedef internöronunda sinapsı vardır. Bu nedenle, roddan gelen sinyaller bipolar hücrede toplanır, birbirini tetikleyerek her bir bağımsız reseptördeki ışığın yarattığı sinyalleri güçlendirir ve böylece beynin loş ışığı algılamasını kolaylaştırır. Bunun aksine, foveoladaki konilerin çapları küçük olmasına ve birbirlerine yakın olarak yerleşmelerine rağmen her bir bipolar hücre tek bir koniden girdi alır (48).

Her biri ışık tayfının farklı bir bölgesine duyarlı üç tip koni vardır. Beyin bu üç tür koninin tepkilerini karşılaştırarak renkle ilgili bilgi edinir. Aksine, rodlar sadece tek bir tip pigment bulundurur ve bu nedenle farklı dalga boylarına aynı şekilde yanıt verir.

Her ne kadar rodlar konilerden 20 kat kadar daha fazla olsalar da, koni sisteminin iki nedenden dolayı daha iyi bir mekansal çözümlemesi vardır. İlki, pek çok komşu rod tek bir bipolar hücrede birleştiği için rodların yanıtlarındaki farklılıkların internöronda ortalaması alınmaktadır. İkincisi, koniler fovea'da daha yoğun olarak bulunmaktadır.

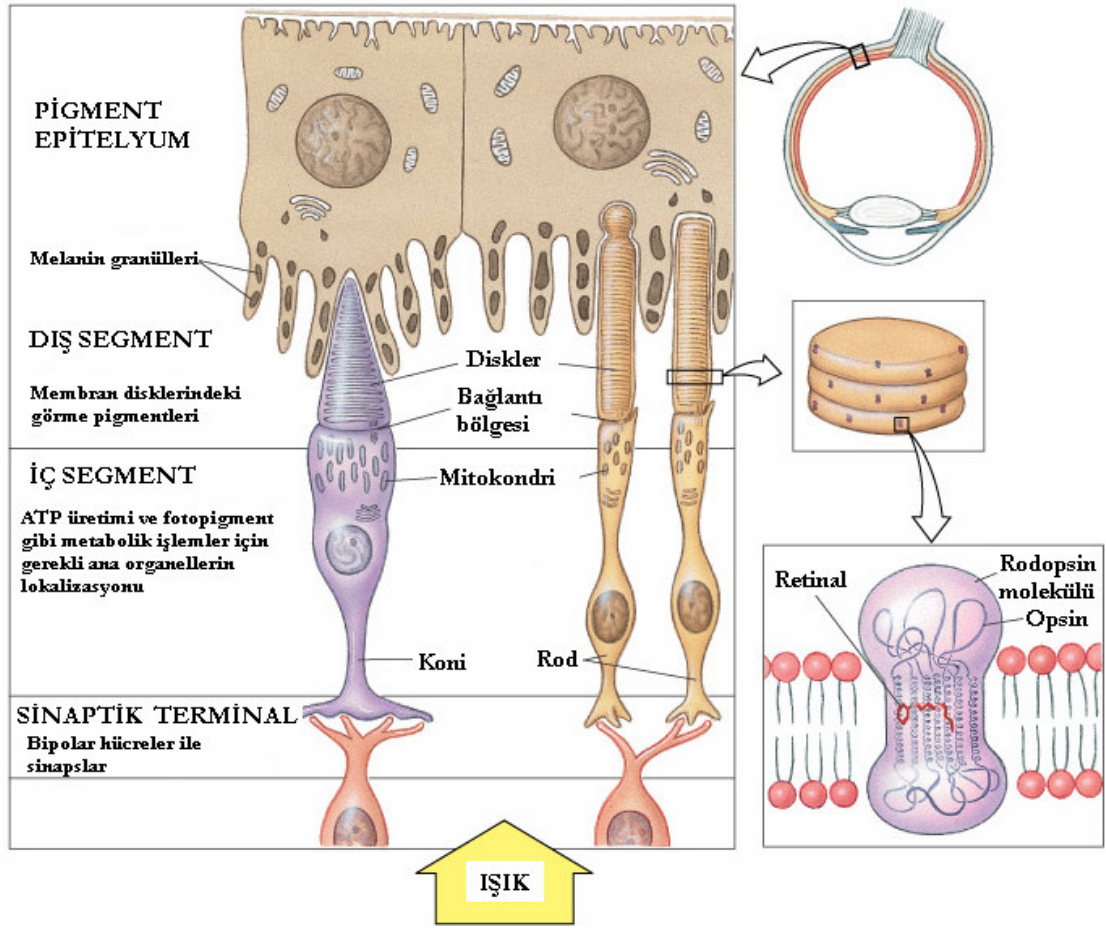
Rodlar ve konilerin üç temel fonksiyonel bölgeleri vardır (Şekil 2.3) (47,48):

1. Dış segment, retinanın dış veya distal bölümünde yer alır, fototransdüksiyonu gerçekleştirir
2. İç segment, retinanın içinde daha proksimal olarak yerleşmiştir, hücrenin çekirdeğini ve pek çok biosentetik parçasını içerir.
3. Sinaptik terminal, fotoreseptörlerin hedef hücreleri ile bağlantısını sağlar.

Rod ve konilerin dış çeperleri ışığı emen görüntü pigmentleriyle doludur. Rodlarda tek tip konilerde ise üç tip (mavi, yeşil ve kırmızı) görme pigmenti bulunur. Her pigment molekülü, membran boyunca büyük proteine bağlanmış ışığı absorbe eden küçük moleküller içerir. Rodlar ve koniler, bu moleküllerden çok sayıda içerir (her hücrede  $10^8$  tane) ve hücrelerde zarın yüzey alanını ciddi biçimde genişleten, zarımsı disklere dönüşmüşlerdir. Bu diskler hücrenin plazma zarında bir dizi invajinasyon gerçekleştirir. Konilerde, diskler plazma zarının devamındayken, rodlarda plazma zarından ayrılmış ve hücre içi bir organel haline gelmiştir.

İç segment sitoplazma ve sitoplazmik organelleri içerir. Bu segmentteki mitokondriler fotoreseptör işlevi için enerji sağlamada önemli rol oynarlar. Sinaptik terminal, koni ya da rodun horizontal ve bipolar hücreler ile bağlantısını sağlayan bölümdür ve görme zincirinin bir sonraki aşamasını temsil eder (47). Koni ve basillerin her ikisi de ışığa maruz kaldıklarında parçalanmış kimyasal maddeler içerir ve sonuçta gözden çıkan sinir liflerini uyarırlar.

Diğer nöronlar gibi, fotoreseptörler bölünmez ancak dış bölümleri sürekli olarak yenilenir. Yeni diskler hızla oluşur, eski diskler ise pigment epitel hücrelerinin fagositik hareketleri ile atılır (48).



Şekil 2.3. Basil ve konilerin bölümleri (48)

### Fototransdüksiyon, Fotoreseptörlerindeki Üç Basamaklı Biyokimyasal Olaylar Zincirinden Doğar

1. Işık, fotoreseptörlerdeki pigment moleküllerini harekete geçirir.
2. Pigment moleküllerinin aktivasyonu, cGMP'nin sitoplazmik yoğunluğunu azaltır.
3. cGMP yoğunluğundaki azalma cGMP'ye duyarlı kanalları kapatır ve fotoreseptörleri hiperpolarize eder.

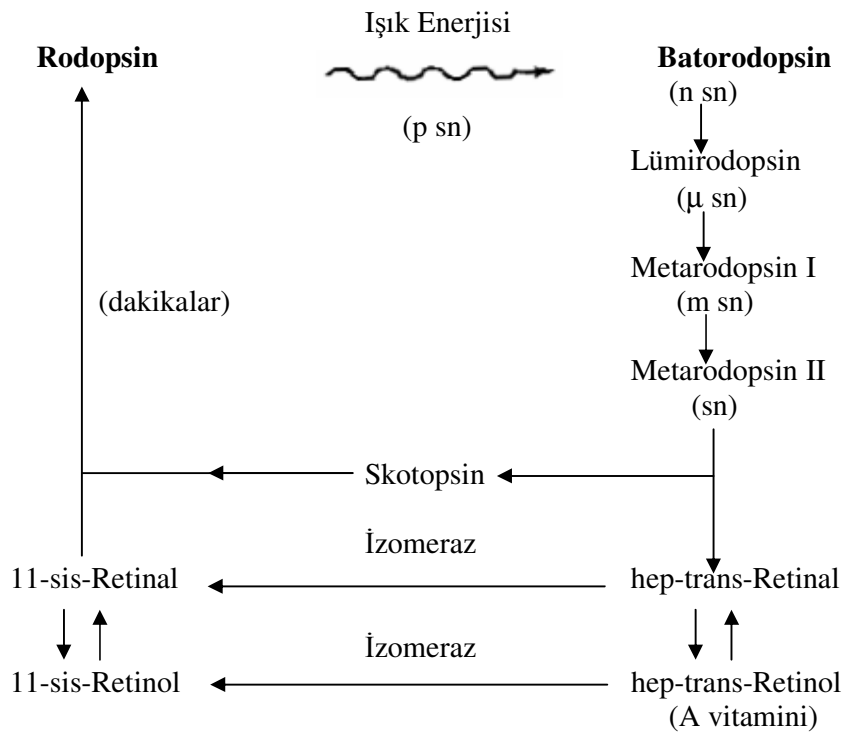
Işık enerjisi rodopsin tarafından soğurulduğunda saniyenin trilyonda biri kadar bir süre içinde parçalanmaya başlar (Şekil 2.4). Bunun nedeni rodopsinin retinal bölümündeki elektronların ışıkla aktive olmalarıdır. Bu parçalanma sonucunda ortaya çıkan batorodopsin nanosaniyeler içinde lümirodopsine dönüşür. Lümirodopsin mikrosaniyeler içinde metarodopsin I'i, sonra yaklaşık bir milisaniye içinde metarodopsin II'yi ve sonuçta çok daha yavaş bir şekilde tamamen parçalanmış ürünler olan skotopsin ve hep-trans retinali oluşturur (47).

Hep-trans retinal, ilk olarak A vitaminin bir şekli olan hep-trans retinole dönüşür. Sonra hep-trans retinol, izomeraz enziminin etkisiyle 11-sis retinole

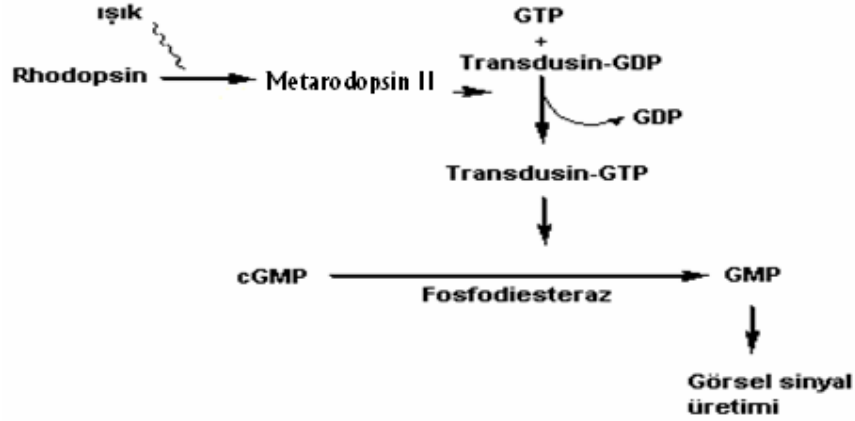
dönüştürülür. Son olarak 11-sis retinol skotopsinle birleşerek 11-sis retinali oluşturur (47).

Işık 11-sis retinali aktive eder. Metarodopsin II, transdusini (G proteini) aktif hale getirerek, fosfodiesteraz enziminin aktivasyonunu sağlar. Bu enzim cGMP'yi hidrolize ederek konsantrasyonunu düşürür (Şekil 2.5). cGMP bağımlı kanallar ( $\text{Na}^+$  ve  $\text{Ca}^{2+}$ ) kapanır ve fotoreseptör hiperpolarize olur. Hiperpolarizasyon fotoreseptörün ucuna pasif olarak iletilir ve hücreden nörotransmitter salınımı azalır.

Daha sonra Ca kanallarının kapanması nedeniyle Ca konsantrasyonunda ki düşüş, kalsiyuma duyarlı proteini aktifleştirerek, guanilat siklaz (GC)'a bağlanmasına ve daha fazla cGMP üretilmesine neden olur. Bu da  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarının açılmasını ve hücrelerin tekrar dinlenme durumuna dönmesini sağlar (46).



Şekil 2.4. Basildeki rodopsin-retinal döngüsü (47)



**Şekil 2.5.** cGMP'nin görmedeki rolü

### Görme Sisteminin Nöral Yolağı

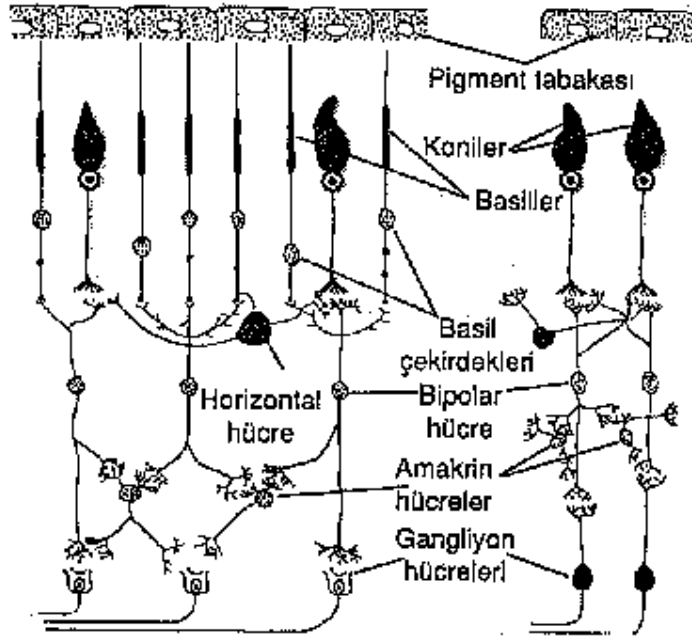
Fotoreseptörler ve ganglion hücreleri arasında üç sınıf internöron vardır: bipolar, horizontal ve amakrin hücreleri. Bu hücreler yalnızca sinyalleri fotoreseptörlerden ganglion hücrelerine yansıtırlar. Aynı zamanda, çeşitli fotoreseptörlerden gelen sinyallerin ganglion hücrelerinde oluşacak elektriksel yanıtlarını, retinayı uyaran ışığın kesin yer ve zaman düzenine bağlı olacak şekilde birleştirir. Her retinal internöron türü (yatay, bipolar ve amakrin), retina aracılığıyla iletilen fotoreseptör sinyallerinin şekillenmesinde önemli bir rol oynar (48). Rodlar ve koniler sinyalleri dış pleksiform tabakaya iletirken bipolar hücreler ve horizontal hücreler ile sinaps yaparlar (Şekil 2.6). Gangliyon hücreleri ise çıkış sinyallerini retinadan optik sinir aracılığıyla beyne iletirler (47).

Retinal gangliyon hücreleri, kontrast, ani değişimler, görüntünün renk, şekil ve hareket gibi farklı özelliklerine bağlı gelişen sinyalleri iletirler. Bu özellikler görme korteksinde paralel yollarda (yolak/pathway) işlenmektedir. Bu paralel süreç, paralel gangliyon hücreleri şebekesi ile, retinada başlar.

Retinanın her bölgesinde, aynı fotoreseptörlerden sinyalleri paralel yollarla ileten, fonksiyonel olarak farklı ganglion hücresi alt grupları vardır. Primat retinasındaki pek çok ganglion hücre iki fonksiyonel sınıfa ayrılır: M (magno, büyük) ve P (parvo, küçük). Her iki sınıfta da merkez ve merkez-dışı hücreler vardır.

M hücrelerinin büyük alıcı alanları vardır ve devamlı aydınlanmaya geçici olarak tepki verirler. Optimum olarak büyük nesnelere tepki verirler ve uyarıcılardaki ani değişiklikleri fark edebilirler. Daha küçük olan P hücreleri, her ne kadar bazı M hücreleri de bu fonksiyona dahil olsa da, görüntüdeki detaylardan sorumlu olarak kabul edilir.

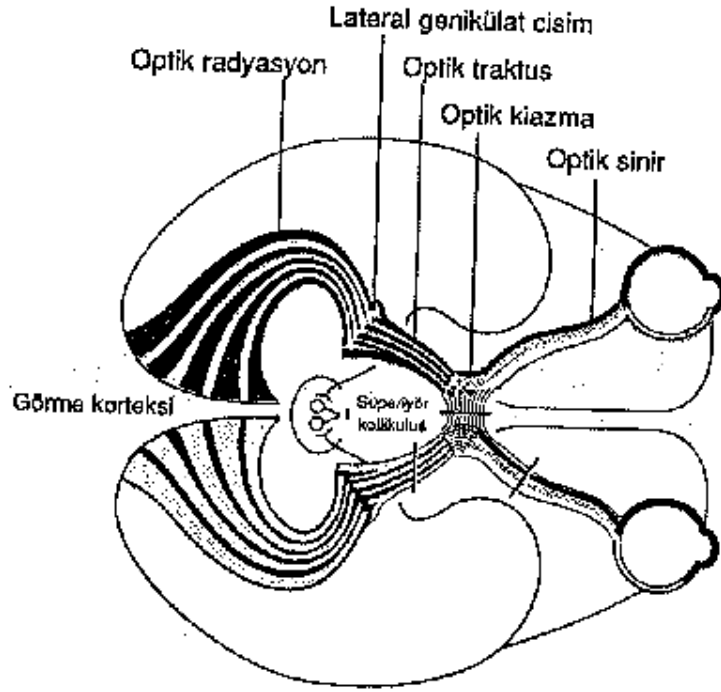




Şekil 2.6. Retinanın nöral organizasyonu (47)

Primat retinası ayrıca P veya M sınıflarına girmeyen ganglion hücreleri içerir. Bu hücrelerin fonksiyonları pek bilinmemektedir. Ancak genel olarak ışığın yoğunluğu hakkında bilgi verdiği bilinmektedir (48).

Gangliyon hücrelerinin aksonları beyne giden optik siniri (kranial sinir II) oluştururlar. İki optik sinirin buluştuğu yere optik kiazma denir. Retinanın nazal yarımından gelen lifler optik kiazmada çaprazlaşarak, temporal yarımdan gelenler ise çapraz yapmadan dorsal genikülat nükleus (dLGN)'a girerler ve sinaps yaparlar (Şekil 2.7). Dorsal genikülat nükleus altı nükleer tabakadan oluşmuştur. 2, 3 ve 5. tabakalar sinyalleri retinanın temporal bölgesinden alırken 1,4 ve 6. tabakalar sinyalleri karşı gözün nazal retinasından alırlar (47). Dorsal genikülat nükleusda P hücrelerinden sinyalleri alan parvoselüler (3, 4, 5 ve 6. tabakalar), M hücrelerinden sinyalleri alan magnoselüler tabaka (1. ve 2. tabakalar) olmak üzere iki alt tabaka bulunmaktadır. Bu tabakada bulunan nöronlar morfolojik ve fizyolojik olarak farklılık gösterirler (47, 49, 50).



Şekil 2.7. Gözlerden görme korteksine giden temel görme yolları (47)

Parvoselüler ve magnoselüler tabakada bulunan nöronlar görsel korteksin farklı tabakalarına parvoselüler ve magnoselüler sistem olarak isimlendirilen ayrı kortikal yollarla ulaşırlar (Şekil 2.8) (48). Diğer yandan, hem parvoselüler hem de magnoselüler yoldan primer görme korteksine (17. alan) giriş yapan üçüncü bir sistem de bulunmuştur. Diğer iki yoldan tamamen farklı olan bu sistem renkli görmeden sorumlu olup, mitokondriyal bir enzim olan sitokrom oksidazı bol miktarda içeren ve renk damlaları (blob) adı verilen bölgelerde (17. bölge) sonlanır. Magno sistem hareket ve derinlik algılanmasından, parvosistem şekillerin ayırt edilmesinden ve hızlı yersel değişikliklerin algılanmasından, blob sistem ise renkli görmeden sorumludur (51).

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 genikülata uzanan kortikofugal lifler, ikincisi ise mezensefalonun retiküler alanlarından gelen liflerdir.

Dorsal genikülat nükleustan çıkan görsel bilgi sinyalleri optik radyasyon yolu ile oksipital lobun kalkarin bölgesindeki primer görme korteksine ulaşır. Primer görme korteksi, altı tabakadan oluşmuştur. Dorsal genikülat nükleustan gelen aksonlar genellikle 4. tabakada sonlanır. Bu tabakada a,b,c alfa, c beta olmak üzere 4 farklı katman ayırt edilir. dorsal genikülat nükleusun parvoselüler tabakasından gelen

aksonlar katman 4 c'nin derin bölgelerinde sonlanırken magnoselüler tabakadan gelen aksonlar ise genellikle daha yüzeysel bölümlerinde sonlanır (47).

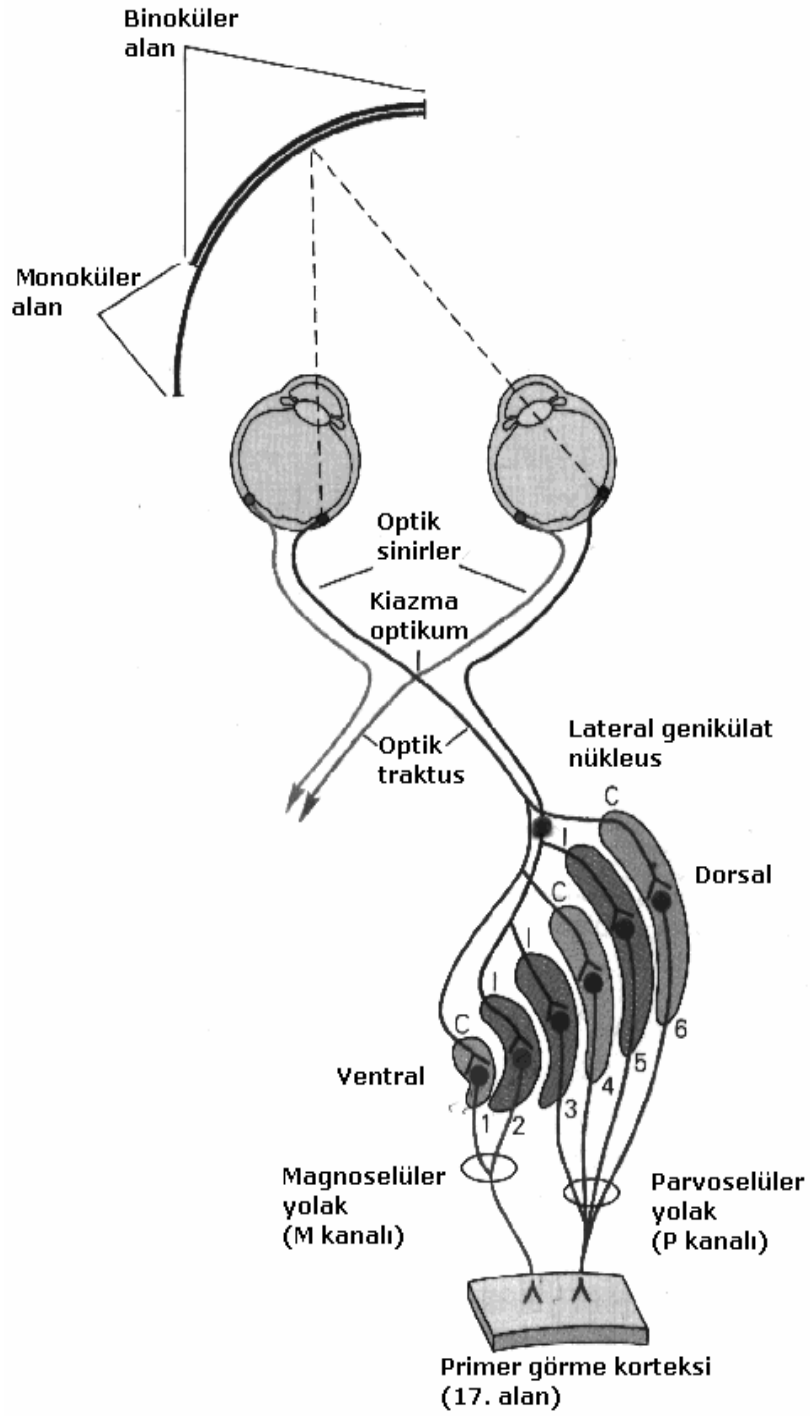
Bunlara ek olarak görme liflerinin beynin farklı bölgelerine;

- 1- Sirkadyen ritmin kontrolünü sağlamak üzere hipotalamusun supra kiazmatik 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 (49).

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

**Primer görme korteksi:** Primer görme korteksi kalkanin fissür alanında her bir korteksin medial bölümünde oksipital kutba doğru uzanır. Bu bölge brodmanın 17. kortikal alanıdır ve primer görme alanı (V-1) olarak adlandırılır. Aynı zamanda çizgili görünüşünden dolayı striat korteks de denir (49, 52).

**Sekonder görme korteksi:** Sekonder görme korteksine görsel asosiyasyon alanları da denir. Primer görme korteksinin lateral, anterior, süperior ve inferiorunda uzanır. Görsel uyarıların analizi için primer görme korteksinden gelen sinyallerin iletildiği alanlardır. Primer görme korteksini çepeçevre saran brodmanın 18. alanı sekonder görme alanı (V-2) olarak adlandırılır. Ayrıca V-3, V-4 gibi yarım düzineden fazla uzak sekonder görme alanları vardır (49, 52).



**Şekil 2.8.** Lateral genikulat nükleus görsel bilginin işlendiği temel subkortikal bölgedir (48).

### 2.1.2. Sıçan Görme Sistemi

Sıçanlarda, dLGN, parvoselüler ve magnoselüler diye ayrılmamıştır ve ayrı görsel alt sistemler tanımlanmamıştır. Sıçanlar, insanlara göre, retinada, dLGN'de ve görme korteksinde çok az özelleşme gösterirler. Sıçanlar renkli görmeden (53) ve tahminen blob sisteme karşılık gelen bir sistemden yoksundurlar. Sıçanların temporal (zamansal) frekansları ayırt etme yetenekleri vardır. Magno sisteme karşılık gelen bir sistem varken, parvo sistemine karşılık bir sistemlerinin olduğu şüphelidir. Çünkü uzaysal rezolüsyonları insanlarınkinden daha küçüktür (51).

Türler arası topografik özelleşme ve algı yeteneklerindeki farklılıklara rağmen, iki tür arasında nitelik olarak parvoselüler ve magnoselüler sistemlerinde benzerlik bulunmaktadır. Primatlara benzer olmakla birlikte, sıçanların görsel yolları fonksiyonel ve yapısal olarak aşağıda listelenen faktörlere göre bazı farklılıklar gösterirler.

- retinal ganglion hücrelerinin morfolojisi
- optik traktustaki sinir liflerinin hızı
- retinal ganglion hücrelerinin dLGN tabakalarındaki dağılımı
- talamokortikal projeksiyonların kortikal dağılımı ve ileti hızları
- dLGN'deki nöronların reseptif alan özellikleri
- görsel korteks

Bu nedenlerden dolayı, sıçanların görsel alt sistemleri açık değildir. Primer görme korteksinden input alan ekstrasitriyal görsel bölgeler diğer memelilerde olduğu gibi sıçanlarda da şekilli görmeyi sağlar (51).

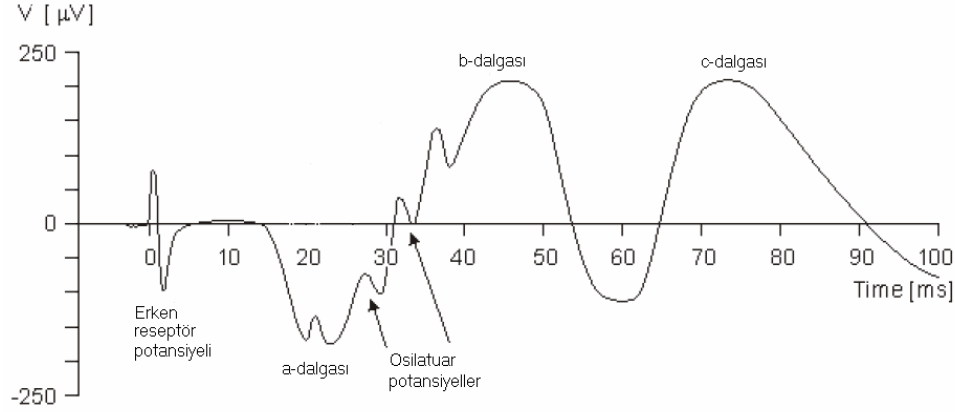
### 2.1.3. Elektrofizyolojik İncelemeler

#### 2.1.3.1. Elektroretinogram (ERG)

Görsel uyarıya cevap olarak retina tarafından oluşturulan elektriksel potansiyellere dayalı ERG genellikle korneaya yerleştirilen kontak lens elektrodu ile kaydedilir. ERG'ler ilk defa 1865 yılında Holmgren tarafından direkt olarak gözden kaydedilmiştir; ancak klinikte rutin kullanımı, güvenilir diferansiyel yükselteçler ve güvenli kontak lenslerin 1950'lerde gelişimine kadar gerçekleşmemiştir (54). Üç tip ERG mevcuttur, flaş ERG, fokal ERG ve pattern ERG.

Flaş ERG, ganglion hücrelerine kadar post sinaptik retina patolojilerini ortaya çıkarır ve dış retinal tabakaların entegrasyonu hakkında bilgi verir. Retinal cevap farklı retinal tabakalardan kaynaklanan dalgaların toplamıdır. Klinikte ERG, normal karanlığa adapte gözde erken reseptör potansiyelinden sonra değişik retinal elemanlarca üretilen başlıca üç bileşenden oluşur (Şekil 2.9);

- 1) Geç reseptör potansiyeli (a-dalgası),
- 2) Müller hücre potansiyelleri (b-dalgası),
- 3) İç retinal potansiyeller (osilatuar dalgalar).



**Şekil 2.9.** Elektroretinogram sinyalleri

Normal ERG dalga paterni, verilen görsel uyarana karşı gelişen negatif ve pozitif dalgalardan oluşur. Negatif “a” dalgası fotoreseptör potansiyelinin çıkan fazıyla oluşur. Büyük “b” dalgası Müller hücrelerinde meydana gelir ve glial hücrelerdeki  $K^+$  aracılı akımlarla ilgilidir. Müller hücre yanıtı, depolarize olan bipolar hücrelerin aktivitesini yansıtır. Osilatuar potansiyeller b-dalgasının çıkan fazında görülen dalga çıkıntılarıdır ve iç pleksiform tabakadan kaynaklanır. Klinikte çok önemli olmayan c-dalgası ise pigment epitel hücrelerince oluşturulur ve b-dalgasını takiben gözlenir (55, 56).

ERG için dalgaların normal sınırları

Parametre	Sınırlar (msn)	Ortalama $\pm$ Standart Deviasyon
a dalga latensi	20,5 – 37,0	28,3 $\pm$ 3,0
b dalga latensi	38,0 – 55,5	47,3 $\pm$ 2,7

### 2.1.3.2. Elektroensefalogram ve Uyarılma Potansiyelleri

İnsan beyni  $10^{12}$  nöronu, bu sayının yaklaşık 50 katı glia hücresi ve bu hücreler arasındaki sürekli değişim gösteren etkileşimleri ile bilinen en karmaşık yapıyı oluşturmaktadır. Beynin işlevlerinin incelenmesinde bu yapıya açılan pencerelerden birini oluşturan beyin elektriksel aktivitesi 19. yüzyılda tanımlanmış olmasına karşın, sistematik olarak ilk kayıt Alman psikiyatrist Hans Berger tarafından 1920’li yılların sonunda gerçekleştirilmiş ve elektroensefalografi (EEG) olarak adlandırılmıştır.

Elektroensefalografi, geniş nöron gruplarının elektriksel aktivitelerindeki dalgalanmaları ortaya koymaktadır. Daha belirleyici bir tanımla EEG, yüzbinlerce nöronun toplam elektriksel aktivitesi ile ilişkili ekstrasellüler akımların ölçümüdür. Saçlı deri üzerinden kaydedilen elektriksel değişimler, elektrodun altında kalan alandaki kortikal nöronların aksiyon potansiyellerinden çok postsinaptik potansiyellerini yansıtmaktadır (55, 56).

Belirli bir uyarana cevap niteliğinde ortaya çıkan ve beyinden kaydedilen, ölçülebilir elektriksel büyüklüğe “uyarılma potansiyeli (evoked potential)” veya kısaca EP adı verilmiştir. Tek bir EP kaydı, uyarımın beyin elektriksel aktivitesinde ortaya çıkardığı değişiklikler ile beyin spontan aktivitesinin (Elektroensefalografi, EEG) toplamından oluşmaktadır. Tek bir EP’deki dalga ve tepelerden hangilerinin uyarım sonucu meydana geldiğini anlamak çoğu zaman mümkün olmadığından, EEG’nin temizlenmesi ve yalnızca uyarıya ilişkin yanıt potansiyellerinin elde edilmesi gerekmektedir. Bu sorun 1954 yılından sonra geliştirilen klasik ortalama yönteminin bilgisayara uyarlanmasıyla çözülmüştür. Klasik ortalama yönteminde, ardı ardına ölçülen EP’ler ölçüm sırasında üst üste eklenerek bunların zamansal ortalaması alınır. Böylece, uyarım ile ilgili olmayan ve rasgele bir biçimde ortaya çıkan EEG değişikliklerinin birbirini yok etmesi ve her uyarıya yanıt olarak aynı biçimde ortaya çıkan değişikliklerin ise birbirini desteklemesi sağlanır (57).

Uyarılma potansiyelleri, uyarılabilir dokularda çeşitli uyaranlarla ortaya çıkan, ekstrasellüler yapılardan türetilen elektriksel sinyaller olarak da tanımlanabilir. Bu potansiyellerin ölçülmesi insan sinir sisteminde normal veya patolojik fonksiyonların değerlendirilmesinde kullanılan zararsız bir yöntemdir. Ölçüm için senkronize bir uyarıyla önemli miktarda nöron uyarılması gereklidir. Uyarı olayında uyarılan hücrelerde ekstrasellüler volümden (+) iyonların içe net akımı doğar, böylece elektriksel çift kutup oluşur. Uyarı pratikte kayıpsız olarak uyarılabilen membranlar üzerinden iletilir. Korteksin karmaşık geometrisi, nöronal elemanların çokluğu ile uyarıcı ve inhibe edici çalışma sistemleri ve bilginin çok boyutlu yayılımı, kortikal iletilebilen uyarılma potansiyellerinin oluşumunu belirler. Potansiyel akımındaki belirleyici jeneratörler post-sinaptik potansiyeller olup, aksiyon potansiyellerinin görevi yoktur (58).

Uyarılma potansiyelleri subkortikal ve kortikal mekanizmalarla ilişkili olarak birçok bileşen içermektedir. Saçlı deri üzerine yerleştirilen elektrodlarla yapılan kayıtlar daha çok kortikal mekanizmaları yansıtmaya rağmen, uyarılmış potansiyellerin erken bileşenleri genel olarak subkortikal mekanizmalarla ilişkilidir (55,56).

Uyarılma potansiyelleri genellikle uyarının cinsine (işitsel, görsel) göre görsel uyarılma potansiyelleri (VEP-visually evoked potentials), beyin sapı işitsel uyarılma potansiyelleri (BAEP-brain stem auditory evoked potentials) ve somatosensoriyal uyarılma potansiyelleri (somatosensory evoked potentials) (55, 56) olarak isimlendirilir.

### **2.1.3.3. Görsel Uyarılma Potansiyelleri (VEP)**

İlk kez 1934 yılında Adrian ve Matthews tarafından ortaya konan görsel uyarılma potansiyelleri (visual evoked potentials, VEP), görsel bir uyarana karşı, korteksin oksipital bölgesinde oluşan uyarılmış potansiyellerdir (58, 59). Gelişen bilgisayar teknolojilerine paralel olarak, VEP’ler görsel sistem fizyolojisinin anlaşılması ve görsel yollardaki patolojilerin teşhisi için sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknik, görme keskinliği ve nöroanatomik değerlendirilmesi yanında, makular dejenerasyon, renk körlüğü, retrobulber nörit gibi oftalmolojik hastalıkların ve optiknörit, iskemik optik nöropati, demiyelinize hastalıkların

araştırılmasında kullanılmaktadır. Dolayısıyla, görme yolağındaki iletimi ve fonksiyonları yansıması nedeniyle, VEP'ler görsel sistemin değerlendirilmesi için kullanılan objektif bir yöntemdir.

Retinada ışık uyarımı ile provake olan potansiyel, optik sinir, kiyazma ve optik traktus yolu ile korpus genikülatum lateraleye gelir. Buradan kaynaklanan genikülokalkınarius lifleri, optik radyasyon içinde primer görme korteksinde sonlanır (Area 17). Buradan da sekonder (Area 18) ve tersiyer (Area 19) görme korteksine bağlantı sağlanır. VEP'in amacı retinokortikal iletimi ve görme korteksindeki aktiviteyi de kapsayan yüksek afferent görme merkezlerinin durumunu bildirir verileri elde etmektir (58).

Görsel sistemin elektrofizyolojik bir ölçümü olan VEP'lerde ortaya çıkan dalga formları, polarite ve ortaya çıkış zamanlarına göre adlandırılmaktadır. Görsel uyarımı takiben ortaya çıkan dalgalar polaritelerine göre, negatif (N) ve pozitif (P) olarak gösterilmektedir. Ortaya çıkış zamanlarına göre ise üç gruba ayrılarak incelenmiştir (60). Görsel uyarımı takiben ilk 10 ms'lik zaman içinde oluşan dalgalara kısa latensli (erken), 10 ile 50 ms'lik süre içinde oluşanlara orta latensli ve 50 ile 300 ms'lik süre içinde oluşanlara ise uzun latensli VEP'ler denir (Şekil 2.10) (60). Diğer EP'lerde olduğu gibi, VEP'lerin değerlendirilmesi için kullanılan en önemli parametreler içersinde dalgaların tepeden tepeye genlik değerleri ve latensleri yer alır. Latens, bir uyarı verildikten sonra oluşan dalga formunun, maksimum genliğe ulaştığı süredir.

VEP kayıtlarında, ilk ortaya çıkan dalga formunun pozitif olması nedeniyle ilk bileşen  $P_1$  olarak, diğerleri ise ortaya çıkış sürelerine göre  $N_1$ ,  $P_2$ ,  $N_2$ ,  $P_3$ ,  $N_3$  olarak isimlendirilir. VEP'lerin  $P_1$  bileşeninin nereden kaynaklandığı henüz tam olarak açıklığa kavuşmamakla birlikte, 17 ve 18a'da bulunan görsel alanların üst nasal kısımlarında olabileceği kanısı yaygındır (61). Yapılan çalışmalarda,  $N_1$  ve  $P_2$  bileşenlerinin genikulokortikal afferent girişlerin oluşturduğu kortikal cevaplar olduğu, lamina IV'teki stellate hücrelerinin hiperpolarizasyonu sonucu  $P_2$ 'nin, depolarizasyonu sonucu ise  $N_2$ 'nin oluştuğu ileri sürülmüştür (62, 63). Diğer yandan,  $P_3$ 'ün üst laminadaki piramidal hücrelerin eksitator postsinaptik cevaplarını yansıttığı belirlenmiştir (62).  $N_3$  jeneratörlerinin yüzeyel tabakalar boyunca dik olarak yayıldığı ve bu bileşenin, gövdeleri derin tabakalarda bulunan nöronların apikal dendritleri boyunca oluşan depolarizasyonunu yansıttığı ifade edilmiştir (64).

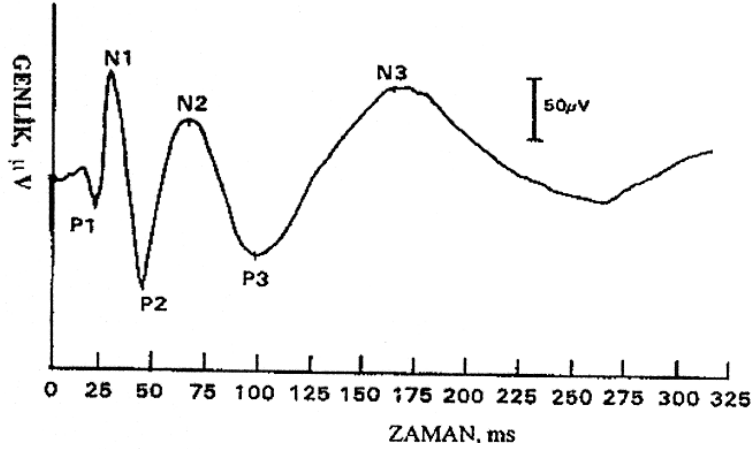
#### 2.1.3.4. VEP Kayıtları

**Aletler ve Elektrotlar:** VEP çalışmalarında, VEP sinyallerini amplifiye etmek için diferansiyel amplifikatör, sinyallerin ortalamasını almak için toplama cihazı ve sinyalleri görüntülemek ve kaydetmek için bilgisayar gereklidir. VEP kayıtlarında dikkat edilmesi gereken hususlardan biri elektrotların seçimi ve kullanılmasıdır. Genellikle gümüş klorür (Ag-AgCl) EEG disk ya da iğne elektrotları VEP kayıtları için kullanılan elektrotlardır (59).

VEP kayıtlarında kullanılan iki tip elektrot düzeneği vardır. Bunlara referansın konumuna bağlı olarak monopolar veya bipolar kayıt denir. Monopolar kayıtda,



elektrotlardan biri kortikal bölgeye, referans ise kulak veya mastoid gibi kortikal olmayan bir bölgeye yerleştirilir. Bipolarda ise elektrotların ikisi de kortikal bölgeye yerleştirilir ve sonuçta oluşan dalga bu iki kortikal kaynak arasındaki farkı gösterir.



Şekil 2.10. Görsel Uyarılma Potansiyelleri ve Bileşenleri

Görsel uyarılma potansiyelleri, görsel uyarı içeriğine göre pattern (şekli uyarı) veya flaş (yanıp sönen ışık), uyarı hızına göre geçici (transient) veya kararlı hal (steady-state) diye sınıflandırılabilir. Flaş ışığının yüksek şiddetle ve kısa aralıklarla tekrarlanması ile kaydedilen potansiyellere Flaş Uyarılma Potansiyelleri (FVEP) denir. Pattern VEP'te uyarı patterninin tanımı, iletişim geliştirmeye ve laboratuvarlar arasında verilerin karşılaştırılmasına izin vermesi açısından önemlidir. Aşağıda belirtilen durumlara göre uyarı patterninin tanımlanması gereklidir:

- Büyüklükleri ya da uzaysal frekansları
- Kontrastları
- Görüntünün alan büyüklüğü
- Alanın ortalama parlaklığı ve arkplanın parlaklığı
- Pattern görüntüsünün tipi (reversal ya da onset-ofset)

Pattern uyarı değişik boyutlardaki keskin kenarlı siyah-beyaz kareler (dama tahtası) şeklinde olabildiği gibi, dikey veya yatay durumdaki keskin kenarlı şeritler veya bantlar şeklinde de olabilir. Bir patternin uzaysal frekansı, gözdeki bir açıya karşılık gelen şerit veya bantların derece başına döngüsü (cpd, cycles per degree) olarak tanımlanır. Bir bandın genişliği (W),  $W = 60/2f$  (f: cpd de uzaysal frekans) formülü ile hesaplanır. Bunun tersine kontrol patterninin temel uzaysal frekansı  $f = 60/1.4 W$  formülü ile hesaplanır. Patternin ortalama parlaklığı, ekranın  $cd/m^2$  cinsinden ortalama parlaklığıdır ve  $(L_{max} + L_{min})/2$  formülü ile elde edilir. Kontrast (C), patternin bitişik aydınlık ve karanlık noktalarının parlaklık farkıdır.  $C = [(L_{max} - L_{min})/(L_{max} + L_{min})] \times 100 \%$  ifadesi ile belirlenir (65).

Uyarının verilme sıklığına bağlı olarak VEP'in yapısı değişir. Seyrek verilen (1 Hz) uyarana doğan cevaptan sonra ikinci uyarana kadar oksipital korteksin

toparlanması mümkündür; yani uyarılmış sistem uyarılar arasında istirahat konumuna dönecek zamanı bulur. Bu nedenle VEP'te bütün pozitif ve negatif osilasyonları görmek mümkündür (transient VEP; geçici hal uyarısı). Tanım olarak geçici yanıt, gözlenen zaman içinde ortaya çıkan ve tamamen kaybolan yanıt anlamına gelmektedir. Tekrarlayan uyarıların verilmesi ve daha sonra elde edilen yanıtların ortalamalarının alınması ile elde edilen geçici uyarılma potansiyeli kaydında, bir uyarının oluşturduğu değişimlerin, bir sonraki uyarı gelmeden önce tamamen söndüğü ve böylece tekrarlayan uyarılar serisi içinde bir uyarıya karşı elde edilen uyarılma potansiyelinin kendisinden önceki uyarının neden olduğu değişimden etkilenmediği varsayılmaktadır. Buna karşılık, sık verilen (4Hz ve üzeri) uyarılara doğan cevaptan sonra korteksin toparlanabilmesi için zaman yoktur. Yani yeni bir yanıt başlamadan bir önceki işaret yok olmaz. Uyarar sıklığına göre VEP harmonik dalga karakteri kazanır (steady state-VEP; kararlı hal uyarısı). Steady state uyarılmış potansiyeller, yeterince sık uygulanan, yani uyarılar arası beyin mekanizmalarının başlangıçtaki durumuna dönmesine olanak tanımayacak kadar kısa olan, uyarılara karşı, frekans bileşenlerinin uzun bir zaman diliminde değişmeden kaldığı ardışık uyarılma potansiyel yanıtları olarak tanımlanmaktadır (65-67).

#### **2.1.4. VEP'leri Etkileyen Faktörler**

Uyarı parametreleri gerek flaş gerekse pattern uyarımda çok çeşitlidir. Flaş uyarımında, saniyede gönderilen uyarı sayısı, elde edilen aydınlık oranı, dalga boyu, ortamın fotopik veya skotopik oluşu VEP kayıtlarını etkileyen parametrelerdir. Pattern uyarımda ise, uyarının yoğunluğu, şekil seçimi (dama tahtası veya ızgara gibi), şekillerin büyüklükleri, uyarılan toplam alanın ölçüsü, kontrast ayarlanması, ortam aydınlığının sabit olup olmaması ve şekillerin gösterilme oranı VEP kayıtlarını etkileyen başlıca parametrelerdir.

Pattern veya flaş uyarımda normal VEP cevabını etkileyen faktörler de farklılık gösterir. Şekilli uyarılar kullanıldığında retina üzerine düşen görüntünün netliği, optik sinirden oksipital kortekse kadar olan ileti hızı, kortikal görme merkezi ve üst merkezlerle olan bağlantılar, hastanın teste ve fiksasyona gösterdiği dikkat gibi çeşitli faktörler, flaş uyarım da ise retinanın ışığa duyarlılığı, optik sinirden oksipital kortekse kadar olan ileti hızı, kortikal görme merkezi ve üst merkezlerle bağlantılar VEP cevaplarını etkiler (68, 69).

Pattern VEP'lerde elde edilen latensler ve nispeten genlikler flaş VEP'lere göre daha uzun ve büyüktür. Bunun sebebi, pattern uyarımlarda görme olayının işe karışması, kenar, köşe ve kontrast değerlendirmelerinin yapılmasıdır (68).

Klinik testlerde daha çok pattern uyarar kullanılır. Çünkü bu potansiyeller görsel yol lezyonlarını göstermede daha duyarlı olup, denekler arasında çok fazla değişkenlik göstermezler. Ayrıca, insanın görme fonksiyonlarından biri şekilleri ve kenarlarını analiz etmek olduğundan, şekil değişmeli VEP (PR-VEP)'lerin bazı özellikleri değiştirilerek, bunlar hakkında daha fazla bilgi elde edilebilmektedir. Şekil değişmeli VEP'ler insanda temel olarak fovea ve konilerin aktivitesini göstermektedir (47). Diğer yandan, PR-VEP'lerde 100 ms latenste oluşan P100 bileşeninin optik nöropatilerde, retrobulbar nöropatilerde ve multipl sklerozda (59,

70) daha klinik semptomlar ortaya çıkmadan uzaması, bu hastalıkların erken teşhisi yönünden önemli bir parametre olarak kabul edilmesine yol açmıştır.

VEP'leri etkileyen faktörlerden biri kullanılan uyarı türü olup, diğerleri de Tablo 2.2'de kısaca özetlenmiştir.

**Tablo 2.2.** VEP'leri etkileyen faktörler

Uyarı türü	Flaş uyarılarla kaydedilen VEP'lerde latensler daha kısa, genlikler daha fazladır (59).
Parlaklık	Flaş ışığının parlaklığı artarsa, VEP dalgalarının genlikleri artar, latensleri azalır (59).
Uyarının veriliş sıklığı	Frekans artarsa dalga formlarının kompleksliği azalır ve daha sinüzoidal dalga formları olur. Düşük frekanslarda ise polifazik dalga formları oluşur (59).
Dalga boyu	Parlaklık fotopik (ışığa adaptasyon) seviyede tutulduğu zaman uyarının dalga boyu değiştirilirse, VEP spektral hassaslık 570 nm'de ortaya çıkar ve tepe oluşur. Fotopik spektral hassaslık retinadaki konilerin aktivasyonunu gösterir. Parlaklık skotopik (konilerin eşik değerinin altında) seviyede tutulursa maksimum VEP hassaslığı 500 nm'de olur. Bu durum, rodların spektral duyarlılığı ile uyum içindedir. Farklı dalga boylarında fotopik parlaklıkta konilerin mavi, kırmızı ve yeşil ışığa verdiği yanıtlar farklıdır (59).
Optik kalite	Optik kalite azaldığı zaman, yani uyarı bulanıklaştığı zaman VEP bileşenlerinin genlikleri azalır. Bu faktör, kırılma hatalarını belirlemede önemlidir (59).
Karelerin büyüklüğü	Dama tahtasındaki karelerin alanı büyüdükçe ve küçüldükçe, VEP dalgalarının genlikleri azalır (59).
Retinal lokalizasyon ve alanın büyüklüğü	Uyarının alanındaki azalmalar genlikte bir değişikliğe neden olmaz, ancak uyarının retinanın merkezine dışına konulması durumunda genlik düşer (59).
Cinsiyet	Erkek deneklerden alınan VEP kayıtlarında latensin daha uzun, genliğin ise daha küçük olduğu gözlenmiştir (71)
Vücut sıcaklığı	Azalan vücut sıcaklığı ile bileşenlerin latenslerinin arttığı, genliklerinde ise belirgin farklılıklar olmadığı görülmüştür (71)
Diğer faktörler:	Yaş, patoloji

VEP'leri etkileyen en önemli faktörlerden biri de serbest radikaller ve oluşturduğu lipid peroksidasyonudur. Daha önceki çalışmalarımızda (72-75) lipid peroksidasyonundaki artışa paralel olarak VEP latenslerinin uzadığını tespit etmiştik.

## **2.2. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Mekanizmaları**

Aerobik canlılar yaşamları için mutlaka moleküler oksijene gereksinim duyarken, anaerobik canlılar büyüme ve çoğalmaları için oksijene bağımlı değildirler. Anaerobik canlılardaki oksijenin toksik etkisinin nedeni, oksijenden kaynaklanan bazı reaktif türlerin biyolojik molekülleri oksitlemeleri ve bu reaktif türlere karşı anaerobik canlılarda savunma sisteminin bulunmamasıdır. Oksijen sadece anaerobik türlerde değil, yaşamları için mutlaka moleküler oksijene bağımlı olan canlılarda da toksik etkilere sahiptir. Oksijenin canlılardaki toksik etkisinin “oksijen radikalleri” olarak adlandırılan ve oksijenin vücuttaki metabolizması sırasında oluşan reaktif türlerden kaynaklandığı bilinmektedir.

### **2.2.1. Serbest Radikal Kavramı**

Stabil moleküllerin çoğunun dış yörüngelerinde biri diğerine zıt yönde hareket eden elektron çiftleri bulunmaktadır. Bu elektron çiftleri, molekülün kararlı kalmasını sağlar. Dış yörüngelerinde en az bir adet eşleşmemiş elektron içeren atom veya moleküle serbest radikal denir (76-78). Serbest radikaller rastlantısal bir şekilde metabolizmanın yan ürünleri olarak veya belli bir amaca yönelik olarak (ör: fagositoz) hücre içerisinde sürekli üretilirler.

### **2.2.2. Serbest Radikal Oluşumu**

Radikaller başlıca 3 temel mekanizma ile oluşur.

1. Normal bir molekülün kovalent bağının homolitik ayrılmasıyla: Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma denir ve her iki atom üzerinde de eşleşmemiş elektron kalır.

2. Normal bir molekülün elektron kaybetmesiyle: Radikal özelliği bulunmayan bir molekülün elektron kaybetmesinin ardından dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşur.

3. Normal bir moleküle elektron eklenmesiyle: Radikal özelliği taşımayan moleküle bir elektron transferi ile dış orbitalinde eşleşmemiş elektron oluşuyorsa bu tür indirgeme radikal oluşumuna neden olur (79).

Bir radikal, radikal olmayan bir moleküle reaksiyona girerse, başka bir serbest radikal oluşur. Bu özellik serbest radikallerin zincirleme reaksiyonlara girebilmelerine olanak sağlar (80).

Biyolojik etkileri en önemli olan serbest radikaller oksijenden oluşan serbest radikallerdir.

### **2.2.3. Oksijen ve Oksijen Radikalleri**

#### **2.2.3.1. Moleküler Oksijenin Özellikleri**

Moleküler oksijen ( $O_2$ ), paralel spin durumlu iki eşleşmemiş elektrona sahiptir. Serbest radikal tanımına göre  $O_2$ , biradikal olarak değerlendirilir (81). Biradikal bir yapıya sahip olan oksijenin herhangi bir moleküle tepkimeye

girebilmesi için, tepkimeye gireceği molekülün de benzer yapıya (farklı orbitallerde spinleri aynı yönde elektron içermesi) sahip olması gerekir. Oysa başta organik moleküller olmak üzere atom ve moleküller orbitallerinde elektronları antiparalel ve eşleşmiş olarak içerirler veya paylaşılmamış elektronlar kovalent bağlara katılmışlardır. Bunun sonucu olarak oksijenin diğer moleküllerle olan reaktivitesi son derece kısıtlanmıştır. Bu kısıtlama “spin kısıtlaması” olarak adlandırılır. Canlıların oksijeni kullanabilmesi için oksijene elektron transferi yaparak spin kısıtlamasını aşmaları gerekir. Bu işlem için canlılar bazı metal iyonlarından (Fe, Cu, Mn, Zn) yararlanırlar.

### 2.2.3.2. Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest oksijen radikalleri (ROS) oksijenli solunum metabolizması esnasında oluşur. Bu oluşan radikallerin yarılanma ömürleri birkaç milisaniye ile dakikalar hatta saatler arasında değişmektedir (82). Reaktif oksijen türlerinin simgeleri ve elektron yapıları Tablo 2.3’te verilmiştir.

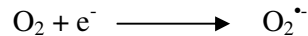
**Tablo 2.3.** Reaktif oksijen türlerinin simgeleri ve elektron yapıları (83)

Reaktif Oksijen Türleri	Simgesi	Elektron Yapısı
Süperoksit radikali	$O_2^- \cdot$	$\left[ \cdot \ddot{O} :: \ddot{O} \right]^-$
Hidroksil radikali	$\cdot OH$	$\cdot \ddot{O} : H$
Peroksit radikali	$O_2^{2-} \cdot$	$\left[ \cdot \ddot{O} :: \ddot{O} \cdot \right]^{-2}$
Hidrojen peroksit	$H_2O_2$	$H : \ddot{O} :: \ddot{O} : H$
Singlet oksijen	$^1O_2$	$\cdot \ddot{O} :: \ddot{O} \cdot$

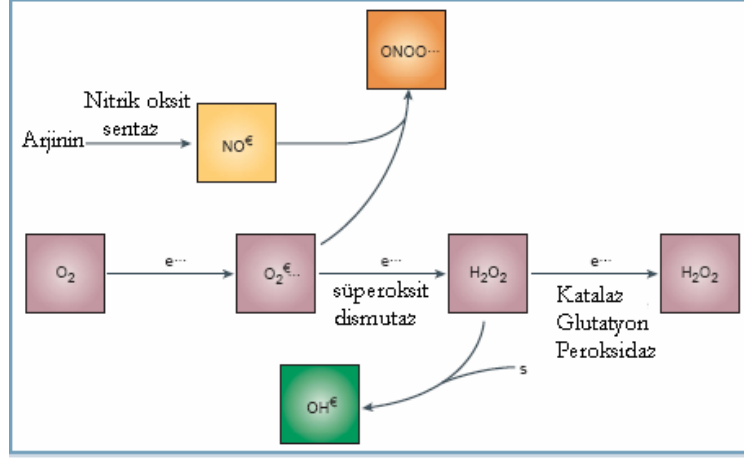
Serbest oksijen radikalleri biyokimyasında anahtar rol oynayan maddeler oksijen, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metal iyonları ve hidroksil radikalidir. Bunlardan ilk dördünün reaksiyonu ile hidroksil radikali oluşmaktadır (Şekil 2.11) (84,85). Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilir ve hücrede karbon merkezli organik radikaller (R $\cdot$ ), peroksit radikali (ROO $\cdot$ ), alkoksi radikalleri (RO $\cdot$ ), tiyil radikalleri (RS $\cdot$ ), sülfenil radikalleri (RSO $\cdot$ ) ve tiyil peroksit radikalleri (RSO $_2\cdot$ ) gibi çeşitli radikallerin oluşumuna neden olurlar.

Atmosferik bir bileşik olan ozon (O $_3$ ), nitrik oksit radikali (NO $\cdot$ ) ve hipoklorik asit (HOCl $\cdot$ ) gibi çeşitli moleküller de güçlü oksidan etkiye sahiptir (85, 86)

**Süperoksit Anyonu (O $_2^{\cdot-}$ ):** Hemen hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit anyonu (O $_2^{\cdot-}$ ) meydana gelmektedir (83).

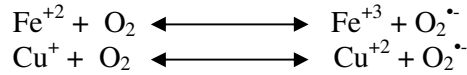


Süperoksit anyonu, hücre membranlarından kolay geçemediği için kendisi doğrudan zarar vermemektedir (85). Süperoksitin asıl önemi, geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi ve hidrojen peroksit kaynağı olmasıdır (83).



Şekil.2.11. ROS (88)

İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu süperoksit meydana getirebilir.



Geçiş metalleri iyonlarının oksijenle reaksiyonları geri dönüşümlü reaksiyonlardır.

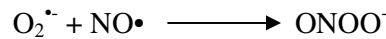
Pek çok enzimin katalitik etkisi sırasında  $\text{O}_2^{\bullet-}$  bir ürün olarak da oluşabilir.

Aktive edilen fagositik lökositler antibakteriyel etki için NADPH ( $\beta$ -Nikotin Amid Dinükleotid Hidrojen Fosfat) oksidaz enzimi aracılığıyla bol miktarda  $\text{O}_2^{\bullet-}$  üreterek fagozom içine ve buldukları ortama verirler (88, 89).

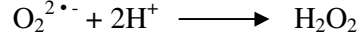
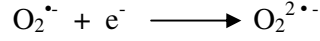


$\text{O}_2^{\bullet-}$  bir proton ( $\text{H}^+$ ) alarak  $\text{HO}_2^{\bullet}$ 'yi oluşturur. Oldukça reaktif olan bu radikal hücre zarlarında lipid peroksidasyonu başlatabilir ve zarla ilişkili antioksidanları oksitleyebilir.

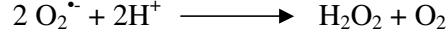
$\text{O}_2^{\bullet-}$ 'nin fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit ile birleşmesi sonucu bir reaktif oksijen türevi olan peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) oluşmaktadır.



$\text{O}_2^{\bullet-}$ , yapısına bir  $e^-$  katılmasıyla peroksil anyonu ( $\text{O}_2^{2-}$ ) oluşturabilir ve bu da ortamdan iki  $\text{H}^+$  alarak  $\text{H}_2\text{O}_2$  oluşumuna neden olabilir (90).



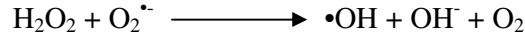
**Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):** Hidrojen peroksitin üretimi süperoksitin dismutasyonu ile olmaktadır. İki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluşturmaktadır. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler olduğundan bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinmektedir.



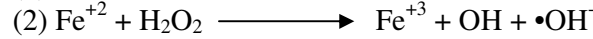
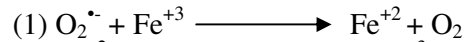
Hidrojen peroksit düşük elektriksel yükü ve noniyonize özelliklerinden dolayı hücre membranlarından hızlı bir şekilde geçer. Geçiş grubu metal iyonlarının varlığında yüksek derecede reaktif serbest radikaller oluşur (85, 91).

**Hidroksil Radikali (•OH):** Hidroksil radikali, ilk olarak 1934 yılında Haber ve Weiss adlı araştırmacıların gösterdikleri, kendi adları ile anılan reaksiyon ile ortaya konmuştur. En kısa yarı ömre (1x10<sup>-9</sup>sn) sahip olan •OH, biyolojik sistemlerde rastlanan en etkili oksijen radikalidir ve makromoleküller ile kolaylıkla reaksiyona girer (85).

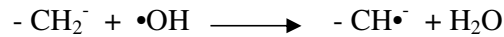
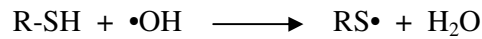
Hidrojen peroksit süperoksit radikali ile reaksiyona girerek hidroksil radikali oluşturur. Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilmektedir.



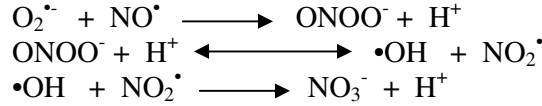
Haber-Weiss reaksiyonu genellikle fizyolojik durumlarda yavaştır. Fakat geçiş metalleri, metal şelatörler veya hemoproteinlerin varlığında bu reaksiyon hızlı oluşur. Bu durum Fenton reaksiyonu olarak tanımlanır. Biyolojik sistemlerde demir benzeri geçiş metalleri, demir içeren maddeler (transferrin, laktoferrin, hemoglobin, adenzin, 5'-difosfat ferrin iyon) mevcuttur. Süperoksit radikali ferrik (Fe<sup>+3</sup>) demiri, ferröz (Fe<sup>+2</sup>) demire indirir. Bu sırada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hidroksil radikaline dönüşür (92, 93).



Hidroksil radikali oluştuğu yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri (RS•), karbon merkezli organik radikaller (R•), organik peroksitler (RCOO•) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur.



**Nitrojen Oksitleri:** Nitrik oksit (NO<sup>•</sup>) ve nitrit (NO<sub>2</sub><sup>•</sup>), tek sayıda e<sup>-</sup> içerdikleri için serbest radikal tanımına uymaktadır. Biyolojik sistemlerde oluşan reaktif nitrojen türlerinin en önemlisi NO<sup>•</sup>'dur. Nitrik oksitin kontrolsüz üretimi sonucu proteinlerin nitrolizasyonu, DNA kırılmaları ve diğer moleküler etkileşimler ile beyin dokusunu hasarlayabilir (94). İn vivo ortamda salınan NO<sup>•</sup>, NO<sub>2</sub><sup>•</sup> veya nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)'a otookside olabilir. NO<sub>2</sub><sup>•</sup> zayıf bir redükte edicidir. Fizyolojik pH'da NO<sup>•</sup>, bir reaktif ara ürün olan ONOO<sup>-</sup>'yu oluşturmak üzere O<sub>2</sub><sup>-•</sup> ile reaksiyona girebilir. Radikal olmayan ONOO<sup>-</sup>, güçlü bir oksidandır. Tiyol gruplarının oksidasyonu yoluyla direkt sitotoksik etki gösteren ONOO<sup>-</sup>, çeşitli nitrojen oksit radikallerini ve <sup>•</sup>OH oluşturarak dekompoze olabilir (95).



#### 2.2.4. Serbest Radikallerin Etkileri

1956'da Denham Harman, oksijen radikallerinin in vivo enzimatik reaksiyonların ürünü olabileceği hipotezini ortaya atmış ve serbest radikallerin büyük çaplı hücre hasar, mutajenez, kanser ve biyolojik yaşlanmanın dejeneratif süreçlerinden sorumlu olabileceğini ileri sürmüştür (96). Bu hipotezden yola çıkılarak yapılan araştırmalarla serbest radikallerin organizmadaki önemi anlaşılmıştır.

Serbest radikaller toksik etkilidir. Yaşlanma ve çeşitli patolojik durumlarda üretimleri antioksidan savunma sisteminin kapasitesini aştığı zaman hücre makromoleküllerden lipidler başta olmak üzere DNA, protein ve karbonhidratlar ile reaksiyona girerler. Sonuçta hücrenin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü bozulur ve geri dönüşümlü veya dönüşümsüz hasarlar meydana gelir. Oksijen radikallerinin fazla yapımının neden olduğu etkilerin toplamı "oksidan stres" olarak adlandırılır (97, 98). Kontrolsüz ROS artışının etkileri sonucu hücre apoptoz ya da nekroz ile ölüme gider (99).

#### Serbest Radikallerin Lipidlerle Reaksiyonu

Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluşturmaktadır. Çoklu doymamış yağ asitlerinin (poly unsaturated fatty asid- PUFA) oksidatif yıkımı olan lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin PUFA'nın yan zincirlerindeki metillenmiş karbonlardan hidrojen atomu koparmasıyla başlar. PUFA'nın oksidasyonu, bir oksijen alarak çabucak peroksil radikaline (LOO<sup>•</sup>) dönüşebilen yağ asidi radikalinin (L<sup>•</sup>) oluşmasına yol açar (78, 100). Peroksil radikali, membrandaki komşu yan zincirlerden hidrojen atomlarını koparıp peroksidatif zincir reaksiyonunu başlatmaktadır. Peroksidasyon bir kere başladıktan sonra devam eder (100, 101).

Lipid hidroperoksitler de (LOOH) yıkılarak LO<sup>•</sup>, LOO<sup>•</sup> gibi radikaller, hidrokarbonlar, alkoller ve eterin yanında MDA ve 4-HNE gibi sitotoksik moleküllerin (102) oluşmasına neden olur. Bunlar peroksidasyonun ikincil ürünleridir. 4-hidroksinonenal, proteinlere konjuge olmak için sistein, lizin ve histidin rezidüleri ile etkileşir ve amino asit modifikasyonlarına sebep olur.



Malondialdehit ise, membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmalarına neden olmakta, membranın bazı özelliklerini değiştirmektedir. Dolayısıyla MDA hücre ve dokulardaki oksidatif hasarın bir göstergesidir. MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyonu sonucunda TBARS meydana gelmektedir. Bu test ile MDA ölçümü PUFA'nın peroksidasyonunun tespit edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (103-105).

Biyolojik membranlarda lipid peroksidasyonu, membran akışkanlığının azalmasına, membran potansiyellerinin düşmesine,  $H^+$  ve diğer iyonların geçirgenliğinin artmasına ve sonuçta hücre membranının parçalanarak organelerin dışarı sızmasına neden olur (106).

### **Serbest Radikallerin Proteinlerle Reaksiyonu**

Proteinler oksidantlara maruz kaldıklarında birçok kovalent değişikliklere uğrar. Bu değişikliklerden bazıları serbest radikallerin proteinler üzerine doğrudan etkileri sonucu oluşabileceği gibi, bazıları da oksidasyon yan ürünlerinin proteinlere kovalent bağlanması ile meydana gelir. Proteinlerin radikal aracılı hasarı; elektron kaybı ve metal-iyon katalizli reaksiyonlar ile başlatılabilmektedir (107). Proteinlerin serbest radikal hasarından etkilenme dereceleri aminoasit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren moleküllerin serbest radikal reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallere karşı daha duyarlıdır. Aminoasitlerin oksidasyonu proteinlerde fragmentasyon, agregasyon ve proteolitik yıkıma duyarlılık gibi fiziksel değişikliklere neden olmaktadır (49, 77).

Proteinlerin oksidasyonu ile özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşmaktadır. Sonuç olarak immünglobulin ve albümin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin yapıları bozulmakta ve bu proteinler fonksiyonlarını yerine getirememektedir.

Proteinlerin oksidasyonu sonucu membran enzimlerinin aktivitesi azalmakta, hücreye  $Ca^{++}$  girişi artmaktadır. Hücre içi serbest  $Ca^{++}$  artışına bağlı olarak zararlı etkilere sahip pek çok enzimin aktivitesi artmakta, bu da hücre hasarına yol açmaktadır.

### **Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri**

Yapılan çalışmalarda,  $\alpha$ -hidroksialdehid yapıya sahip karbonhidratların, metal iyonlarının varlığında hızlı bir şekilde otooksidasyona uğradıkları ve bunun sonucunda dikarbonil bileşikleri ve hidrojen peroksit oluşturdukları belirtilmiştir (85, 108).

### **Serbest Radikallerin Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri**

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme neden olmaktadır. Hücre içinden ve dışından kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açmaktadır (85, 109, 110).

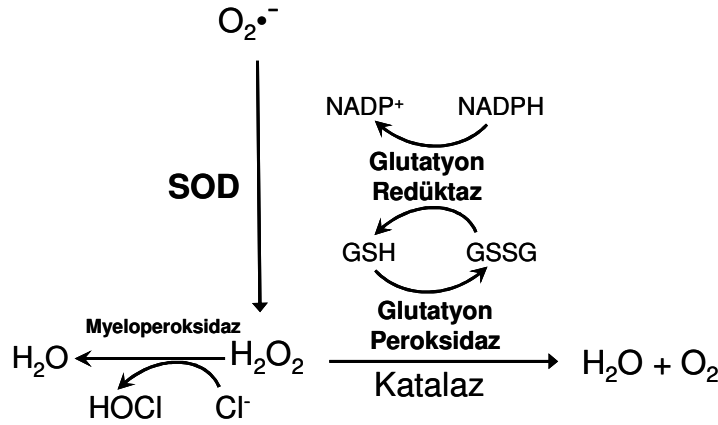
### 2.2.5. Antioksidan Savunma Sistemi

Antioksidan sistem, serbest radikallere karşı organizmanın en önemli silahıdır. Hem hücre içinde hem de hücre dışında oluşan radikallerin zararlı etkileri antioksidan savunma sistemi öğelerinin ortaklaşa çalışmaları sonucu ortadan kaldırılır (111-113).

#### Primer Antioksidan Savunma

##### Antioksidan Enzimler

Hücrede oluşan ROS'un sitotoksik etkisinin ortadan kaldırılabilmesi veya azaltılabilmesi antioksidan enzim sistemleri ile mümkün olabilmektedir (114). Bu enzimler, sitoplazmik, mitokondriyal ve ekstraselüler süperoksit dismutazlar (SOD), glutatyon peroksidaz, katalaz ve fagositik hücrelerde mevcut olan myeloperoksidaz enzim sistemleridir (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Antioksidan Enzim Sistemleri

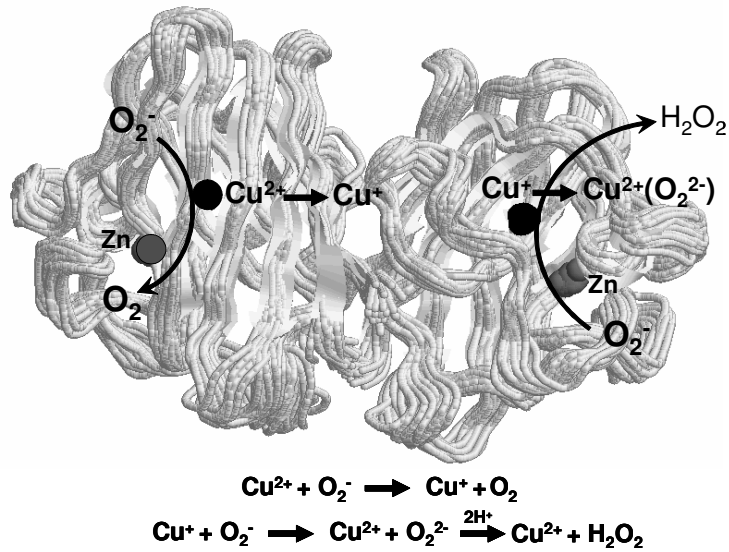
**Süperoksit Dismutaz (SOD):** İlk kez 1968 yılında McCord ve Fridovich tarafından tanımlanan SOD enzimi homodimerik yapıda olan 32 kDa'lık bir proteindir. Süperoksit dismutaz iki tane süperoksit anyonunu alarak hidrojen peroksit ve oksijen oluşturur (83, 84).



Bu reaksiyon oksidatif strese karşı ilk savunma olarak da adlandırılır. Çünkü aerobik koşullarda yaşayan tüm canlılarda kaçınılmaz bir şekilde meydana gelen  $O_2^{\bullet-}$  zincirleme radikal reaksiyonların güçlü bir başlangıcıdır. Katalitik aktivitesi oldukça yüksek olan SOD enzimi sayesinde hücresel kompartmanlardaki  $O_2^{\bullet-}$  düzeyleri kontrol altında tutulur. SOD, oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunur, ancak yüksek oksijen kullanımı olan dokularda aktivitesi fazladır (83, 84, 102).

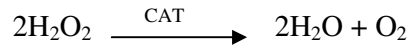
Ökaryotik hücrelerde aktif bölgelerindeki metal türü ve hücredeki yerleri açısından üç farklı SOD enzimi tespit edilmiştir. Kofaktörleri bakır ve çinko olan Cu/Zn-SOD intraselüler olarak sitoplazma, çekirdek ve lizozomlarda, ekstraselüler

olarak ise plazma membranlarında ve hücre dışı sıvılarda tespit edilmiştir. Bu enzimin aktivitesinden Cu, stabilitesinden Zn sorumludur. Cu/Zn-SOD enziminin yapısı ve fonksiyonu Şekil 2.13’de verilmiştir. Kofaktörü mangan olan Mn-SOD ise intraselüler olarak mitokondrial matriks, ekstraselüler olarak ise plazma membranında bulunmuştur. Genel olarak hücrede en bol bulunan izomer Cu/Zn-SOD’dur. Bu SOD izomerlerinin katalizlediği reaksiyonlar aynıdır. Bunların dışında bazı bakterilerde kofaktörü demir olan Fe-SOD saptanmıştır. Fizyolojik pH’da bu enzim tarafından katalizlenen reaksiyonun hızı yaklaşık  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ’dir. Bu hız, süperoksit anyonunun spontan dismutasyonundan  $10^4$  kere daha hızlıdır (115).



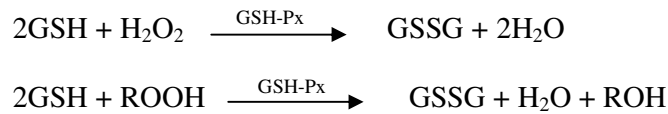
Şekil 2.13. Süperoksit dismutaz enziminin yapısı ve fonksiyonu

**Katalaz (CAT):** Peroksidazların bir üyesi olan katalaz, yapısında dört ‘hem’ grubu bulunduran 220 kDa moleküler ağırlıklı bir hemoproteindir. Katalaz hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalamaktadır. Peroksidazlarda lokalizedir (83).



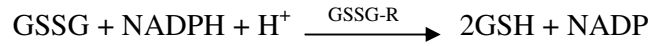
$\text{H}_2\text{O}_2$  seviyesinin düşük olduğu durumlarda, organik peroksitler tercihen peroksidaz tarafından metabolize edilirken,  $\text{H}_2\text{O}_2$  konsantrasyonunun yüksek olduğu koşullarda katalaz tarafından metabolize edilirler (85, 116).

**Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px):** Glutasyon peroksidaz, ilk kez 1957 yılında tanımlanmıştır. Tetramerik yapıda olan enzim,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve büyük moleküllü hidroperoksitlerin indirgenme reaksiyonlarını katalizler (83, 117).

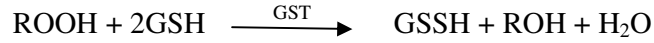


Glutasyon peroksidazın 85 kDa moleküler ağırlıklı sitozolik formuna ilaveten böbreklerde sentezlenen ve salınan 90 kDa moleküler ağırlıklı bir plazma formunun varlığı da gösterilmiştir (44, 118). Selenyum (Se) bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki tipi mevcuttur. Selenyum bağımlı formu katalitik aktivitesi için selenyuma ihtiyaç duyar (85,119). GSH-Px, karaciğerde yüksek, kalp, akciğer ve beyinde orta, kasta ise düşük aktiviteye sahiptir.

**Glutasyon Redüktaz (GSSG-R):** Glutasyon redüktazın katalizlediği reaksiyon sırasında meydana gelen GSSG'nin ileride tekrar GSH'ya dönüştürülmesi gereklidir, çünkü organizmanın GSH deposu sınırlıdır. Bu fonksiyonu Glutasyon redüktaz (GSSG-R) enzimi yerine getirir. Bir flavoprotein olan GSSG-R enzimi, NADPH varlığında GSSG'yi tekrar GSH'ya çevirir. Yaklaşık olarak 104 kDa moleküler ağırlıklı GSSG-R enzimi iki alt üniteden oluşan dimerik yapılı bir enzimdir (120).



**Glutasyon-S-transferaz (GST):** Glutasyon-S-transferaz (GST), ilk kez 1961 yılında tanımlanmıştır. Dört farklı alt birimden oluşan 101 kDa moleküler ağırlıklı bir enzim ailesidir (9, 121). Organizmaya giren ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynamaktadır. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid hidroperoksitler (ROOH)'e karşı Se-bağımsız GSH-Px aktivitesi gösterir.

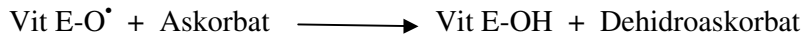


**Mitokondrial Sitokrom Oksidaz:** Mitokondrial sitokrom oksidaz enzimi solunum zincirinin son bileşenidir. Enzim, elektronlarını  $\text{O}_2^{\cdot\cdot}$ 'ye vererek  $\text{O}_2^{\cdot\cdot}$ 'nin detoksifikasyonunu sağlar. Normal koşullarda sürekli meydana gelen bu reaksiyon sayesinde yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanarak bol miktarda enerji üretimi sağlanır.  $\text{O}_2^{\cdot\cdot}$  üretiminin bu enzimin kapasitesini aştığı koşullarda ise diğer antioksidan enzimler devreye girer  $\text{O}_2^{\cdot\cdot}$ 'nin zararlı etkilerini engeller (83).

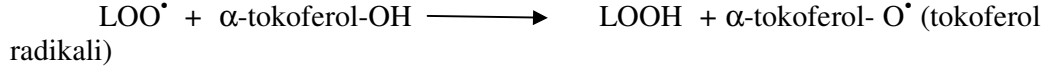
### Antioksidan Bileşikler

Bu gruba ait moleküler ve iyonlar ekzojen ve endojen kaynaklı olarak organizmada bulunur ve oksidanlara karşı enzimatik olmayan bir savunma gösterirler. GSH, çeşitli vitaminler, melatonin, niasin, triptofan, riboflavin,  $\alpha$ -lipoik asit, biyoflavonoidler, koenzim Q, ürik asit, seruloplazmin ve sistein, bu grup içinde sayılabilirler.

**C Vitamini (Askorbik asit):** Suda eriyen vitaminlerden olan C vitamini çok güçlü bir indirgeyici ajandır.  $\text{ROO}^{\cdot}$ ,  $\text{O}_2^{\cdot\cdot}$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $^1\text{O}_2$  ve  $\text{ONOO}^-$  ile kolayca reaksiyona girerek bunları ortamdaki temizler. Ayrıca C vitamini tokoferoksil radikalini tokoferole indirgeyerek, yükseltgenmiş E vitamininin antioksidan özelliklerinin tekrar kazanılmasını sağlar.



**E Vitamini ( $\alpha$ -tokoferol):** Yağda eriyen vitaminlerden olan E vitaminin yapısında bulunan fenolik hidroksil gruplu aromatik halka bu vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve güçlü antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır. E vitamini hücre membran fosfolipidlerinde bulunan PUFA'yı serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturmaktadır (122). Vitamin E, süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksil radikallerini ve diğer radikalleri indirgemektedir. LOO<sup>•</sup>'ları yıkarak lipid peroksidasyonu sonlandırdığı için “zincir kırıcı antioksidan” olarak da tanımlanır.



Oluşan  $\alpha$ -tokoferol- O<sup>•</sup> stabildir ve LP'yi başlatmak için yeterince reaktif değildir. E vitamini bir kez oksitlenince radikal formunu alır, ancak C vitamini sayesinde tekrar fonksiyonel redükte formuna çevrilir (123).

**A Vitamini (Karotenoidler):** Karotenoidlerin serbest radikalleri temizleyerek lipid peroksidasyona karşı hücreyi koruduğu gözlenmiştir. A vitamininin süperoksit radikallerini temizlediği ve peroksi radikalleriyle etkileşerek antioksidan etki gösterdiği saptanmıştır (85).

**Glutatyon (GSH):** Tüm hücrelerde bulunan düşük moleküler ağırlıklı bir tiyoldür. Başlıca intraselüler antioksidan GSH, ekstraselüler mesafede çok düşük konsantrasyonlarda bulunur. Glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerinden meydana gelen GSH'ya antioksidan özelliğini sistein tiyol grubu kazandırır.

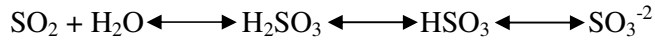
Redükte glutatyon, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, •OH ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi bileşiklerle etkileşerek indirgeyici görev görür, böylece hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Redükte glutatyon doğrudan süperoksit anyonu, hidroksil radikali ve organik radikallerle reaksiyona girip yükseltgenebilir veya A vitamini gibi antioksidanların yükseltgenmiş formdan indirgenmiş forma geçmesini sağlayarak antioksidan etki gösterir (85, 124). Bunun dışında proteinlerdeki -SH gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı muhafaza eder. Redükte glutatyon, demirin Fe<sup>+2</sup> halde tutulmasını sağlayarak protein ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller.

### 2.3. Sülfid

Hava kirliliği tüm dünyada insan sağlığını giderek artan boyutlarda tehdit eden bir sorun olmakla birlikte çarpık kentleşme, kalitesiz yakıt kullanımı, kontrolsüz endüstriyel faaliyet, trafik, orman yangınları vb. sorunları olan ülkemiz için bu konunun daha da çok önemi söz konusudur. Kükürt dioksit (SO<sub>2</sub>) fosil yakıtlarının yanması sonucu atmosfere salınan ve kentlerde yaygın olarak hava kirliliğine yol açtığı önemle vurgulanan bir maddedir (130). Diğer yandan, günümüzde, sülfür dioksitin çeşitli iyonlarla yaptığı tuzları [sülfür dioksit (SO<sub>2</sub>), sodyum sülfid (NaSO<sub>3</sub>), sodyum bisülfid (NaHSO<sub>3</sub>), potasyum bisülfite (KHSO<sub>3</sub>), sodyum metabisülfid (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) ve potasyum metabisülfid (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)] besinleri uzun süre saklamak amacıyla gıda ve ilaç endüstrisinde koruyucu olarak kullanılan SO<sub>3</sub><sup>-2</sup> bileşikleridir. Dolayısıyla, bisülfid/sülfid bileşiklerinin bu özellikleri nedeniyle çeşitli

endüstrilerde yaygın bir şekilde kullanılması, yiyecek, içecek ve ilaçlarla da vücuda alınmasına yol açmaktadır (131).

Sülfüt dioksit ve onun çeşitli iyonlarla yaptığı tuzları, suda eriyebilir bileşikler olup sıvı ortamlarda hızlı bir şekilde aşağıdaki reaksiyonda gösterildiği gibi sülfüröz asit ( $H_2SO_3$ ) oluştururlar.  $H_2SO_3$  özellikle yüksek pH ve  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'da kolayca bisülfid ( $HSO_3^-$ ) iyonuna dönüşür.  $HSO_3^-$  ise daha yüksek pH'larda  $SO_3^{2-}$  iyonuna dönüşmektedir. Fizyolojik pH'larda  $HSO_3^-$  ve  $SO_3^{2-}$  iyonlarının birbirlerine kolayca dönüşebildikleri gösterilmiş, bu yüzden  $SO_3^{2-}$  her iki iyon için de ortak isim olarak kullanılmıştır.



Sülfitin bu çok iyi bilinen reaksiyonunda görüldüğü gibi ağız ve mide gibi asidik ortamlarda besinler ile alınan  $SO_3^{2-}$  tuzları kolayca ve hızlı bir şekilde  $H_2SO_3$ 'e dönüşmekte bu asit de fizyolojik pH'da  $SO_3^{2-}$ 'ye dönüşmektedir (2). Bu maddeler üst solunum yollarında kana karışarak tüm dokular tarafından emilebilirler.

İnsanların  $SO_3^{2-}$ 'ye maruz kalmaları, endojen ve eksojen olmak üzere iki şekilde olur. Sülfid vücutta endojen olarak üretildiği gibi, eksojen olarak dışarıdan da alınabilir. Gerek endojen olarak üretilen gerekse eksojen yolla alınan  $SO_2$  vücutta  $SO_3^{2-}$ 'ye dönüşür.

### 2.3.1. Endojen Sülfid Oluşumu

Vücutta sülfür içeren aminoasitlerin ve diğer sülfür içeren bileşiklerin normal katabolizması sırasında 3 şekilde olmak üzere yüksek miktarlarda  $SO_3^{2-}$  oluşumu gerçekleşir.

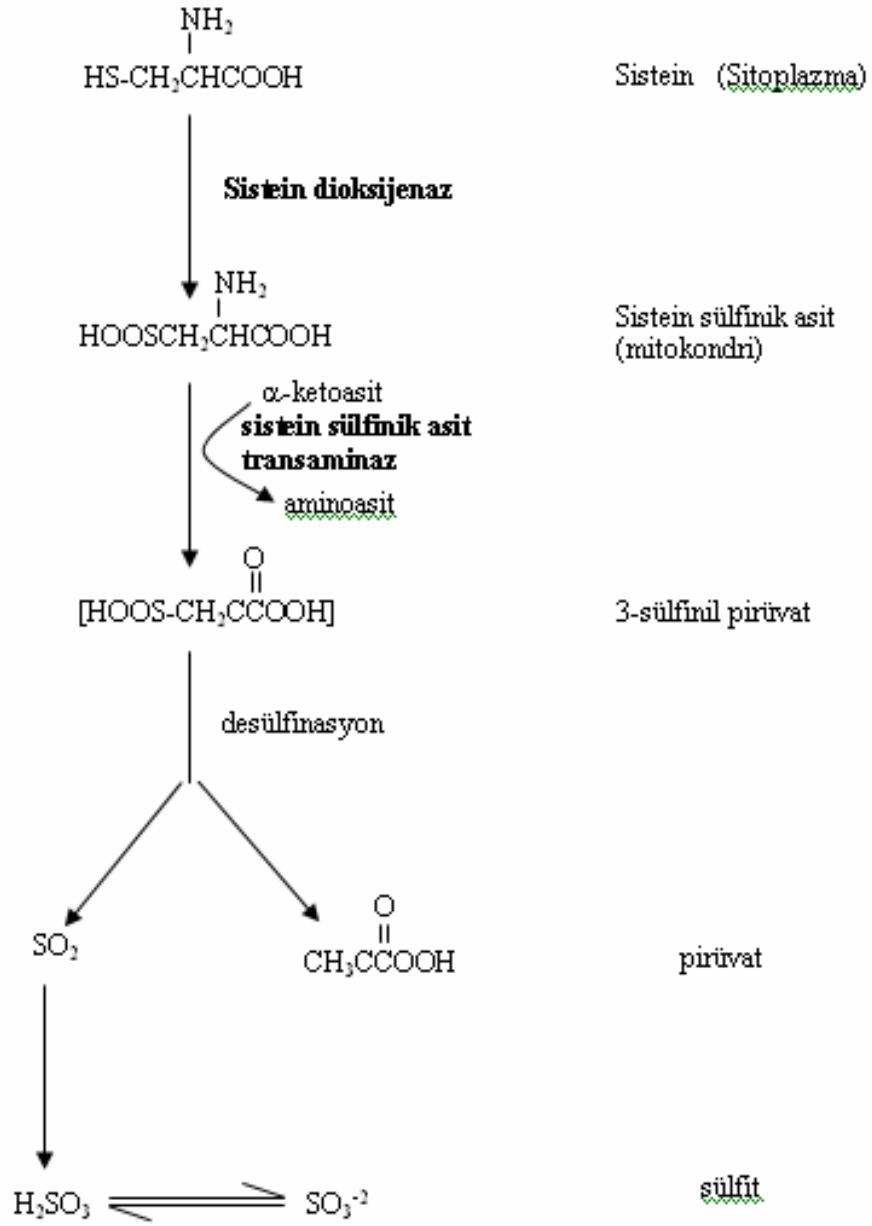
1. Endojen  $SO_3^{2-}$ 'in oluşumu, sistenin, sitoplazmada bulunan sistein dioksijenaz enzimi ile, sistein sülfidik aside oksidasyonu ile başlar. Sistein sülfidik asit sitozolde oluşmasına rağmen, aspartat transporter'ı ile mitokondriye taşınır. Mitokondride, sistein sülfidik asit, sistein sülfidik asit transaminaz enzimi yardımıyla 2-ketoglutarat veya oksaloasetat ile transaminasyona uğrayarak 3-sülfidil piruvat oluşturur. 3-sülfidil piruvat daha sonra spontan desülfidasyona uğrar ve sonuçta  $SO_2$  ve piruvat oluşur. Oluşan  $SO_2$  hidratasyona ve proton ayrılmasına uğrayarak  $SO_3^{2-}$ 'yi oluşturur (Şekil 2.14). Vücutta üretilen  $SO_3^{2-}$ 'nin büyük bir kısmı bu yolla üretilir (2).

*In vivo*  $SO_3^{2-}$ 'nin temel kaynağı olan sistein aminoasidinin hücre içi konsantrasyonu düşük (10-100  $\mu\text{M}$ ) olduğu için, sistenin oluşumu için üç önemli yolak öne sürülmüştür:

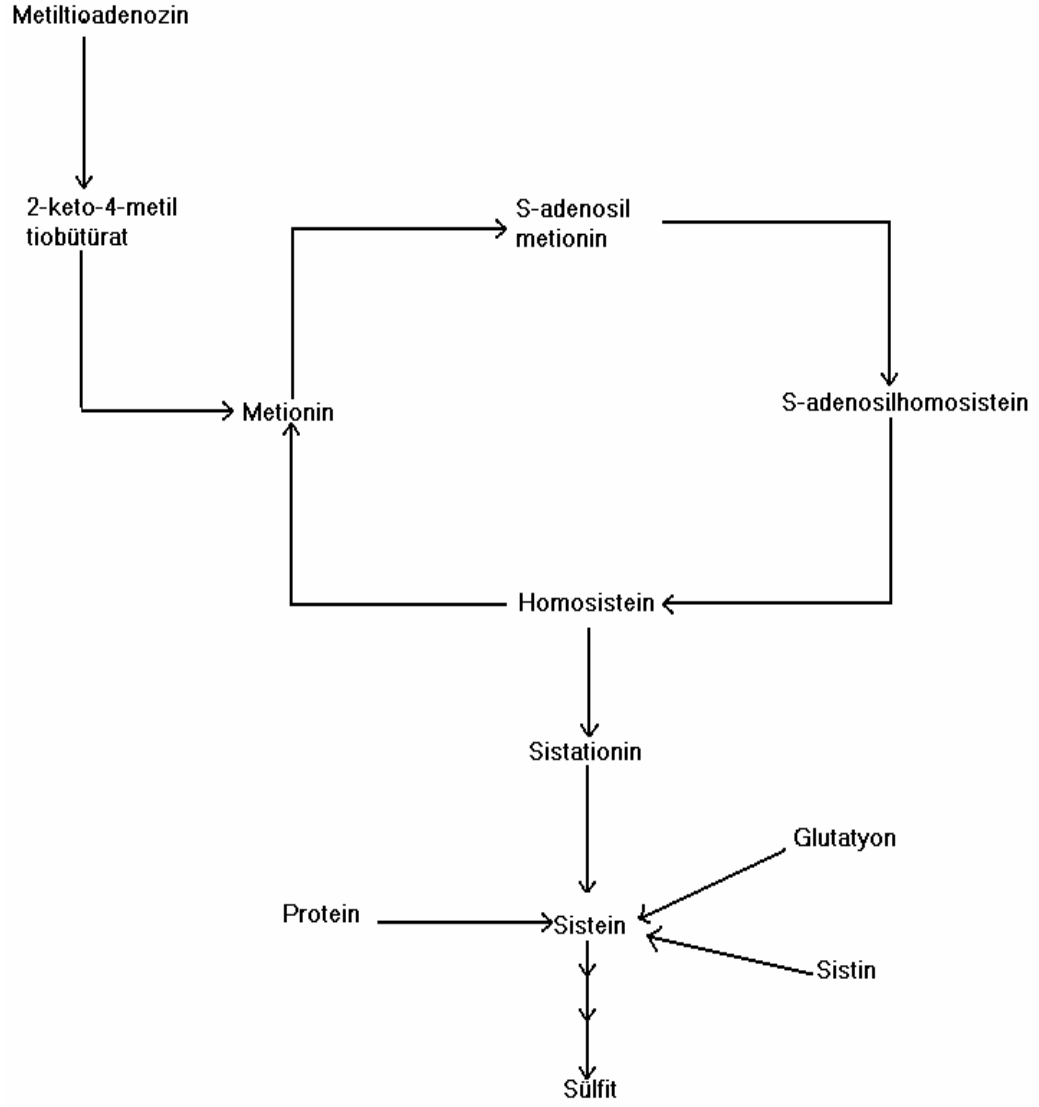
a. Sistinin depolanmış hali olduğu bilinen ve hücre içi konsantrasyonu 0.5-10  $\mu\text{M}$  olan glutatyonun parçalanması.

b. Sistinin indirgenmesi veya proteolizisi.

c. Metionin ve diğer sülfitojenik bileşiklerin metabolizması. Sistinin oluşum mekanizmaları Şekil 2.15'de gösterilmiştir.



Şekil 2.14. Vücutta endojen sülfir oluşumu (2)



Şekil 2.15. Sülfitojenik yollar (2)



2. Sülfid ayrıca hipotaurinin metabolizması sırasında da oluşabilir. Hipotaurin, sistein sülfidik asidin dekarboksilasyonu veya sisteaminin oksidasyonu ile oluşur. Hipotaurin,  $\alpha$ -keto asitlerle (hipotaurine-piruvat transaminaz) transaminasyona uğrar ve sülfidil asit aldehyit oluşturur. Bu da kendiliğinden desülfidasyona uğrayarak  $\text{SO}_2$  ve asetaldehite dönüşür. Bu yolağın sülfid üretimindeki önemi bilinmemektedir (2).

3. Sülfid oluşumu  $\beta$ -sistatyonin sentetazın sistein üzerine etkisi ile oluşan hidrojen sülfid oksidasyonu sırasında da gerçekleşir. Ancak bu oksidasyonun endojen sülfid üretiminde önemli bir rolü olmadığı düşünülmektedir (2).

### 2.3.2. Eksojen sülfid alımı

Yiyecek ve içeceklerde sülfid kullanımı: Yiyecek ve içeceklere ilave edilen  $\text{SO}_3^{-2}$ , bakteriyel büyümeyi sağlayan oksijenin kullanılmaz hale gelmesine neden olur. Dolayısıyla,  $\text{SO}_3^{-2}$  yiyecek ve içeceklerin renklerinde, tadında ya da kokusunda istenmeyen değişiklikleri önler (3). Bu nedenlerle,  $\text{SO}_3^{-2}$  bira, şarap, sebze, konserve, dondurulmuş gıdalar gibi bir çok işlenmiş yiyecek ve içekte kullanılmaktadır.

Restoran yemeklerinin hazırlanmasında yüksek miktarda  $\text{SO}_3^{-2}$  kullanılması,  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin yan etkilerinin görülmesinde büyük bir etkidir. Rapor edilen  $\text{SO}_3^{-2}$  yan etkilerinin çoğunun, restoran yemeklerinin yenilmesiyle gerçekleştiği bilinmektedir. Bu nedenle FDA (Food and Drug Administration) tarafından, restoran yiyeceklerinde kullanılan  $\text{SO}_3^{-2}$  bileşiklerinin miktarının 15 mg/gün'ü geçmemesi bildirilmiş, ayrıca sülfid ette kullanımı yasaklanmış, şarapta 350 ppm ve karideste 100 ppm olarak kullanımı sınırlandırılmıştır (2).

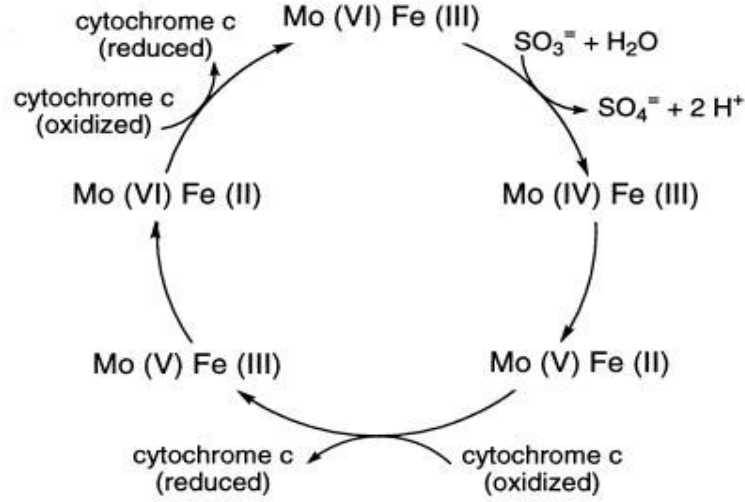
İlaçlarda sülfid kullanımı: İlaç endüstrisinde, ilaçların etkilerinin azalmasına neden olan oksidasyonu önlemek amacıyla  $\text{SO}_3^{-2}$  kullanılmaktadır (5). Sülfid içeren ilaçların intravenöz olarak enjeksiyonunda hemen sonra ya da dakikalar içinde  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin etkileri görülür. Ancak bu etkiler, subkutan ya da intramuskular enjeksiyonlarda daha geç ortaya çıkar (3). Ayrıca yine sıvı olarak ya da hap olarak ağızdan alınan ilaçlar da ağız boşluğunda  $\text{SO}_2$  gazı çıkarırlar. Bunu önlemek için  $\text{SO}_3^{-2}$  içeren ilaçlar, jelatin kapsül içinde verilmektedir. Bu durumda ağızda  $\text{SO}_2$  oluşumu gözlenmez, ancak jelatin kapsül mide sıvısında çözüldükten sonra yine  $\text{SO}_2$  oluşumu gözlenir (3).

$\text{SO}_2$  inhalasyonu: Kirli havadan  $\text{SO}_3^{-2}$  alımı, yiyecek, içecek ve ilaçlarla alıandan çok daha azdır. İnhalasyon ile alınan  $\text{SO}_2$  solunum yollarında  $\text{SO}_3^{-2}$ , bisülfid iyonları ile sülfüröz asite dönüşür. Epidemiyolojik çalışmalarda  $\text{SO}_2$  konsantrasyonu ile mortalite ve morbidite arasında pozitif bir ilişki saptanmıştır (127). Bu nedenle,  $\text{SO}_2$  konsantrasyonu 24 saatlik bir süre için ortalama 0.14 ppm'i, 1 yıllık bir süre için ortalama 0.03 ppm'i geçmeyecek şekilde standardize edilmiştir. (2).

### 2.3.3. Sülfid Metabolizması

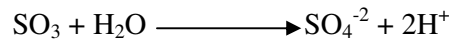
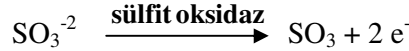
Endojen veya eksojen yolla alınan  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin temel oksidatif metabolizması mitokondriyel enzim olan sülfid oksidaz ile olur. Sülfid oksidaz enzimi bir molibdohemoprotein olup,  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin zararsız bir bileşik olan inorganik sülfata dönüşümünü katalizler (Şekil 2.16) (2, 128). Mitokondrinin membran arası

boşluğunda lokalize olan bu enzim homodimer olarak bulunmaktadır. Tavuk karaciğerinde her alt birimde üç bölge bulunduğu gösterilmiştir. Hem içeren N-terminal stokrin b<sub>5</sub> bölgesi, içerdiği on aminoasitle esnek olarak proteine bağlanmıştır. Merkez bölge enzimin aktif kısmını içerir. C terminali ise immüoglobülin proteinlerinden C2 alttipi ile aynı topolojiye sahiptir



Şekil 2.16. Sülfite oksidazın sülfite sülfata oksitlemesi

Bu enzimin çalışma prensibi,  $\text{SO}_3^{-2}$ 'den  $2 e^-$  olarak enzimin Mo-VI bölgesine, oradan sitokrom b<sub>5</sub> ve son olarak da solunum zincirindeki ferrisitokrom c'ye transfer etmesidir. Bu sırada, okside olan 1 mol  $\text{SO}_3^{-2}$  başına bir mol ATP üretilir (2).



Oluşan sülfat idrarla atılır. Normal bir insanın idrarında günlük 16-24 mmol inorganik sülfat bulunur ve büyük bir kısmı bu reaksiyonla üretilir (2).

Sülfite oksidaz aktivitesi türler arasında farklılıklar göstermektedir (Tablo 2.3). Sıçan, fare, kobay, hamster ve tavşanlarla yapılan bir çalışmada, en yüksek sülfite oksidaz aktivitesinin sıçanlarda olduğu tespit edilmiştir (129). İnsanlardaki sülfite oksidaz aktivitesinin ise, sıçanlara göre 10-20 kat daha az olduğu saptanmıştır (2).

Türler arası farklılıkların yanı sıra, sülfite oksidaz aktivitesinin dokular arasında da farklılıklar gösterdiği bulunmuştur (Tablo 2.3). Sülfite oksidaz aktivitesinin, sıçanların beyin, dalak, akciğer ve testislerinde düşük, karaciğer, böbrek ve kalp dokularında ise yüksek düzeyde olduğu saptanmıştır. Bu dokularda sülfite oksidaz

aktivitesinin daha yüksek olması, bu dokulardaki aminoasit katabolizmasının fazla olmasından kaynaklanmaktadır (130).

**Tablo 2.4.** Değişik canlı türlerinin farklı dokularındaki sülfid oksidaz aktiviteleri (Ü/g doku)

	domuz	koyun	inek	at	sıçan
Karaciğer	0.07±0.01	0.63±0.07	0.71±0.08	0.73±0.05	1.52±0.1
Böbrek	1.33±0.11	0.49±0.05	0.07±0.08	0.57±0.03	-
Kalp	0.32±0.03	0.11±0.01	0.47±0.07	-	1.26±0.2
Beyin	0.47±0.02	-	-	-	0.02±0.001
Dalak	**	0.08±0.009	0.007±0.001	-	0.04±0.001
Akciğer	**	0.013±0.002	(1.6±0.2)×10 <sup>-4</sup>	-	0.039±0.006
Testis	0.048±0.004	-	0.21±0.03	**	0.096±0.008

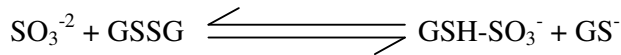
\*\* : sülfid oksidaz aktivitesinin ölçülmediği dokular

— : sülfid oksidaz aktivitesinin saptanamadığı dokular (130)

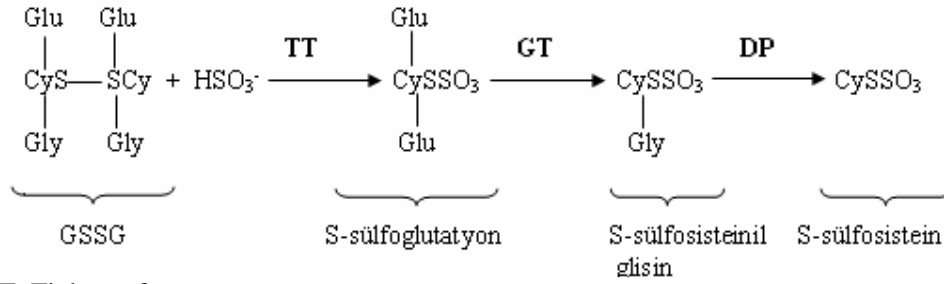
Sülfid oksidaz normal fizyolojik metabolizma için gerekli olan bir enzimdir. Sülfidin çok düşük konsantrasyonlarında bile sülfid oksidaz tarafından etkili bir biçimde okside edilebilmesi, dokularda SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>'nin çok düşük konsantrasyonlarda tutulmasını sağlayan etkili bir mekanizmadır (2).

Sülfid oksidazın SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>'yi okside etme kapasitesi, SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>'nin biosentezi ile karşılaştırıldığında çok fazladır. Örneğin, sıçanlarda günlük üretilen SO<sub>3</sub><sup>-2</sup> miktarı yaklaşık 0.5 mmol/kg/gündür. Ancak, bir sıçanın sülfid oksidaz aktivitesi günde 750 mmol/kg sülfidi okside edebilecek kapasitededir (2). Endojen olarak üretilen SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>'nin plazmada dedekte edilebilmesi için önce sıçanın hepatik sülfid oksidaz aktivitesinin normal seviyenin % 1'ine düşürülmesi gerekmektedir (2).

Sülfid oksidaz enziminin eksikliğinde veya çok fazla SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>'ye maruz kalındığında, SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>, sistin ve okside glutatyon gibi düşük moleküler ağırlıktaki tiollerin veya protein gibi makro moleküllerin disülfid bağlarıyla sülfitolizis denen reaksiyona girerek S-sülfonatları oluşturur. S-sülfonatları (S-sülfosistein ve S-sülfoglutatyon), normal insan idrarında gösterilememesi nedeniyle, normal fizyolojik koşullarda yavaş işleyen bu nonenzimatik yolağın önemsiz olduğu düşünülmüştür (2). Ancak, Mannervik ve ark. (28) glutatyon disülfidin sülfitolizisinin, sıçan karaciğerinde bulunan tiol transferaz enzimi ile katalize edildiğini ve oluşan S-sülfoglutatyonun, transhidrojenaz enzimi yardımıyla indirgenmiş glutatyonla reaksiyona girerek SO<sub>3</sub><sup>-2</sup> ve okside glutatyon (GSSG) oluşturduğunu göstermişlerdir (131).



Sülfidin S-sülfosisteine dönüşmesi Şekil 2.17'de özetlenmiştir.



TT: Tiol transferaz

GT:  $\gamma$ -glutamil transpeptidaz

DP: Dipeptidaz

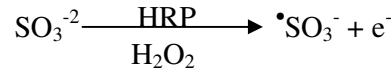
**Şekil 2.17.** Glutasyonun S-sülfosisteine dönüşümü (28)

Göz merceği, intestinal mukoza gibi hayvan dokularında tespit edilen S-sülfoglutasyon, GSH-S-transferaz enziminin potent kompetitif inhibitörü olup, karsinojenik bileşiklerin detoksifikasyonunu azaltarak  $\text{SO}_2$ 'nin toksik etkilerinde önemli bir rol oynar (28).

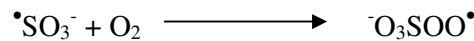
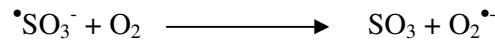
Sülfitin diğer bir metabolitide thiosülfat olup idrarla düşük miktarda ( $32 \pm 13$   $\mu\text{mol/gün}$ ) atılır. Thiosülfat, sülfidin thiosistein veya 3-merkaptoprivat (sisteinin bir ürünü) ile reaksiyonu sonucu oluşur (2).

### 2.3.4. Sülfid Radikallerinin Oluşumu

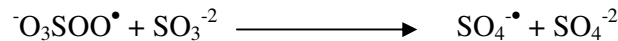
Sülfitin sülfata oksidasyonu nonenzimatik serbest radikal mekanizmaları ile de gerçekleşir. Ancak normal fizyolojik koşullarda bu mekanizmanın önemli olmadığına inanılmaktadır. Zira  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin bu yolla oksidasyonu sülfid oksidaz enzimine göre çok yüksek  $\text{SO}_3^{-2}$  ve oksijen konsantrasyonunda gerçekleşir. Bu koşullarda (yüksek  $\text{SO}_2$  konsantrasyonu ve düşük sülfid oksidaz aktivitesi)  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin oksidasyonu peroksidazlar tarafından katalizlenir. Sülfitin bu enzimler tarafından katalizlenen oksidasyonu sonucunda sülfür merkezli bir radikal olan sülfür trioksit anyon ( $^{\bullet}\text{SO}_3^-$ ) radikali oluşur (6).



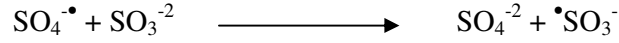
Oluşan  $^{\bullet}\text{SO}_3^-$ , moleküler oksijenle reaksiyona girerek az miktarda  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , çok miktarda peroksil radikalini ( $^{\bullet}\text{O}_3\text{SOO}^{\bullet}$ ) oluşturur (6).



Sülfür trioksit oluşuktan sonraki zincir reaksiyonları da otokatalitik olarak iki aşamada gerçekleşir. Peroksil ile  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin reaksiyonu sonucu  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  oluşur (6).

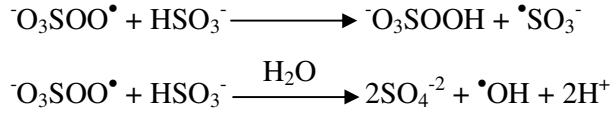


Sülfat anyon radikali ayrıca hızlı bir şekilde  $\text{SO}_3^{-2}$ 'yi okside eder ve sonuçta  $\bullet\text{SO}_3^-$ 'yi oluşturur (6).

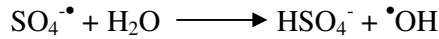


Oluşumu oksijene bağımlı olan  $\text{SO}_4\bullet$ 'nin,  $\bullet\text{OH}$  kadar reaktif olması nedeniyle karsinojenik etkilerinin olduğu öne sürülmektedir. Ayrıca,  $\text{SO}_4\bullet$ 'i kolayca çift bağ oluşturabilir ve kısmen antijen olan haptenlerin oluşumunu sağlar. Dolayısıyla,  $\text{SO}_4$ 'nin bazı insanların  $\text{SO}_3^{-2}$ 'ye karşı olan alerjik cevaplarından sorumlu olabileceğine inanılmaktadır. Ek olarak  $\text{SO}_4\bullet$ 'nin yüksek reaktivitesinden dolayı, methionin ve triptofanın oksidasyonundan, klorofil ve  $\beta$ -karotenin tahrip olmasından, lipid peroksidasyonundan ve membran hasarlarından kısmen sorumlu olduğu düşünülmektedir (6).

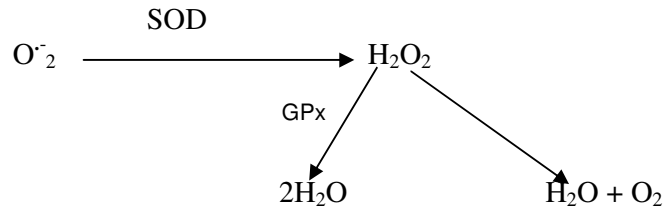
Sülfitin peroksil radikali ile olan reaksiyonu yanı sıra iki önemli reaksiyonu daha öne sürülmüştür. Bisülfitin peroksil ile olan reaksiyonu sonucunda, sülfür trioksit radikali ve hidroksil radikali ortaya çıkar.



Ayrıca  $\text{SO}_4\bullet$  su ile de reaksiyona girerek  $\bullet\text{OH}$  oluşturabilir. Ancak bu reaksiyon, zincir reaksiyonlarının ilerlemesinde önemli bir reaksiyon değildir, çünkü  $\text{SO}_4\bullet$ ,  $\text{SO}_3^{-2}$  tercih eder (6).



Sülfitin serbest radikal oluşturma mekanizması içerisinde öne sürülen en önemli etkilerinden biri de GSH depleksiyonuna (27) neden olmasıdır. GSH bilindiği gibi, serbest radikallere karşı antioksidan savunma sisteminin önemli bir ögesidir. Süperoksit anyon radikalinin SOD ile enzimatik yıkımı sonucu oluşan  $\text{H}_2\text{O}_2$  suya çevrilerek detoksifiye edilmesi işlevini GPx ve CAT enzimleri birlikte paylaşır (27).



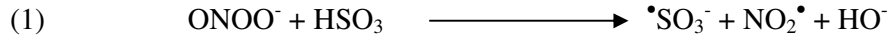
Glutasyon peroksidaz bu işlevini yaparken GSH, GSSG'a döner. Redükte glutasyon ise, GR ile tekrar GSH'a dönüştürülür (27). Bu siklusun  $\text{SO}_3^{-2}$  iyonları tarafından bozulabileceği gösterilmiştir. Sülfid iyonu GSSG ile reaksiyona girerek

GSSO<sub>3</sub> oluşumuna neden olur. Bu molekül ise GR tarafından tekrar GSH'a dönüştürülemediğinden transpeptidazlar ile parçalanarak tiosülfat haline çevrilir (25). Bu molekül de bilindiği gibi idrarla atılmaktadır. GSH'un bu mekanizma ile tüketilmesi nöronları radikal hasara karşı savunmasız bırakmaktadır. Bu etkiye ek olarak GSSO<sub>3</sub> molekülünün benzo(α) piren gibi PAH'ların detoksifikasyonunda görev alan GST enzimini inhibe ettiği bildirilmiştir (25). Bu bulgu Alzheimer hastalığında ksenobiyotik metabolizmasındaki bozuklukların gösterilmesi ile klinik olarak da desteklenmiştir (18). Bu iki etki beraber düşünüldüğünde hücrelerin toksinlerin etkilerine karşı oldukça dayanıksız olacağı açıktır.

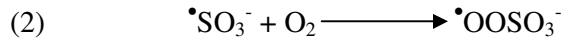
Nitekim GSH düzeyi düşürülmüş hayvanlarda çeşitli nörotoksinlere karşı hassasiyetin arttığı bilinmektedir. Parkinson ve Incidental Lewy Body hastalığında (ILBD) nöronların GSH düzeyinin kontrole göre yaklaşık % 50 oranında azaldığı göz önüne alınırsa (132), bu hastaların toksinlerin zararlı etkilerine daha açık olacakları düşünülebilir. Bu düşünceden yola çıkılarak yapılan deneysel çalışmalarda GSH içeriği azaltılmış sıçan mezensefalik hücre dizilerinde SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>'nin hücre canlılığını önemli oranda azalttığı gösterilmiştir (31). Yine aynı hücre dizisinde SO<sub>3</sub><sup>-2</sup> ve ONOO<sup>-</sup>'nin tek başlarına toksik etkilerinin gösterilmesine ilaveten, beraber oldukları zaman toksik etkide sinerjizmaya neden oldukları bildirilmiştir (133).

#### **Sülfitin Peroksinitrit ile Olan Reaksiyonu**

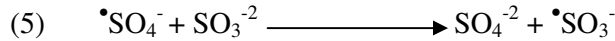
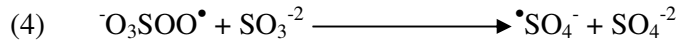
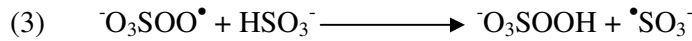
Nitrik oksid ile O<sub>2</sub><sup>•-</sup> arasındaki reaksiyon sonucu oluşan peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>), HSO<sub>3</sub> ile reaksiyona girerek <sup>•</sup>SO<sub>3</sub><sup>-</sup> oluşturur (7).



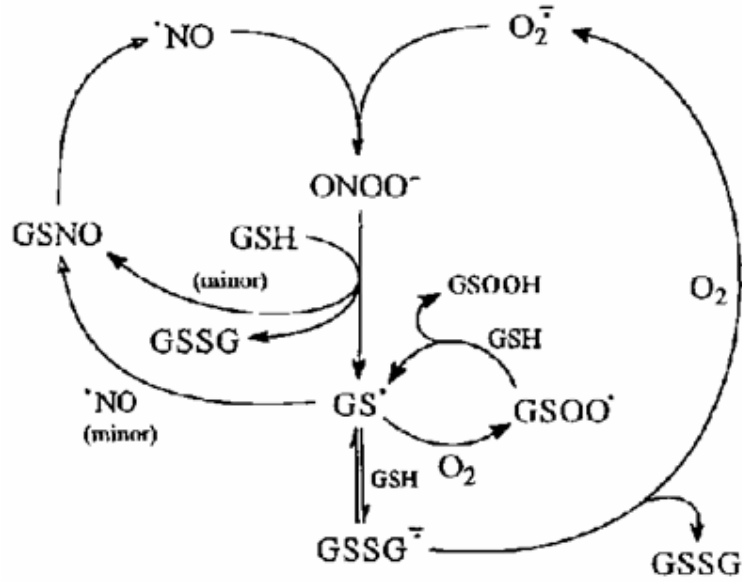
Sülfid radikali ve oksijenin reaksiyonu ile peroksil radikali (OOSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) oluşur (7).



Bu reaksiyonu takip eden diğer reaksiyonlar ve radikal oluşumları aşağıda özetlenmiştir.



Ayrıca peroksinitrit ile tioller (glutasyon) arasındaki reaksiyonlar bir dizi thiyol radikallerinin oluşumunu sağlar (şekil 2.18).



**Şekil 2.18.** Glutasyonun zincir reaksiyonları (7) GSNO: S-nitrosoglutasyon, GSSG: glutasyon disülfid, GSOOH: glutasyon sülfenil hidroperoksit

Peroksinitrit GSH'ın oksidasyonunu sağlayarak glutathionyl radikalini (GS•) oluşturur. Glutathionyl radikalinin moleküler oksijenle reaksiyonu sonucu glutasyon tiylperoksil radikali (GSOO•), GS• ile reaksiyonu sonucu glutasyon disülfid anyon radikali (GSSG•<sup>-</sup>) oluşur. Glutasyon disülfid anyon radikalinin, moleküler oksijenle reaksiyonu sonucu O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> ve GSSG ortaya çıkar (7,141).

### 2.3.5. Sülfite Toksikitesi

Sülfite duyarlı bireylerde oluşan bronkospazm ve allerjik tip reaksiyonlar ilk defa 1976 yılında gözlenmiş ve SO<sub>3</sub><sup>-2</sup> duyarlılığı olarak tanımlanmıştır. Yapılan araştırmalarda SO<sub>3</sub><sup>-2</sup> duyarlılığının görüldüğü bireylerin %70'ini astımlıların oluşturduğu saptanmıştır. Bilindiği gibi bütün astımlılar normal kişilere göre solunum yoluyla alınan SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>'ye daha duyarlı iken, astımlıların sadece küçük bir kısmı diyetle alınan SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>'ye reaksiyon göstermektedir. Zira havayla alınan SO<sub>2</sub> miktarı diyetle alınana göre çok düşük olsa da, astımlıların solunum sistemleri SO<sub>2</sub> veya SO<sub>3</sub><sup>-2</sup> bileşiklerine bronkokonstriksiyon oluşturduğu için son derece hassastır. Solunum yoluyla alınan SO<sub>2</sub>'in bronkokonstriksiyon oluşturma mekanizmalarından birinin parasempatik reflekslerin aktivasyonuna bağlı olduğu kabul edilmektedir (2,4).

Diyetle alınan SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>'lere olan hassasiyet astımlıların %5'inde görülmekte ve astımlı kişilerin sülfür içeren yiyecek ve içeceklerden sakınmaları FDA tarafından tavsiye edilmektedir. Bu duyarlılığın tam mekanizması bilinmemekle birlikte, bunu açıklamak için 3 temel mekanizma ileri sürülmüştür.

1. Sülfite içeren ilaçlar ya da yiyecekler alındığında ağızda ve midede SO<sub>2</sub> gazı oluşur. Midede yüksek miktarlarda SO<sub>2</sub> oluşması ile ortaya çıkan şişkinlik, vagal uyarı ve gastrin salınımına neden olur. Vagal uyarı kolinerjik ürtiker, bradikardi, hipotansiyon ve bronkokonstriksiyonun yanısıra abdominal ağrı, şişkinlik, kramp ve ishal gibi

gastrointestinal şikayetlerde yol açar. Gastrin salınımı ise bazofillerden histamin salınımına neden olarak allerjik reaksiyonlara aracılık eder (4).

2. Sülfite sensitivitesinin diğer bir mekanizması da IgE aracılı hipersensitivitedir. Sülfite bağlı anafilaksi ve allerjik cilt reaksiyonlarının bu mekanizma ile olduğu düşünülmektedir (4).

3. Sülfite duyarlılığını açıklayan mekanizmalar içerisinde en önemlisinin sülfite oksidaz enziminin eksikliği olduğu bildirilmektedir (2). Bu enzim, günde 1000 mg civarında endojen üretilen  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin inaktif sülfata dönüşümünü sağlar. Sülfite oksidaz eksikliği olan çocuklarda nörolojik problemler, göz problemleri ve gelişim anormallikleri görülmüştür (4).

Özellikle hava kirliliğinin en önemli bileşeni sayılan  $\text{SO}_2$ 'nin atmosferdeki doğal  $0.04-0.45 \text{ mg/m}^3$  düzeyindedir. Epidemiyolojik çalışmalar bu miktarın  $0.6 \text{ mg/m}^3$ 'ü aşmasının pek çok solunum yolu hastalığına neden olabileceği gösterilmiştir (12). Solunum sisteminde başta bronkokonstrüksiyon olmak üzere, alveol kalınlaşması, alveol hiperplazisi, akciğer ödemi, akciğer kanserine yatkınlık gibi pek çok direkt etkisi gösterilmiştir. Yine bu yolla alınmaya bağlı, akciğer ve kalp hastalıklarının, artmış mortalite ve morbitide oranları yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (12-14, 134-136).

Oldukça reaktif bir molekül olan  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin solunum sistemi dışında, *in vitro* ve *in vivo* olarak başta nükleik asitler olmak üzere çeşitli biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek toksik etki gösterdiği pek çok çalışma ile teyit edilmiştir. Bu çalışmalar  $\text{SO}_2$  türevlerinin, insan lenfositlerinde kromozomal aberrasyonlar, kardeş kromatid değiş tokuşu ve mikroçekirdek oluşumuna neden olurken (137), farelere verilmesi durumunda çeşitli organlarda (beyin, akciğer, kalp, dalak, böbrek, kemik iliği) DNA hasarına yol açabildiğini göstermiştir (138). Ayrıca, *in vitro* çalışmalarda,  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin DNA'daki sitozin ve RNA'daki urasil ile reaksiyona girdiği, serbest radikal mekanizmalarıyla DNA ve RNA zincirlerine zarar verdiği gösterilmiştir (139-141) ve sülfür içeren proteinlerin disülfid bağlarının parçalanmasına sebep olduğu bildirilmiştir (139). Bunun yanında,  $\text{SO}_2$  inhalasyonunun sıçan ve farelerin akciğer, kalp ve beyinlerinde oksidasyona bağlı hasarın yanısıra DNA hasarına da yol açabileceği ileri sürülmüştür (138, 142, 143).

Sülfitin birçok dokuda olduğu gibi nöronlar üzerine de toksik etkileri söz konusudur. Genetik olarak sülfite oksidaz eksikliği olan hastalarda yapılan çalışmalarda, endojen  $\text{SO}_3^{-2}$ 'ye maruz kalma sonucu şiddetli nörolojik disfonksiyon, mental gerilik, beyin gelişiminin yavaşlaması (19) ve erken ölümle karakterize vakalar saptanmıştır (144). Ayrıca,  $\text{SO}_2$  türevleri olan  $\text{SO}_3^{-2}$  ve metabisülfitin sıçan hippocampal CA1 nöronları ve dorsal kök gangliyonlarının sodyum ve potasyum akımlarını değiştirdiği de gösterilmiştir (145-147). Diğer yandan,  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin VEP bileşenlerinin latenslerini ve genliklerini değiştirerek görsel sistemi olumsuz yönde etkilediği tespit edilmiştir (73, 148). Bu bulgular,  $\text{SO}_2$ 'nin yalnızca solunum sistemini etkilemediğini, sistemik bir toksik ajan olduğunu göstermektedir.



## GEREÇLER VE YÖNTEMLER

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik, Biyokimya, Fizyoloji, Merkezi Araştırma Laboratuvarı ve Deney Hayvanları Ünitesinde gerçekleştirilen çalışmamızda 60 adet 3 aylık, ortalama 250-300 gr ağırlığında, erkek Wistar sıçan kullanılmıştır.

### Gruplandırma

Deney Hayvanları Ünitesinden birer hafta ara ile rastgele alınan toplam 60 adet sıçan her grupta 15 hayvan olacak şekilde dört gruba bölünerek,

Grup 1: Kontrol grubu (K)

Grup 2: Sülfite1 grubu ( 10 mg/kg/gün )

Grup 3: Sülfite2 grubu ( 100 mg/kg/gün )

Grup 4: Sülfite3 grubu ( 260 mg/kg/gün )

grupları oluşturulmuştur.

### 3.2. Deney Protokolü

35 günlük deney süresi boyunca, hayvanlar her kafeste 5 hayvan olacak şekilde, 12 saatlik karanlık/aydınlık siklusunda tutulmuşlardır. Bu süre içinde hayvanlar, ticari sıçan yemi ve musluk suyu ile beslenmiştir. Yem-su tüketimleri günlük olarak, ağırlık değişimleri ise haftada bir kez ölçülerek takip edilmiştir.

Deney süresince;

- i) K grubuna distile su,
  - ii) S1 grubuna 10 mg/kg/gün  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$
  - iii) S2 grubuna 100 mg/kg/gün  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$
  - iv) S3 grubuna 260 mg/kg/gün  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$
- gavajla verilmiştir.

### 3.3.Sülfite Verilmesi

Sodyummetabisülfite 10, 100 ve 260 mg/kg dozlarında olmak üzere içme sularına ilave edilmiştir. Bu dozlar Hui ve ark. (149) tarafından yapılan çalışma esas alınarak seçilmiştir. Doz hesaplarında sodyummetabisülfite'in 67.39 % sülfite oluşturduğu göz önünde tutulmuştur.

Sodyummetabisülfite'in günlük kabul edilebilir dozu hayvanlarda yapılan çalışmalar doğrultusunda 100 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Ancak çalışmamızda sülfite maruziyetin beslenme alışkanlığına ve bazı riskli iş kollarına göre artabileceği göz önüne alınarak daha yüksek bir düzey olan 260 mg/kg sülfite dozu da kullanılmıştır.

### 3.4. Görsel Uyarılma Potansiyellerinin Kaydedilmesi

Görsel uyarılma potansiyelleri hafif eter anestezisi altında hayvanların kafalarına yerleştirilen iğne elektrotları (NE-223S, 5 mm Nihon Kohden) ile Biopac MP100 Data Acquisition cihazında kaydedilmiştir. 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 defa ve en düşük şiddette (0.1 J) olacak şekilde ayarlanmıştır.

Flaşla oluşturulan görsel uyarılma potansiyelleri (FVEP) sağ ve sol göz olmak üzere monooküler uyarılar kaydedilmiştir. Deney süresince flaş verilmeyen diğer göz bir pamuk ve karbon kâğıdı ile kapatılmıştır. Bu esnada hayvanların vücut sıcaklıkları ısıtıcı yardımıyla 37-38.5 °C arasında sabit tutulmuştur (71).

Çalışmada kullanılan cihazın amplifikatörünün limitleri 1 Hz- 3 KHz, kazancı 20 µV/div, analiz zamanı 300 ms olarak ayarlanmıştır. FVEP'ler 100 kez ortalama alınarak kaydedilmiştir. Kayıt alındıktan sonra FVEP'ler dijital olarak kesim frekansı 100 Hz olan alçak geçiren filtre ile işlenmiştir.

VEP'lerin tekrarlanabilirliğini sağlamak amacıyla her kayıt en az iki kez yapılmıştır. İzoelektrik çizginin üzerindeki potansiyel tepeler negatif (N), altındaki çukurlar pozitif (P) olarak kabul edilmiştir. Tepe latensleri stimulus artifaktından itibaren milisaniye (ms) birimiyle, birbirini izleyen ters polaritedeki dalgaların genlikleri tepeden-tepeye mikrovolt (µV) birimiyle hesaplanmıştır.

### 3.5. Biyokimyasal Yöntemler

Deney protokolü, grupların arasında birer hafta olacak şekilde planlanmıştır. Görsel uyarılma potansiyelleri kayıt edildikten bir gün sonra hayvanlara üretilen anestezisi uygulanmış ve abdominal aorttan heparinize kan örnekleri alınmıştır. Bu işlemi takiben kardiak perfüzyon ile beyin ve göz dokuları kandan arındırılarak eksize edilmiş, beyin dokuları sıvı nitrojen içerisinde dondurulmuştur. Çıkarılan göz dokularından retina izolasyonu yapılmış, ayrılan retinalar 1 mM EDTA içeren 50 mM soğuk K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH= 7) tamponunda, buz üzerinde homojenize edilerek ( PRO 200 Homogenizater, PRO Scientific Inc.,Connecticut, USA ), -80 °C'da saklanmıştır. Çıkarılan beyin dokularının bir yarısı TBARS, GSH ve GSSG, diğer bir yarısı da 4-HNE parametrelerinin ölçümleri için ayrılmıştır. TBARS, GSH ve GSSG ölçümleri için beyin dokuları 1 mM EDTA içeren 50 mM soğuk K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH= 7) tamponunda, buz üzerinde (Biofuge15R, Heroeus, Germany) homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatların 4 °C'da, 10000 x g'de, 15 dakika, santrifüj edilmesiyle elde edilen süpernatantlar -80 °C'da muhafaza edilmiştir. 4-hidroksinonenal ölçümü için ayrılan beyin dokuları soğuk homojenizasyon tamponunda (50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 80 µM leupeptin, 2.1 mM Pefablok, 1mM phenylmethylsulfonyl florid, 1 µg/ml aprotinin, (pH= 7.4) buz üzerinde homojenize edilmiş, elde edilen homojenatların 4 °C'da, 15000 x g'de, 30 dakika santrifüj edilmesinden sonra ayrılan süpernatantlar -80 °C'da saklanmıştır.

### 3.5.1. Doku Tiobarbitürik Asit Reaktif Ürünlerinin (TBARS) Ölçümleri

Beyin ve retina dokularında TBARS ölçümleri, Wasowicz ve arkadaşlarının yöntemine göre yapılmıştır (150).

**Prensip:** Bu metodun temel prensibi, lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA, 2-tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi ve oluşan bileşiğin butanol fazına ekstrakte edilerek 525 nm eksitasyon ve 547 nm emisyon dalga boyunda spektrofotometrik olarak okunması esasına dayanır.

#### Reaktifler:

1. 29 mM tiobarbitürik asit (Sigma-T5500): 0.418 g TBA, 50 ml distile su ve 50 ml glacial asetik asit( Acetic acid glacial extra pure, Merck-56 ) içinde çözülmüştür.
2. 5 M HCl ( Hydrochloric acid, Merck-314 )
3. n-bütanol ( n-Butanol, Merck-329 )
4. Standart solüsyonu: Tetraetoksipropan (1,1,3,3-tetraethoxy-propane, Sigma-T9889 ) stok solüsyonundan distile su ile sulandırılarak hazırlanmıştır.

**İşlemler:** 1 ml distile su içeren tüpe 50 µl doku süpernatantı konulduktan sonra, 1 ml tiobarbitürik asit (TBA, 29 mmol/L) eklenmiştir. Tüp iyice karıştırıldıktan sonra, 1 saat süreyle 95-100 derece arasında kaynatılmıştır. Numuneler soğutulduktan sonra 25 µl HCl (5 mol/L) ve 3.5 ml n-bütanol eklenerek vortekslenmiş ve bu işlemi takiben 3000xg'de 10 dakika santrifüj edilerek, bütanol fazı ayrılmıştır. Bütanol ekstraktının floresansı, eksitasyon dalga boyu 525 nm, emisyon dalga boyu 547 nm olarak spektrofotometrede (Perkin Elmer Luminescence spectrometer, LS50B) okunmuştur.

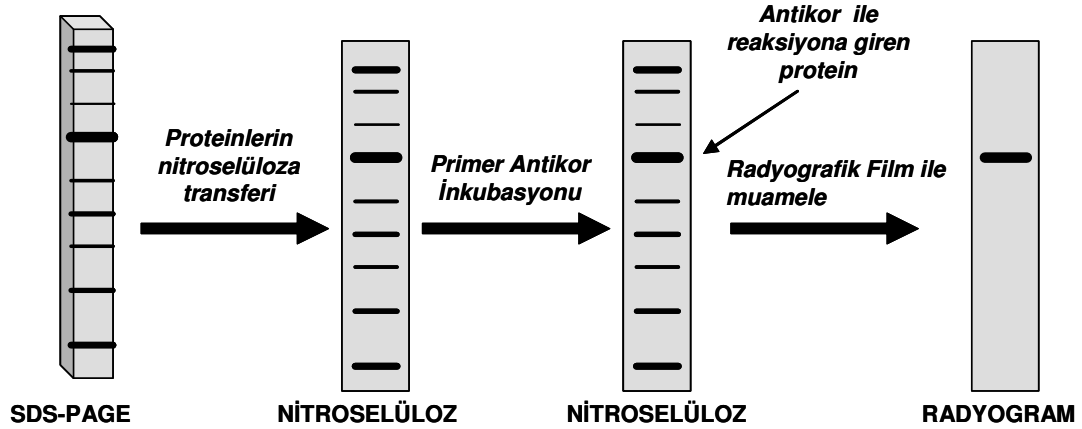
**TBARS Miktarının Hesaplanması:** 1,1,3,3,-tetra-metoksi-propan standardı numune gibi çalışılarak standard grafiği oluşturulmuştur. Dokuların TBARS miktarı bu grafik yardımıyla hesaplandıktan sonra nmol/g protein olarak saptanmıştır.

### 3.5.2. 4-Hidroksinonenal (4-HNE) Aktivitesinin Tayini

**Prensip:** Western Blot Analizi için beyin ve retina homojenatlarından elde edilen proteinler sodyumdodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ayrıldıktan sonra jeldeki proteinler nitroselüloza transfer edilerek anti-4-HNE ile inkübe edilmişlerdir. Daha sonra ortama peroksidaz bağımlı sekonder antikor ilave edilerek immünoreaktif bantlar kemilüminesans yöntemle gözlenmiştir.

**İşlemler:** 4-HNE aktivite tayini PAGE-western blot yöntemiyle yapılmıştır ( Şekil 3.1 ). Elde edilen hücre lizatları santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlarda protein konsantrasyonu 595 nm'de Coomassie reaktifi kullanılarak belirlenmiştir. Bu ölçümde bovin serum albumin standard olarak kullanılmıştır. Elde edilen protein homojenatı Laimle tamponu ile 1:2 oranında karıştırılmış, %7,5'luk poliakrelamid jele tatbik edilerek elektroforetik ayırım sağlanmıştır. Jelde ayrılan protein, selüloz asetata transfer edilerek western blot analizi gerçekleştirilmiştir. Ayrılan hücre proteinleri ayrı olarak primer anti-HNE antikor (Anti-HNE-Michael Adducts, Reduced Rabbit pAb) içerisinde (1:1000 dilüsyonda) 1 saat 25 °C'da bekletildikten

sonra HRB-bağlı sekonder antikor (ZYMED, San Fransisco, California) (1:10 000 dilüsyona) ile muamele edilmiştir. Reaktif doku proteinleri kemilüminesans yöntemiyle belirlenmiştir.



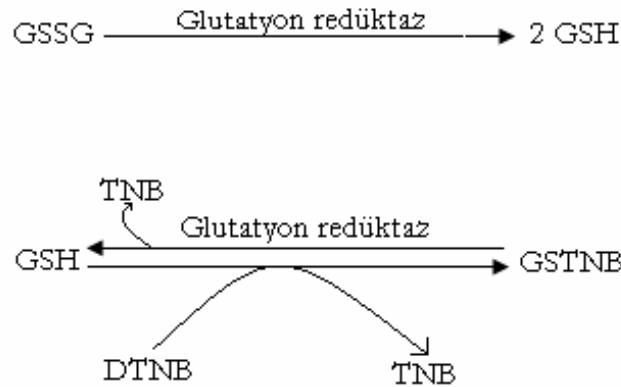
Şekil 3.1. SDS-PAGE ve Western Blot Analizi

**4-HNE Aktivitesinin Hesaplanması:** Görüntülenen protein bantlarının dansitometrik analizi, NIH image 1,61 software programı kullanılarak yapılmıştır.

### 3.5.3. Redükte Glutasyon ( GSH ) ve Okside Glutasyon ( GSSG ) Tayini

GSH ve GSSG ölçümleri ticari bir kit (Cat. #703002. Cayman Chemical Ann Arbor, MI ) ile yapılmıştır ( Tietze F. Enzymic method for quantitative).

**Prensip:** GSH'nın sülfidril grubu, DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asit) ile reaksiyona girer ve ürün olarak sarı renkli 5-thio-2-nitrobenzoik asit (TNB) meydana çıkar. Oluşan TNB miktarı GSH oluşum miktarı ile orantılıdır. Bu nedenle 405 nm'de TNB miktarını tayin etmek GSH miktarının tam olarak ölçülmesini sağlar.



**Reaktifler:**

- 1 ) Metafosforik asit tamponu (MES, 2X)
- 2 ) GSSG standardı
- 3 ) Kofakör karışımı
- 4 ) Enzim karışımı
- 5 ) DTNB
- 6 ) Trietanolamin reaktifi (TEAM, 4 M)
- 7 ) 2-Vinil-pridin (1 M)

**İşlemler:** 150 µl doku süpernatantı içerisine 150 µl MPA reaktifi ilave edilerek oda ısısında 5 dakika inkübe edilmiştir. Bu işlemi takiben 5000g'de 5 dakika santrifüj yapılarak her bir dokudan elde edilen süpernatantlar GSH ve GSSG ölçümleri için iki ayrı ependorf tüpe 100 er µl olacak şekilde aktarılmıştır. GSH ölçümü için 100 µl süpernatant üzerine 5 µl TEAM reaktifi ilave edilerek karıştırılmıştır. Karışımdan alınan 50 µl numune üzerine, MES (2-N-morfolin etansülfonik asit), kofaktör karışımı (NADP ve glukoz-6-fosfatın liyofilize formunu içerir), enzim karışımı (glutasyon redüktaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz içerir), DTNB (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoik asit) ve distile su içeren 150 µl ölçüm kokteyli ilave edilerek karanlıkta inkübe edilmiştir. 25 dakikalık inkübasyonu takiben 405 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. GSSG tayini için 100 µl doku süpernatantı üzerine 1 µl 2-vinilpiridin ilave edilerek 60 dakika oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlemden sonra GSH ölçümündeki basamaklar aynen takip edilmiştir.

**GSH ve GSSG Miktarlarının Hesaplanması:** GSSG standardı aynen numune gibi çalışılarak standart grafiği oluşturulmuştur. Dokulardaki GSH ve GSSG miktarları bu grafikler yardımıyla hesaplandıktan sonra nmol/mg protein olarak ifade edilmiştir.

**3.5.4. Plazma-S-Sülfonat tayini**

Plazma-S-Sülfonat ölçümü Gunnison ve Palmes'in yöntemi modifiye edilerek ölçülmüştür (41).

**Prezup:** Yöntem alkali ortamda potasyum siyanürün (KCN) plazma proteini+SO<sub>3</sub><sup>-2</sup> kompleksi olan S-sulfonattan SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>'i koparması bu SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>'in de parorasanil reaktifiyle birleşip 560 nm'de absorbans artışına sebep olması esasına dayanmaktadır.

**Reaktifler:**

- 1- 0.125 mmol potasyum siyanür ( KCN )
- 2- Glisin – NaOH tamponu ( 0.01 M, pH = 10.2 )
- 3- HCl (0.15 N)
- 4- Sodyum tetrakloromerkürat solüsyonu (0.18 M)
- 5- Parorasanil reaktifi
- 6- Formaldehit reaktifi

**Yöntem:** Daha öncede belirtildiği gibi hayvanlara deney sonunda üretan anestezisi uygulanmış ve abdominal aortlarından kanları alınmıştır. Alınan heparinize kanlar 1400xg'de 6 dakika santrifüj edilerek plazmaları elde edilmiştir. 1 ml plazma, 200 µl KCN ile karıştırılmış ve 36 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda karışımın 1ml'si dializat torbasına aktarılmış ve 5 ml glisin-NaOH tamponu

içerisinde 4 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra dializat torbasının dışındaki solüsyondan 1.4 ml bir tüpe aktarılarak üzerine sırası ile aşağıdaki reaktifler ilave edilmiştir.

- 1- 0.15 N HCl (200 µl)
- 2- Sodyum tetramerkürat solüsyonu (200 µl)
- 3- Distile su (200 µl)
- 4- Formaldehit reaktifi (200 µl)
- 5- Parorasalin reaktifi ( 200 µl )

İşlemleri takiben karışım vortekslenmiş ve 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda spektrofotometrede 560 nm’de absorban okunarak kaydedilmiştir.

**Plazma-S-Sülfonat Miktarlarının Hesaplanması:** Deney gruplarına verilen sülfid miktarları baz alınarak standart grafiği oluşturulmuştur. Plazmadaki S-Sülfonat düzeyleri bu grafik yardımıyla hesaplanmış ve sonuçlar µmol sülfid/ml olarak verilmiştir.

### 3.5.5. Protein Tayini

Beyin ve retina dokularında protein tayini modifiye Bredford yöntemine dayanan bir kit ile yapılmıştır (151).

#### **Reaktifler:**

- 1 ) Standart solüsyon: 2 µg/ µl bovin serum albümin (Albümin Bovina, Sigma, A-8022)
- 2 ) CPPA reaktifi (Coomassie Plus Protein Assay Reagent, Pierce-1856210 )

**İşlemler:** 1 µl doku süpernatantı 999 µl distile su ile sulandırıldıktan (1:1000) sonra üzerine 1 ml CPPA reaktifi eklenmiş ve 595 nm’de absorban spektrofotometrik olarak okunmuştur. Standart çalışması ise, numune yerine artan konsantrasyonlarda 1:1000 sulandırmaya sahip BSA kullanılarak yapılmıştır.

**Protein Miktarının Hesaplanması:** Dokulardaki protein miktarı standart grafiği kullanılarak hesaplanmıştır.

### 3.6. Sonuçların Değerlendirilmesi

İstatistiksel değerlendirme SPSS paket programı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Her değişken için normallik testi uygulanmıştır, Normal dağılıma uyan veriler için parametrik olan Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve onu takiben Tukey Post Hoc Testi, uymayanlarda ise nonparametrik olan Kruskal Wallis Varyans Analizi ve onu takiben Mann-Whitney U Testi kullanılmıştır. Bağlantı (korelasyon) analizleri Pearson testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. P<0.05’i sağlayan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## BULGULAR

### 4.1. Genel Görünüm

Deney süresince hayvanların genel görünüm ve davranışlarında herhangi bir değişiklik görülmemiştir.

### 4.2. Besin Tüketimi

Grupların 5 haftalık deney süreleri boyunca günlük yem tüketimleri takip edilmiş ve bulgular 100 gram vücut ağırlığı başına g/gün olarak hesaplanmıştır.

Grupların besin tüketimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Tablo 4.1).

### 4.3. Ağırlık Değişimi

Deney gruplarının haftalara göre ağırlık değişimleri Tablo 4.1’de verilmiştir. Deney süresi boyunca tüm deney gruplarındaki hayvanların haftalık vücut ağırlıkları takip edilmiş, grup içinde ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

### 4.4. Doku Tiobarbitürik Asit Reaktif Ürünleri (TBARS) Sonuçları

Beyin ve retina TBARS sonuçları Tablo 4.2’de gösterilmiştir. 10 mg/kg dozundaki sülfite retina ve beyin TBARS değerlerine etki etmediği gözlenmiştir. 100 mg/kg sülfite uygulanan grupta ise retina ve beyin TBARS değerlerinin hem S1 hem de kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir. Yüksek dozda sülfite (260 mg/kg) verilen grupta ise, hem beyin hem de retina TBARS değerlerinin S1 ve S2 gruplarına göre çok fazla yükseldiği, hatta bu değerlerin kontrol grubuna göre yaklaşık üç kat arttığı dikkati çekmiştir.

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

Gruplar	1.hafta vücut ağırlığı (g)	2. hafta vücut ağırlığı (g)	3. hafta vücut ağırlığı (g)	4. hafta vücut ağırlığı (g)	5. hafta vücut ağırlığı (g)	Günlük yem tüketimi (g/gün/100 gr )
Kontrol (K)	268.00 ± 10.33	285.00 ± 11.33	290.00 ± 8.94	295.00 ± 11.87	300.5 ± 10.83	20.50 ± 2.26
Sülfite 1 (S1)	235.00 ± 16.79	242.50 ± 17.90	245.50 ± 18.09	250.00 ± 17.32	263.00 ± 22.26	20.70 ± 1.97
Sülfite 2 (S2)	295.00 ± 17.45	308.20 ± 12.50	317.30 ± 13.11	330.00 ± 17.23	334.10 ± 17.00	22.91± 1.80
Sülfite 3 (S3)	255.00 ± 23.80	263.00 ± 25.30	272.00 ± 18.74	277.30 ± 21.72	290.00 ± 21.79	20.80 ± 2.05



**Tablo 4.2.** Kontrol ve deney grubu hayvanlarının beyin ve retina TBARS değerleri

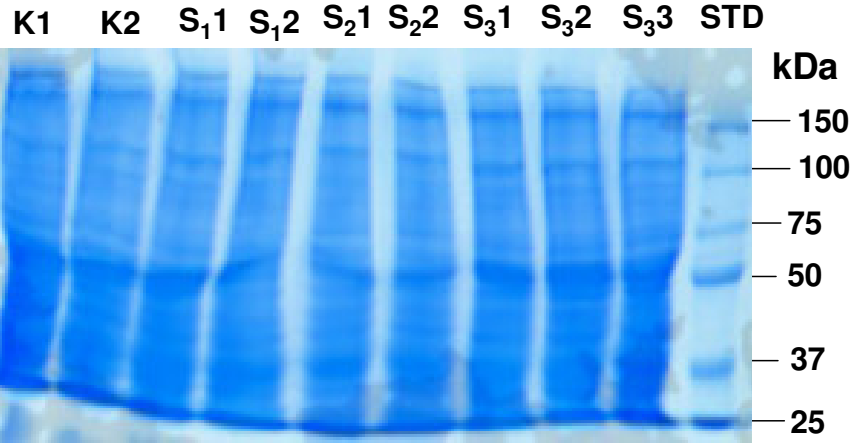
<b>GRUPLAR</b>	<b>BEYİN TBARS nmol/g protein</b>	<b>RETİNA TBARS nmol/g protein</b>
Kontrol	1.61 ± 0.38	0.66 ± 0.15
Sülfite 1 (10 mg/kg/gün)	1.95 ± 0.37	0.80 ± 0.09
Sülfite 2 (100 mg/kg/gün)	2.60 ± 0.24 K*, S1 <sup>#</sup>	1.08 ± 0.06 K*, S1 <sup>#</sup>
Sülfite 3 (260 mg/kg/gün)	4.46 ± 0.35 K*, S1 <sup>#</sup> ,S2 <sup>†</sup>	2.40 ± 0.16 K*, S1 <sup>#</sup> ,S2 <sup>†</sup>

(\*:p<0.001 Kontrol grubundan fark, #:p<0.001 Sülfite 1 grubundan fark, †:p<0.001 Sülfite 2 grubundan fark)

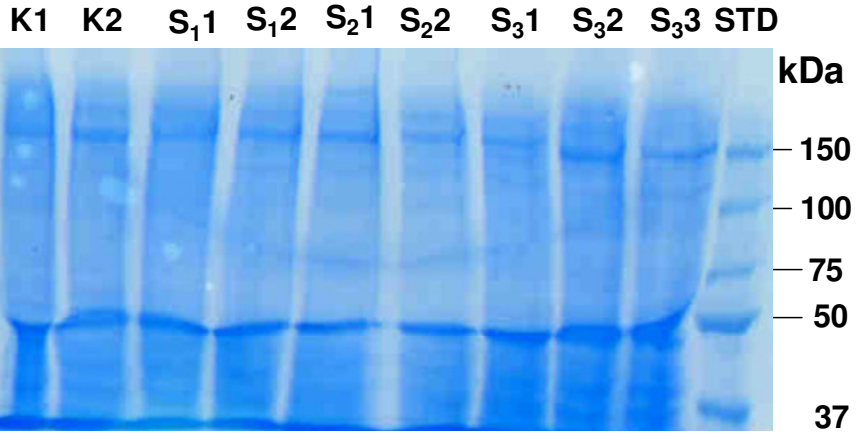
#### **4.5. 4-Hidroksi-2-nonenal Aktivitesi Sonuçları**

Kontrol ve deney gruplarının beyin ve retina dokularında yapılan protein boyaması sonuçları Şekil 4.1’de verilmiştir. Her kuyucuğa eşit miktarlarda protein içeren doku süpernatantı konulduğu şekilde gözlenen bantların aynı olması ile teyit edilmiştir.

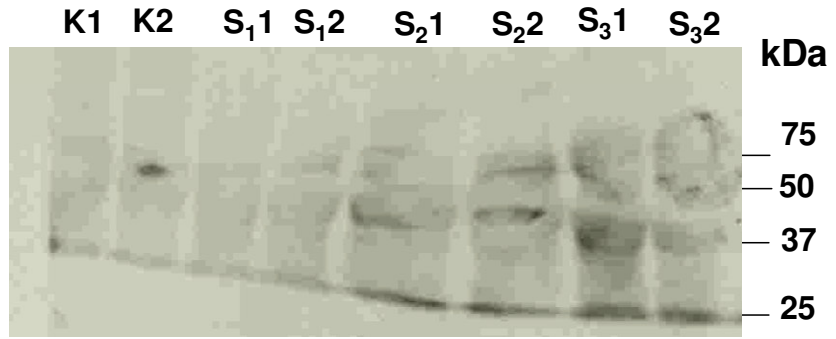
Kontrol ve deney gruplarının beyin ve retina dokularında gerçekleştirilen 4-HNE western blot ve dansitometrik analizleri Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’te verilmiştir. Doz artışına bağlı olarak 4- HNE miktarında artış olduğu tespit edilmiştir.



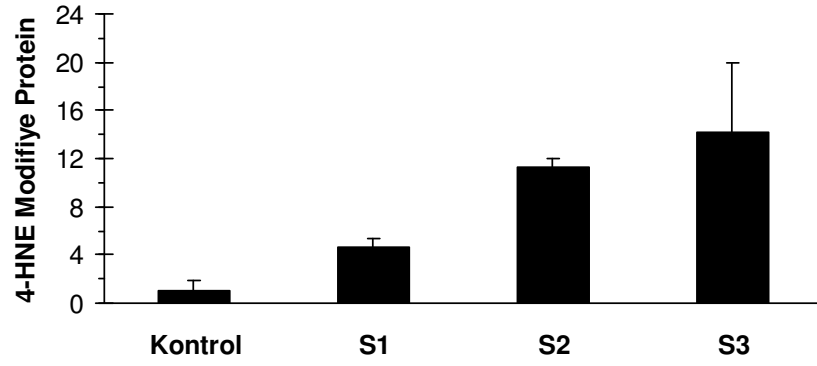
Şekil 4.1.a. Beyin Protein Boyaması



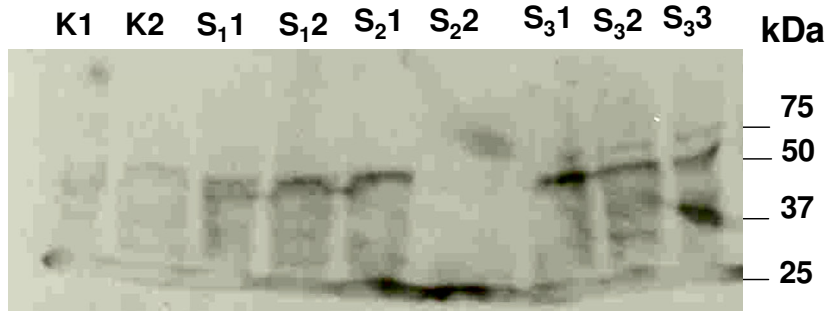
Şeki 4.1.b. Retina Protein Boyaması



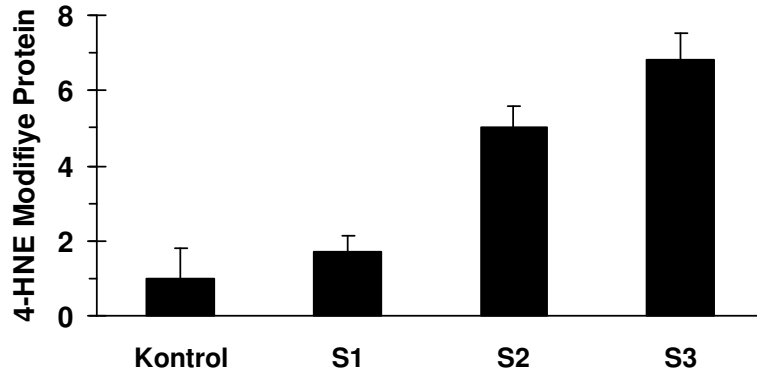
Şekil 4.2.a Beyin 4-HNE Western Blot Analizi



Şekil 4.2.b. Beyin 4-HNE Western Blot Dansitometrik Analizi



Şekil 4.3.a. Retina 4-HNE Western Blot Analizi

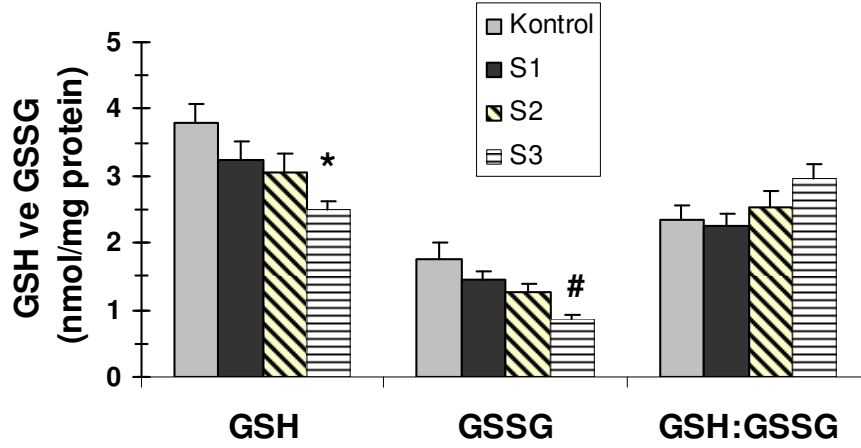


Şekil 4.3.b. Retina 4-HNE Western Blot Dansitometrik Analizi

#### 4.6. Redükte Glutatyon ve Okside Glutatyon Aktivitesi Sonuçları

##### 4.6.1. Beyin Redükte Glutatyon ve Okside Glutatyon Aktivitesi Sonuçları

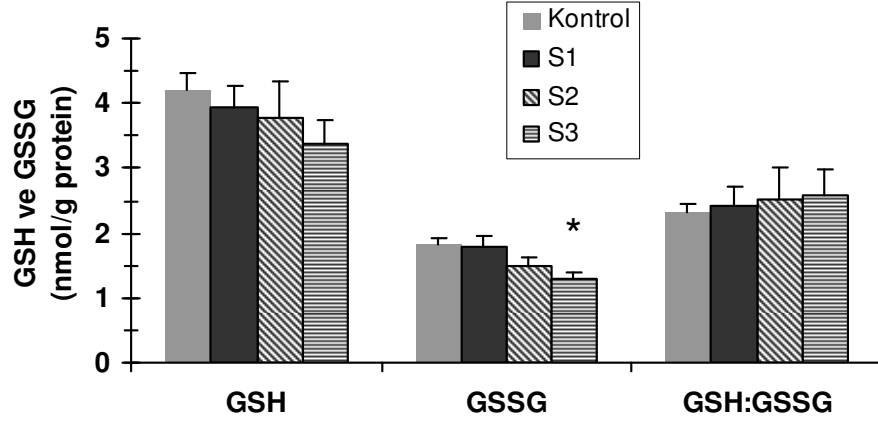
Beyin dokusu, GSH, GSSG ve GSH/GSSG oranları Şekil 4.4'te verilmiştir. Deney grupları kontrol ile karşılaştırıldığında GSH/GSSH oranlarında anlamlı bir değişiklik olmadığı, bununla birlikte GSH ve GSSG oranlarının doza bağlı olarak azaldığı gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Beyin GSH: GSSG VE GSH/GSSG değerleri \*:  $p < 0.05$  K grubundan fark, # :  $p < 0.05$  K grubundan fark

##### 4.6.2. Retina Redükte Glutatyon ve Okside Glutatyon Aktivite Sonuçları

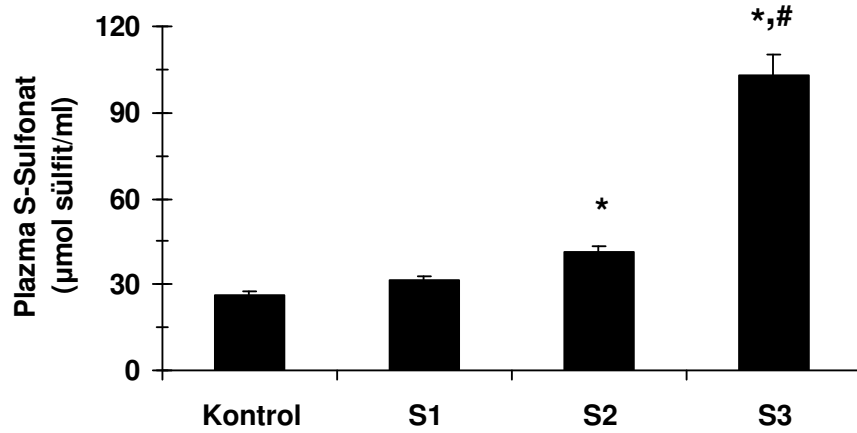
Retina dokusu GSH, GSSG ve GSH/GSSG oranları Şekil 4.5'te verilmiştir. GSH ve GSSG oranlarının doza bağlı olarak azalma eğiliminde olduğu, ancak bu azalışın istatistiksel olarak önemli bir düzeye ulaşamadığı saptanmıştır.



Şekil 4.5. Retina GSH, GSSG ve GSH/GSSG değerleri \*:  $p < 0.05$  K grubundan fark

#### 4.7. Plazma-S-Sülfonat Aktivite Sonuçları

Kontrol ve deney gruplarının Plazma-S-Sülfonat düzeyleri Şekil 4.6'da sunulmuştur. Plazma-S-Sülfonat düzeylerinin doz artışına bağlı olarak arttığı izlenmiştir. Kontrole göre S1 grubundaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, ancak K ve S1 gruplarına göre S2 ve S3 gruplarındaki artışın önemli olduğu saptanmıştır. Ayrıca S3 grubundaki artışın S2 grubunda gözlenenenden artıştan çok daha fazla olduğu dikkati çekmiştir.



Şekil 4.6. Plazma-S-Sülfonat Düzeyleri \*:  $p < 0.05$  K grubundan fark, #:  $p < 0.05$  K, S1 ve S2 gruplarından fark

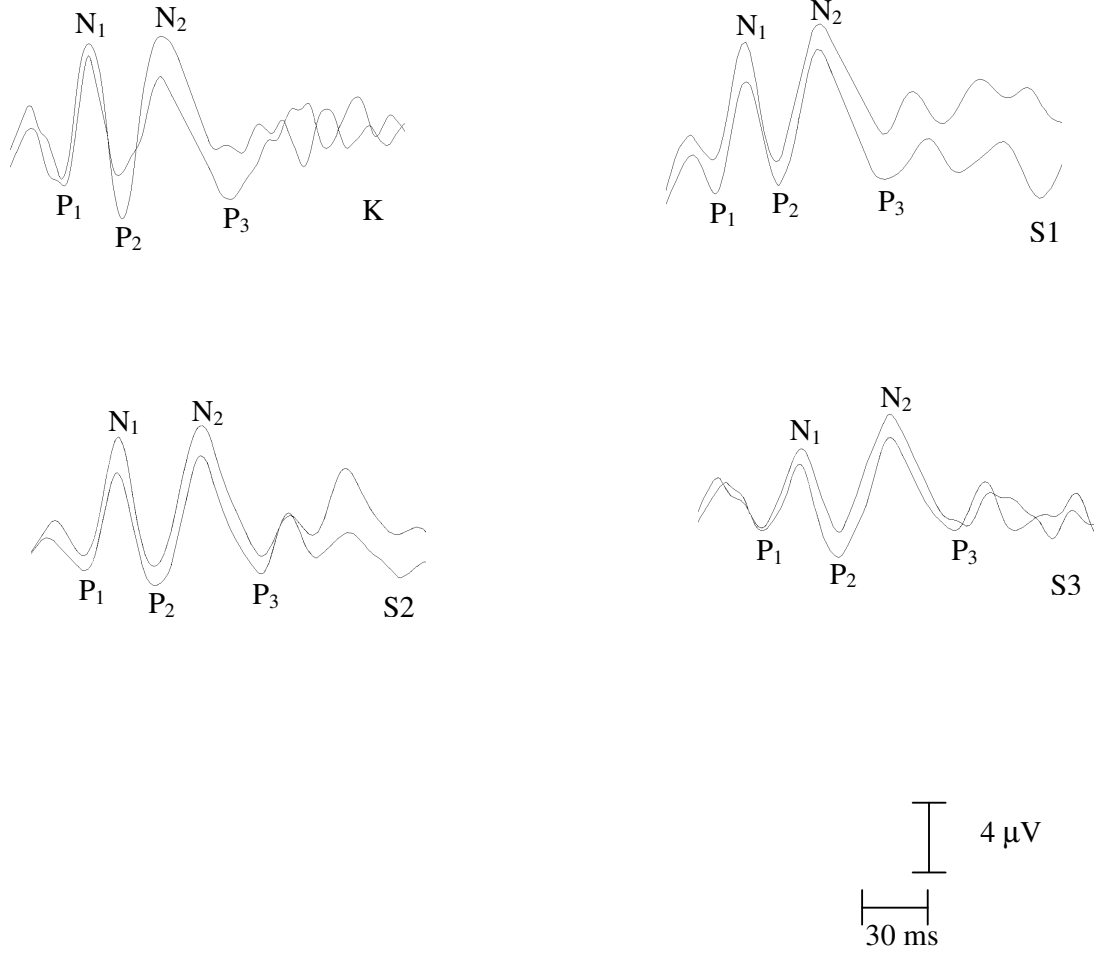
#### 4.8. VEP Sonuçları

VEP'ler sağ ve sol gözler flaş uyararı ile ayrı ayrı uyarılarak monooküler olarak kaydedilmiştir. Dört grup için elde edilen VEP'lere birer örnek Şekil 4.7'de 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 4.3 ve Tablo 4.4'de görülmektedir. S1 grubunun P1, N1, P2, N2 ve P3 latensleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında latenslerin değişmediği görülmüştür. Ancak S2 grubunda tüm bileşenlerin latenslerinin kontrol ve S1 gruplarına göre uzadığı saptanmıştır. S3 grubunda ise tüm bileşenlerin latenslerinin kontrol, S1 ve S2 gruplarına göre uzadığı bulunmuştur. Bu bulgu sülfitin latenslere etkisinin doz bağımlı olabileceği izlenimini vermiştir.

Tepeden tepeye genlik değerleri incelendiğinde, gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir (Tablo 4.4).



Şekil 4.7. Kontrol ve deney grubu hayvanlarından kaydedilen VEP'ler ve bileşenleri



**Tablo 4.3.** Kontrol ve Deneysel grubu hayvanlarından kaydedilen VEP latensleri (ms) \* : p<0.001 K grubundan fark, #: p<0.001 S1 grubundan fark, †: p<0.001 S2 grubundan fark.

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)	21.40 ± 0.45	35.97 ± 0.81	49.96 ± 1.93	69.28 ± 2.80	98.03 ± 2.27
Sülfit 1 (S1)	21.58 ± 0.43	36.61 ± 0.76	49.41 ± 2.37	69.78 ± 2.80	99.21 ± 1.54
Sülfit 2 (S2)	24.23 ± 0.84 K*, S1 <sup>#</sup>	39.06 ± 1.14 K*, S1 <sup>#</sup>	55.35 ± 1.88 K*, S1 <sup>#</sup>	77.98 ± 1.18 K*, S1 <sup>#</sup>	105.72 ± 1.42 K*, S1 <sup>#</sup>
Sülfit 3 (S3)	28.16 ± 0.71 K*, S1 <sup>#</sup> , S2 <sup>†</sup>	46.97 ± 1.32 K*, S1 <sup>#</sup> , S2 <sup>†</sup>	64.64 ± 1.55 K*, S1 <sup>#</sup> , S2 <sup>†</sup>	88.04 ± 1.10 K*, S1 <sup>#</sup> , S2 <sup>†</sup>	117.18 ± 1.47 K*, S1 <sup>#</sup> , S2 <sup>†</sup>

**Tablo 4.4.** Kontrol ve deney grubu hayvanlarından kaydedilen genlikler ( $\mu\text{V}$ )

Gruplar	$P_1N_1$ ( $\mu\text{V}$ )	$N_1P_2$ ( $\mu\text{V}$ )	$P_2N_2$ ( $\mu\text{V}$ )	$N_2P_3$ ( $\mu\text{V}$ )
Kontrol (K)	$6.54 \pm 2.05$	$6.42 \pm 2.47$	$5.96 \pm 1.73$	$6.93 \pm 1.57$
Sülfit 1 (S1)	$5.86 \pm 1.08$	$5.63 \pm 1.28$	$6.48 \pm 1.83$	$6.91 \pm 1.56$
Sülfit 2 (S2)	$6.39 \pm 1.74$	$6.84 \pm 1.73$	$7.20 \pm 1.48$	$7.58 \pm 1.32$
Sülfit 3 (S3)	$6.11 \pm 1.62$	$6.75 \pm 1.89$	$6.49 \pm 1.34$	$6.30 \pm 2.33$

#### 4.9. VEP Latensleri ile Beyin ve Retina TBARS Seviyeleri Arasındaki Bağlıntılar

VEP latensleri ile beyin ve retina TBARS seviyeleri arasındaki bağlantılar Tablo 4.5’de gösterilmiştir. Beyin ve retina TBARS değerleri ile P1, N1, P2, N2 ve P3 latansları arasında pozitif bir bağlantının olduğu görülmüştür.

**Tablo 4.5.** VEP latensleri ile beyin ve retina TBARS’ları arasındaki regresyon denklemleri (\*: p< 0.001)

<u>(x,y) eksenini</u>	<u>bağintı katsayısı</u>	<u>reg. Denklemi</u>
Beyin TBARS, P1 latensi	0.870*	y= 17.82 + 2.27x
Beyin TBARS, N1 latensi	0.839*	y= 30.16 + 3.57x
Beyin TBARS, P2 latensi	0.827*	y= 41.41 + 5.05x
Beyin TBARS, N2 latensi	0.821*	y= 59.77 + 6.21x
Beyin TBARS, P3 latensi	0.862*	y= 88.38 + 6.27x
Retina TBARS, P1 latensi	0.878*	y= 19.21 + 3.76x
Retina TBARS, N1 latensi	0.921*	y= 32.05 + 6.17x
Retina TBARS, P2 latensi	0.866*	y= 44.34 + 8.52x
Retina TBARS, N2 latensi	0.838*	y= 63.52 + 10.34x
Retina TBARS, P3 latensi	0.901*	y= 92.01 + 10.56x

#### 4.10.VEP Latensleri İle Plazma–S–Sülfonat Düzeyleri Arasındaki Regresyon Denklemleri

VEP latensleri ile Plazma–S–Sülfonat Düzeyleri arasındaki bağlantılar Tablo 4.6’da gösterilmiştir. Plazma–S–Sülfonat Düzeyleri ile P1, N1, P2, N2 ve P3 latansları arasında pozitif bir bağlantının olduğu görülmüştür.

**Tablo 4.6.** VEP latensleri ile Plazma–S–Sülfonat Düzeyleri arasındaki regresyon denklemleri (\*: p< 0.01)

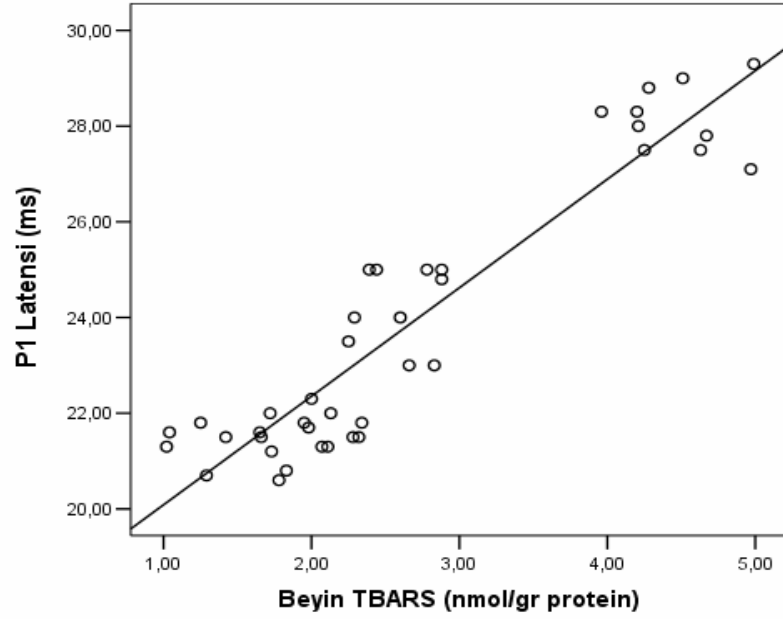
<u>(x,y) eksenini</u>	<u>bağintı katsayısı</u>	<u>reg. Denklemi</u>
Plazma-S-sülfonat, P1 latensi	0.875*	y= 19.585+ 0.09x
Plazma-S-sülfonat, N1 latensi	0.927*	y= 32.625 + 0.14x
Plazma-S-sülfonat, P2 latensi	0.861*	y= 45.2 + 0.192x
Plazma-S-sülfonat, N2 latensi	0.832*	y= 64.572+ 0.23x
Plazma-S-sülfonat, P3 latensi	0.903*	y= 93.026 + 0.24x

#### 4.11. Beyin ve Retina TBARS’ları İle Plazma–S–Sülfonat Değerleri Arasındaki Regresyon Denklemleri

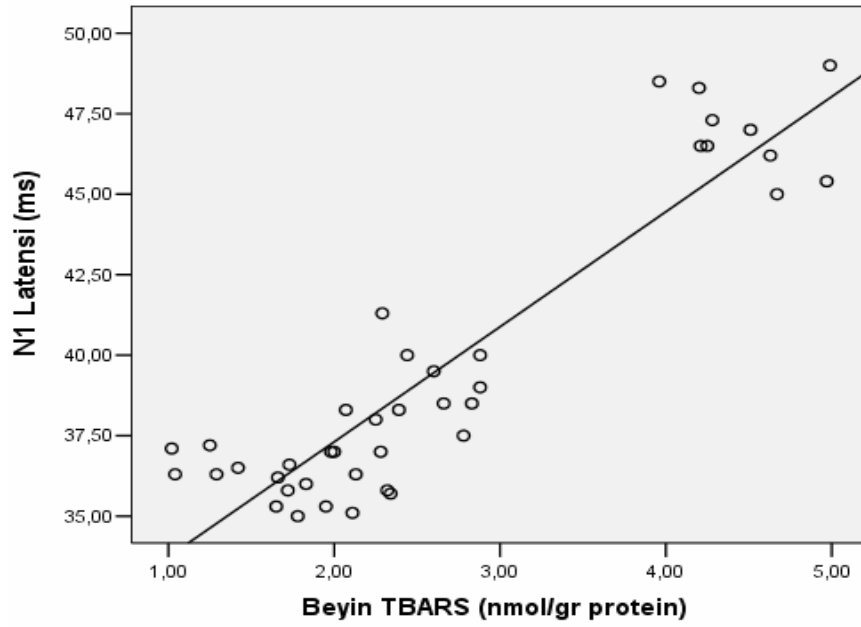
Beyin ve retina TBARS’ları ile Plazma–S–Sülfonat Düzeyleri arasındaki bağlantılar Tablo 4.7’de gösterilmiştir. Plazma–S–Sülfonat Düzeyleri ile beyin ve retina TBARS değerleri arasında pozitif bir bağlantı olduğu gösterilmiştir.

**Tablo 4.7.** Beyin ve Retina TBARS değerleri ile Plazma–S–Sülfonat Düzeyleri arasındaki regresyon denklemleri (\*: p< 0.01)

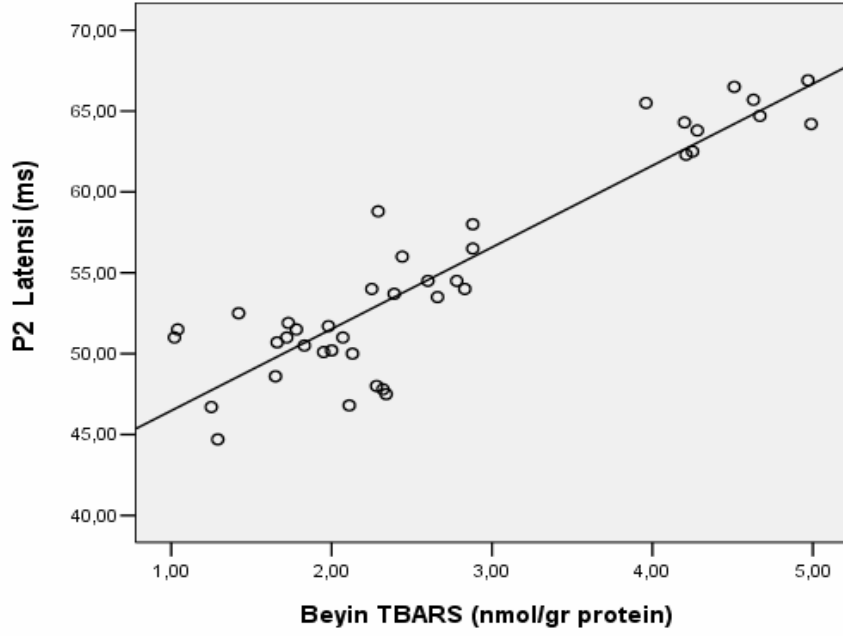
<u>(x,y) eksenini</u>	<u>bağintı katsayısı</u>	<u>reg. Denklemi</u>
Plazma-S-sülfonat, Beyin TBARS	0.875*	y= 19.585+ 0.09x
Plazma-S-sülfonat, Retina TBARS	0.927*	y= 32.625 + 0.14x



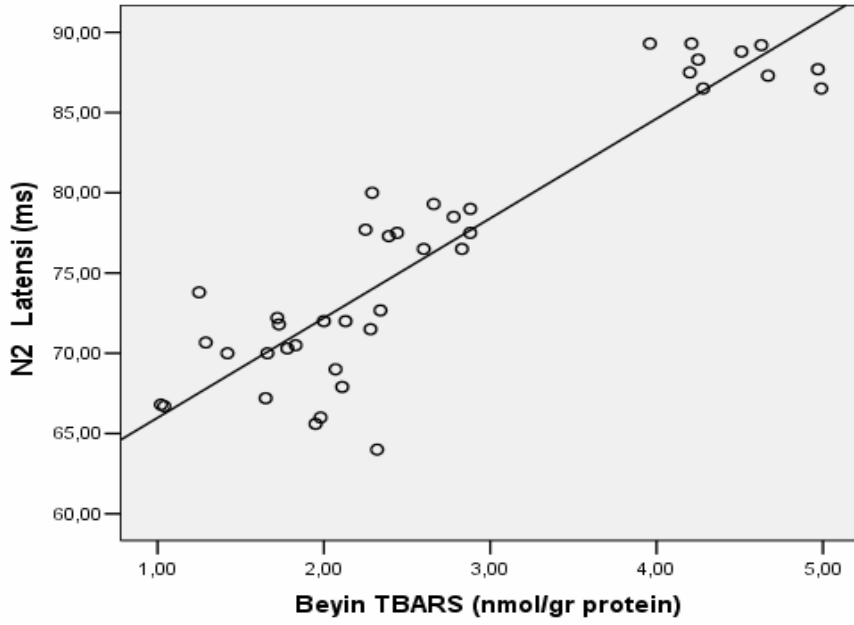
**Şekil 4.8.** Beyin TBARS miktarı ile P1 latensinin regresyon grafiği ( $r=0.870$ ,  $p<0.001$ ,  $y=17.82 + 2.27x$ ).



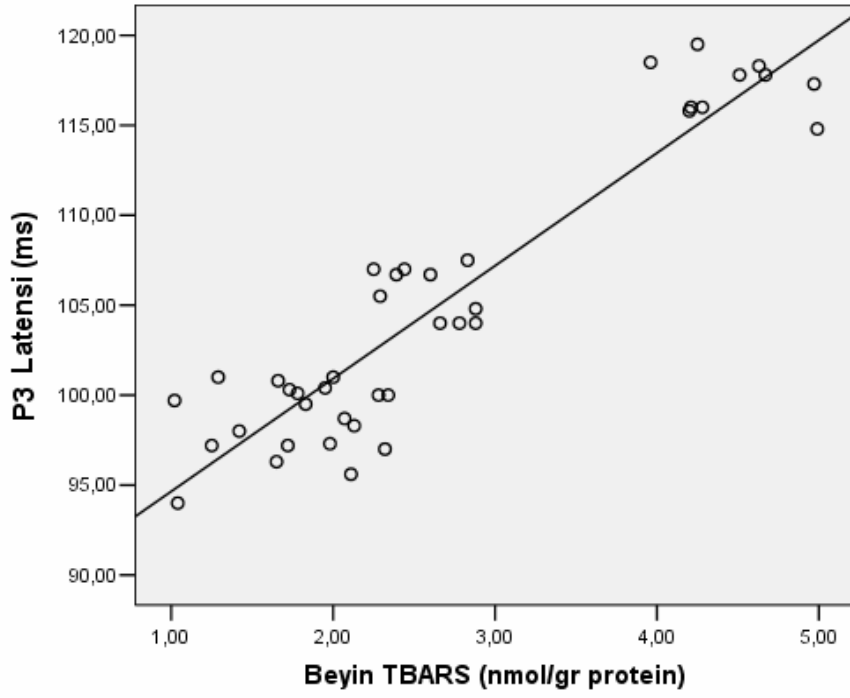
**Şekil 4.9.** Beyin TBARS miktarı ile N1 latensinin regresyon grafiği ( $r=0.839$ ,  $p<0.001$ ,  $y= 30.16 + 3.57x$ ).



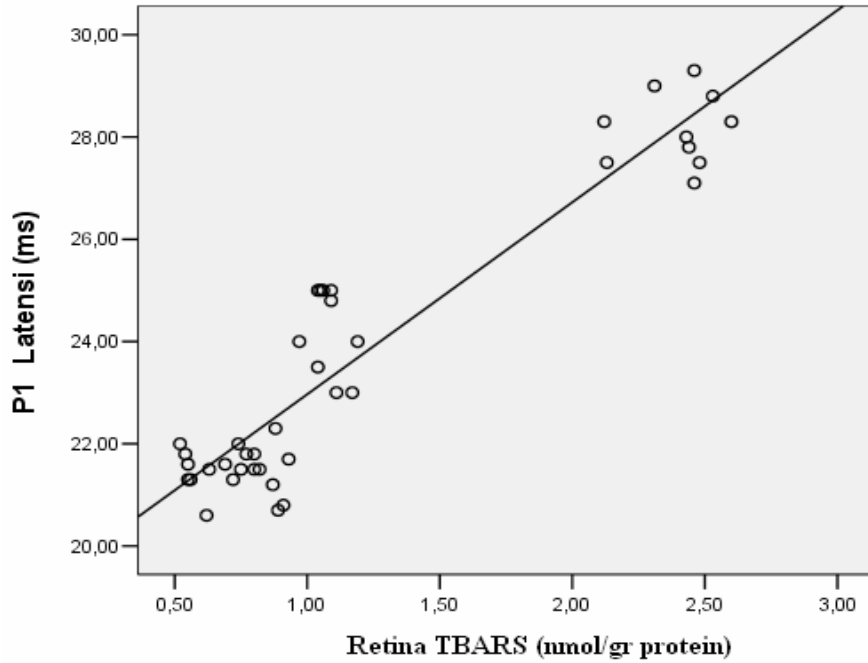
**Şekil 4.10.** Beyin TBARS miktarı ile P2 latensinin regresyon grafiği ( $r=0.827$ ,  $p<0.001$ ,  $y=41.41 + 5.05x$ ).



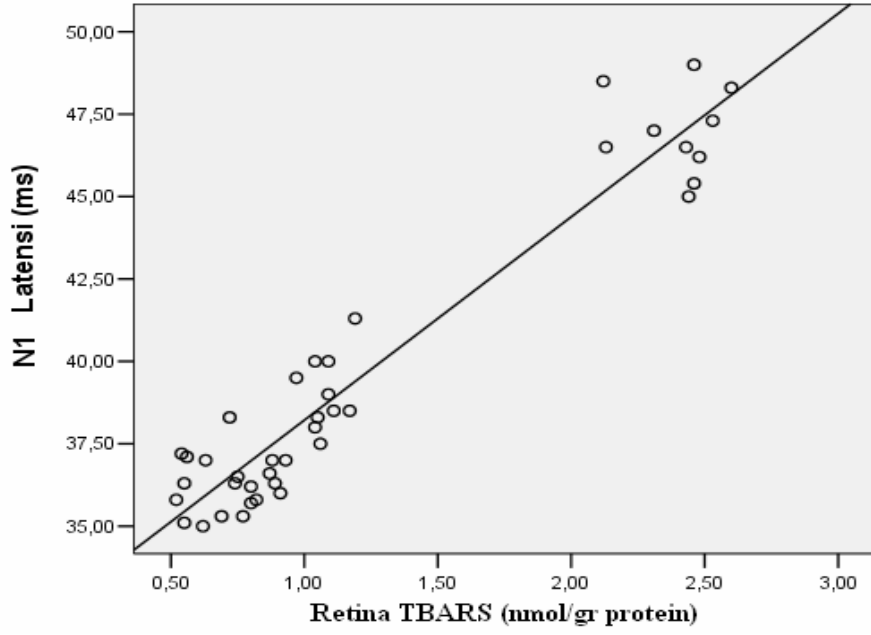
**Şekil 4.11.** Beyin TBARS miktarı ile N2 latensinin regresyon grafiği ( $r=0.821$ ,  $p<0.001$ ,  $y= 59.77 + 6.21x$ ).



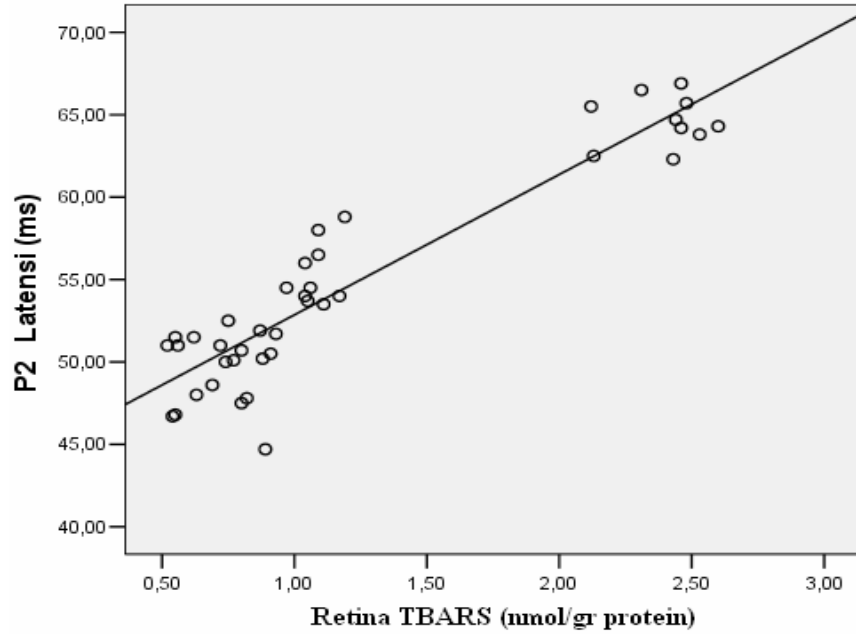
**Şekil 4.12.** Beyin TBARS miktarı ile P3 latensinin regresyon grafiği ( $r=0.862$ ,  $p<0.001$ ,  $y= 88.38 + 6.27x$ ).



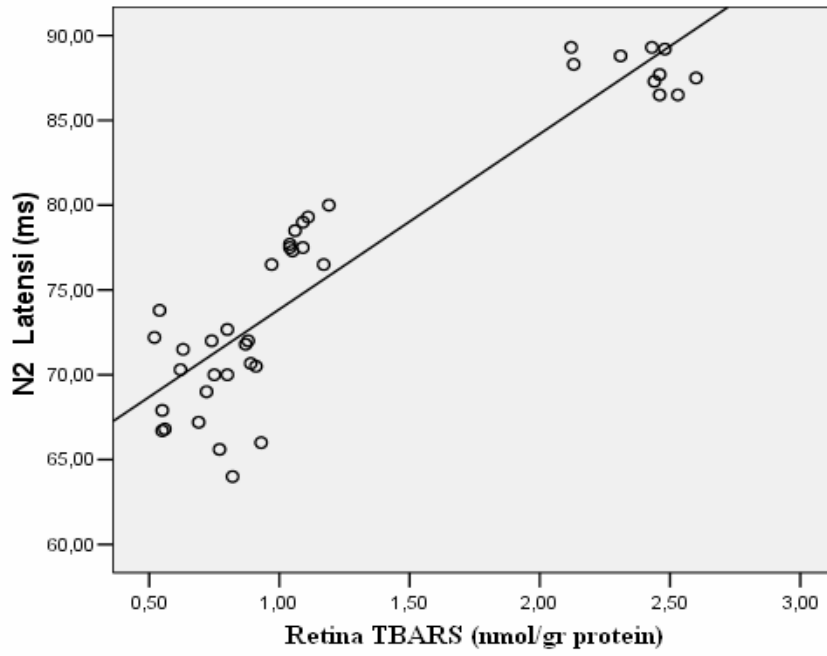
**Şekil 4.13.** Retina TBARS miktarı ile P1 latensinin regresyon grafiği ( $r=0.878$ ,  $p<0.001$ ,  $y= 19.21 + 3.76x$ ).



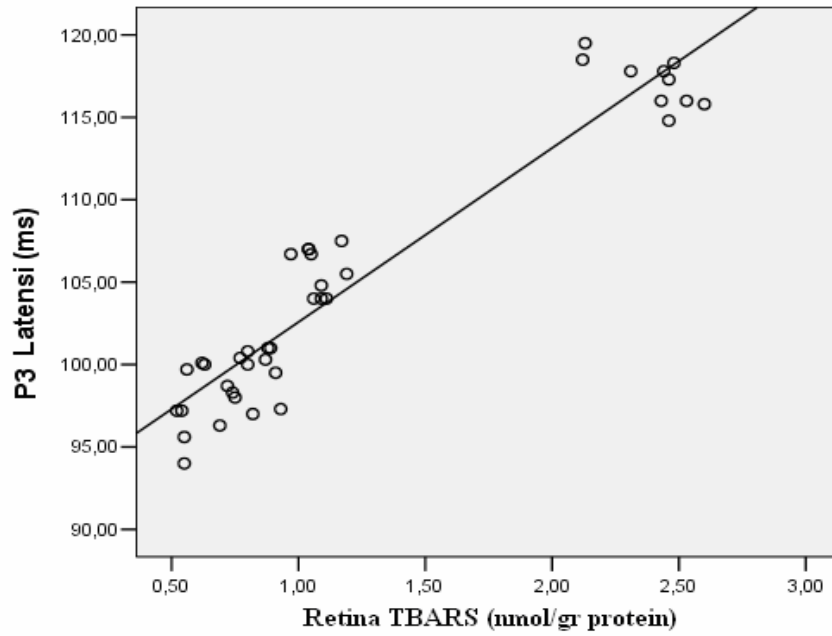
**Şekil 4.14.** Retina TBARS miktarı ile N1 latensinin regresyon grafiği ( $r=0.921$ ,  $p<0.001$ ,  $y= 32.05 + 6.17x$ ).



**Şekil 4.15.** Retina TBARS miktarı ile P2 latensinin regresyon grafiği ( $r=0.866$ ,  $p<0.001$ ,  $y= 44.34 + 8.52x$ ).

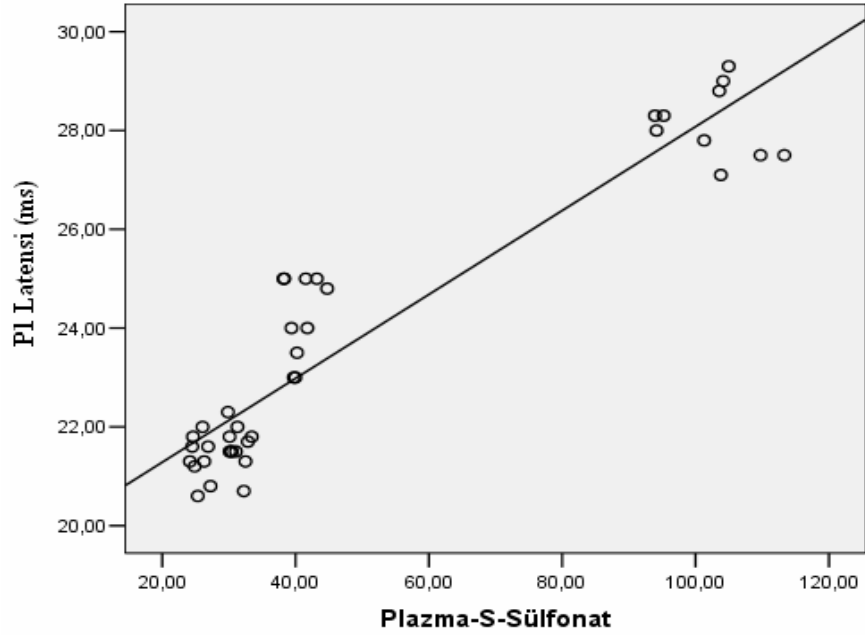


**Şekil 4.16.** Retina TBARS miktarı ile N2 latensinin regresyon grafiği ( $r=0.866$ ,  $p<0.001$ ,  $y= 63.52 + 10.34x$ ).

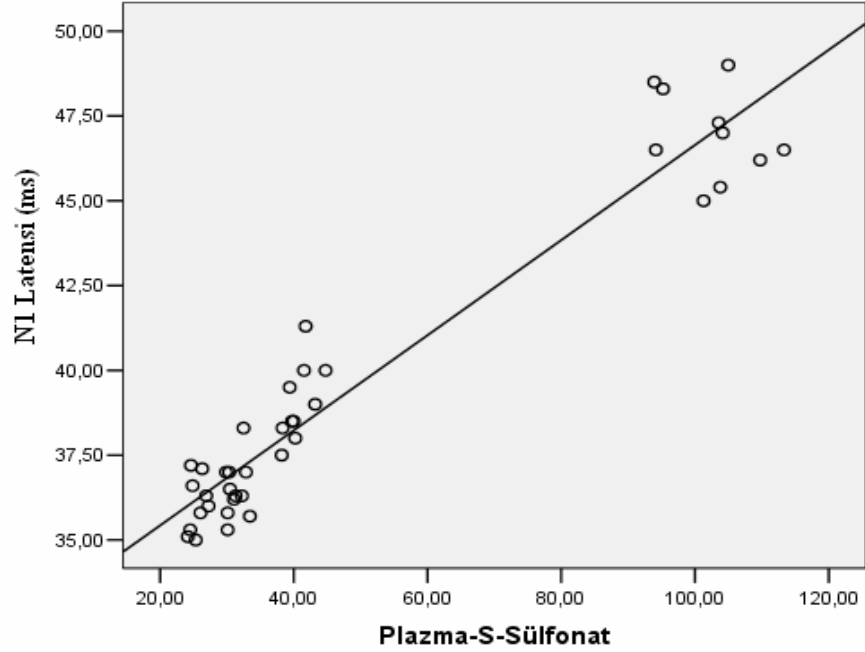


**Şekil 4.17.** Retina TBARS miktarı ile P3 latensinin regresyon grafiği ( $r=0.901$ ,  $p<0.001$ ,  $y= 92.01 + 10.56x$ ).

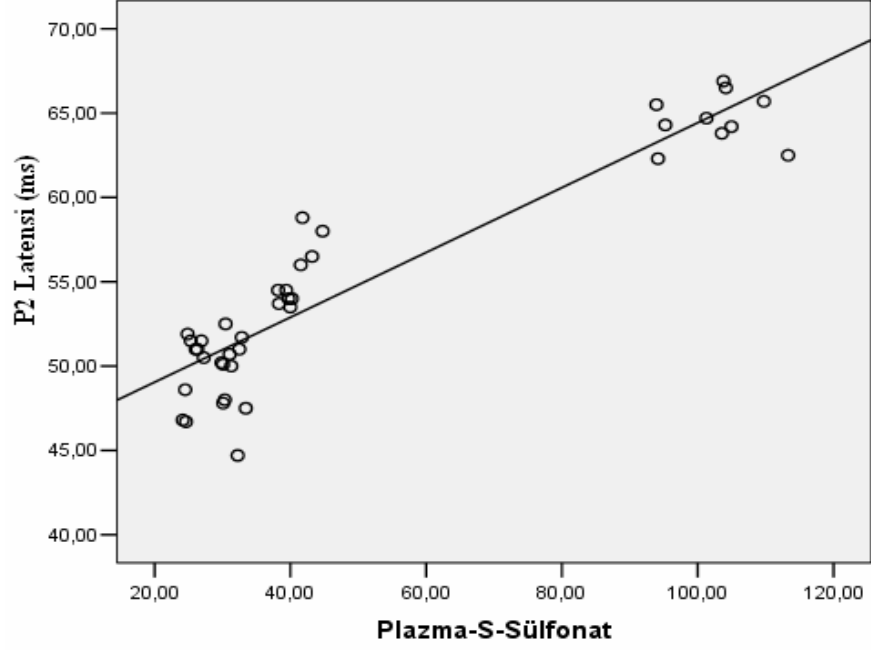




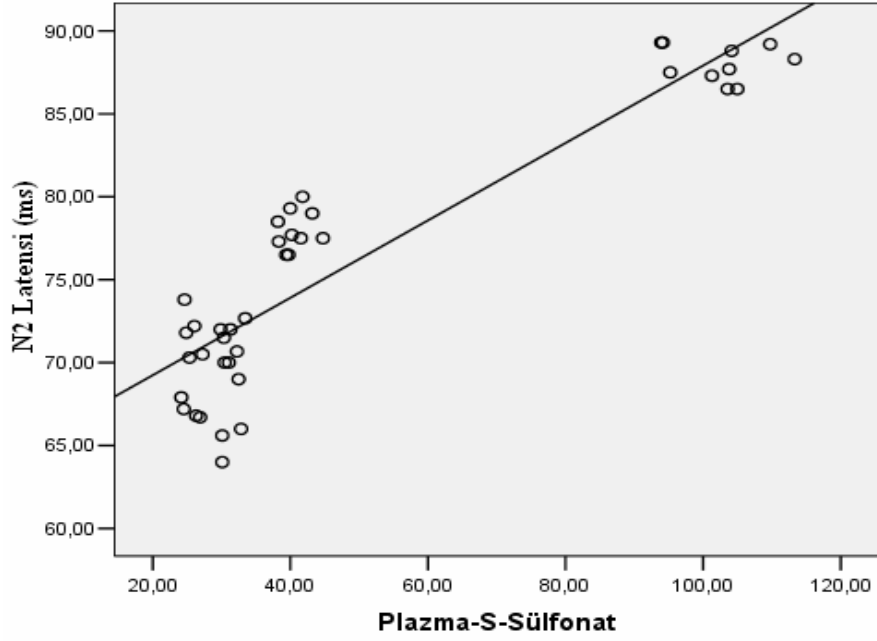
**Şekil 4.18.** Plazma-S-sülfonat düzeyleri ile P1 latensinin regresyon grafiği  
( $r=0.875^*$ ,  $y= 19.585+ 0.09x$ ).



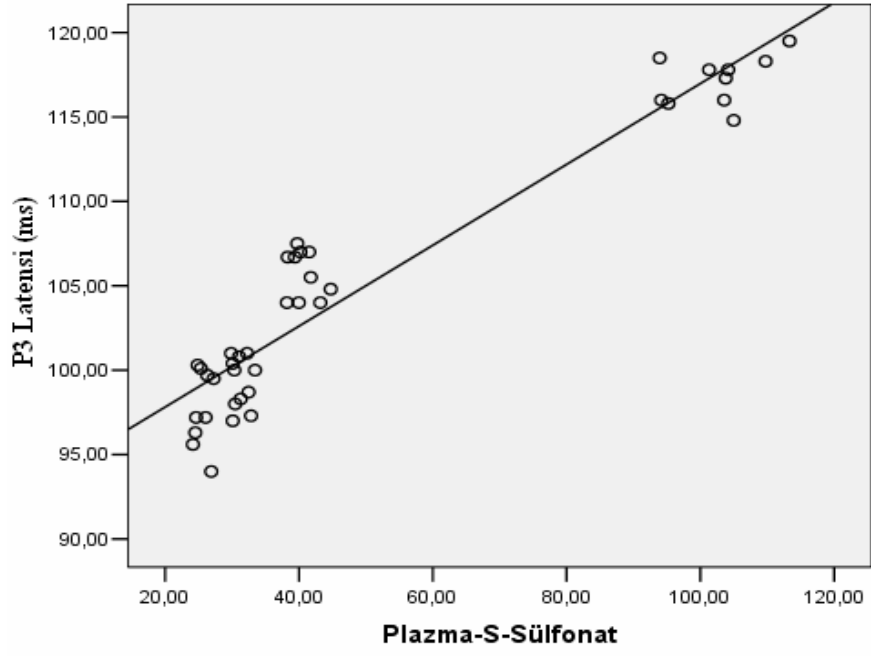
**Şekil 4.19.** Plazma-S-sülfonat düzeyleri ile N1 latensinin regresyon grafiği  
( $r=0.927^*$ ,  $y= 32.625 + 0.14x$ ).



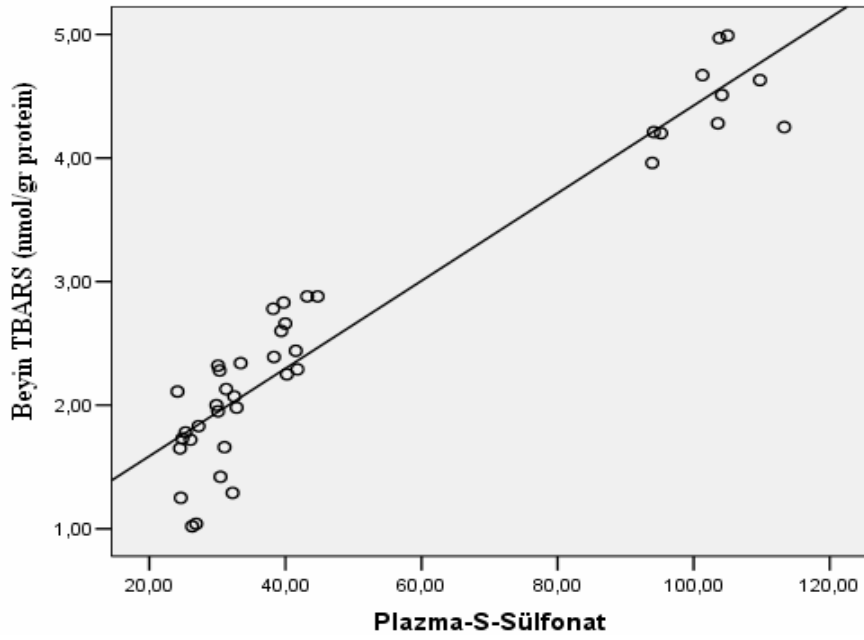
**Şekil 4.20.** Plazma-S-sülfonat düzeyleri ile P2 latensinin regresyon grafiği  
( $r=0.861^*$ ,  $y= 45.2 + 0.192x$ ).



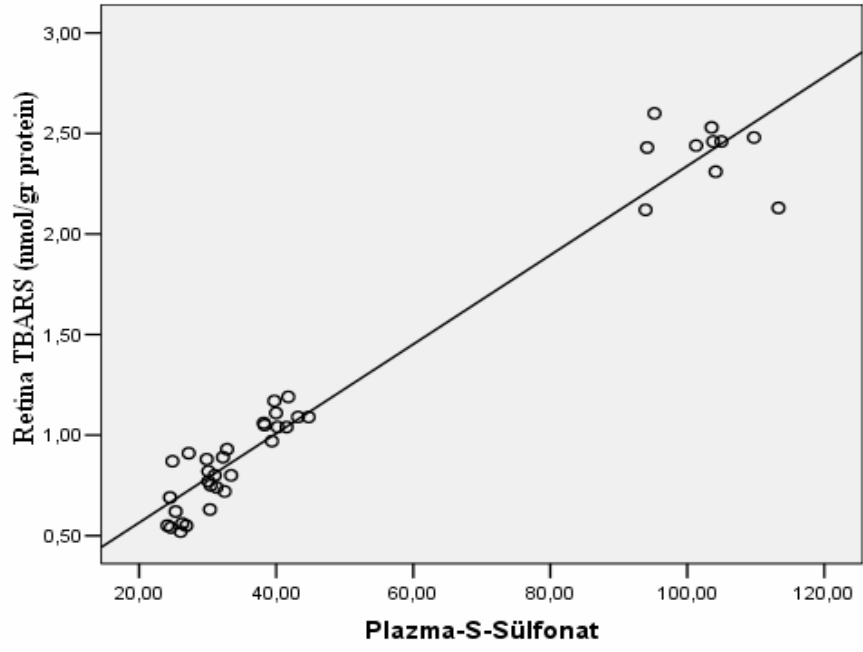
**Şekil 4.21.** Plazma-S-sülfonat düzeyleri ile N2 latensinin regresyon grafiği  
( $r=0.832^*$ ,  $y= 64.572+ 0.23x$ ).



**Şekil 4.22.** Plazma-S-sülfonat düzeyleri ile P3 latensinin regresyon grafiği ( $r=0.903^*$ ,  $y=93.026+0.24x$ ).



**Şekil 4.23.** Plazma-S-sülfonat düzeyleri ile beyin TBARS değerlerinin regresyon grafiği ( $r=0.875^*$ ,  $y=19.585+0.09x$ ).



**Şekil 4.24.** Plazma-S-sülfonat düzeyleri ile retina TBARS değerlerinin regresyon grafiği ( $r=0.927^*$ ,  $y= 32.625 + 0.14x$ ).

## TARTIŞMA

Fosil enerji kaynaklarının yakılmasına bağı olarak atmosfere katılan SO<sub>2</sub>, bilindiği gibi hava kirliliğinin önemli bir bileşenidir (152). Londra'da 1952 yılının kışında SO<sub>2</sub>'in atmosfer havasındaki 0.15 ppm'lik sınır değerini 10 kat aşarak 1.5 ppm'e yükselmesi ile kardiyopulmoner hastalığı olan kişilerde mortalite artışının gözlemlenmesi, SO<sub>2</sub>'nin zararlı etkileri olabileceğini gündeme getirmiş ve toksisitesi açısından daha detaylı araştırmalar yapmaya itmiştir (12, 33).

Özellikle kardiyovasküler ve solunum hastalıkları olan yaşlı kişilerde ölümlerin saptanmasıyla başlayan SO<sub>2</sub> ile ilgili ilk araştırmalar, (127, 153) bu gazın daha çok solunum sistemi üzerindeki etkilerine yoğunlaşmıştır. Yapılan çalışmalar SO<sub>2</sub>'nin mukoza gibi ıslak yüzeylerde sülfite ve (bi)sülfite şeklinde bulunduğunu göstermiştir. Eksojen olarak alınan veya endojen olarak üretilen SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>, mitokondriyal bir enzim olan sülfite oksidaz tarafından zararsız bir bileşik olan inorganik SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> dönüştürülür. Sülfite oksidaz enziminin yetersizliğinde veya çok fazla sülfite maruz kalındığında, sülfitin peroksidazlar tarafından katalizlenen oksidasyonunu takiben sülfür merkezli serbest radikallerin oluşması ve glutatyon ile reaksiyonu sonucu antioksidan kapasitenin azalması SO<sub>2</sub>'nin toksik etkilerinde önemli rol oynar. İnhalasyonla alınan gazın bronkokonstriksiyon, alveol kalınlaşması, alveol hiperplazisi, akciğer ödemi, akciğer kanserine yatkınlık gibi pek çok direk etkisi gösterilmiştir (29, 30, 31, 32). Oldukça reaktif bir molekül olan SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>'in solunum sistemi dışında, *in vitro* ve *in vivo* olarak başta nükleik asitler olmak üzere pek çok biyolojik molekülle reaksiyona girerek toksik etki gösterdiği pek çok çalışma ile teyit edilmiştir.

Kentsel yaşamda ısınma amacı ile kullanılan işlenmemiş kömürler, ağır yağlar ve motorlu araçların yakıtları; SO<sub>2</sub>'nin yol açtığı hava kirliliğinin temel kaynaklarını oluşturmaktadır. Günümüzde hava kirliliği bazı büyük şehirlerde doğal gazın kullanılması nedeniyle azalmış ve önemli bir sorun olmaktan çıkmıştır. Ancak, kükürt dioksit ve beş tuzunun, gıda ve ilaç endüstrisinde koruyucu amaçlarla yaygın olarak kullanılması SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>'e maruziyetin diğer önemli bir şekli olup önemini halen sürdürmektedir. Zira, pek çok besinin değişik düzeylerde SO<sub>3</sub><sup>-2</sup> içerdiği dikkate alındığında beslenme alışkanlığına göre günlük kabul edilebilir (0.7 mg/kg) SO<sub>3</sub><sup>-2</sup> alımının kolaylıkla aşılabileceği açıktır. Dolayısıyla, hazır yiyeceklerin tüketiminin hızla arttığı günümüzde SO<sub>3</sub><sup>-2</sup> içeren yiyecek ve içeceklerin insan sağlığı üzerine olumsuz etkilerinin olabileceği dikkate alınması gereken bir sonuçtur.

Besinlerle SO<sub>3</sub><sup>-2</sup> alımının zararlı etkileri ilk olarak 1973 yılında Kochen adlı araştırmacı tarafından tanımlanmakla birlikte, literatüre 1976 yılında, içerisinde metabisülfite olduğu saptanan restoran yemeğini yiyen bir şahısta bronkospazm ve allerjik reaksiyonlar (2, 4) saptanmasıyla girmiştir. Özellikle restoran yemeklerinin hazırlanmasında yüksek miktarlarda SO<sub>3</sub><sup>-2</sup> (25-200 mg) kullanılması, SO<sub>3</sub><sup>-2</sup> duyarlılığı olarak bilinen bir takım reaksiyonların oluşmasında önemli bir etkendir

(4). Daha sonraki araştırmalarda 5, 25 ve 50 mg metabisülfite verilen kronik astımlı çocukların %66'sında, 2-444 mg potasyum metabisülfite verilen 1073 astımlı hastanın 134'ünde de  $SO_3^{-2}$ 'ye duyarlılık tespit edilmiştir (2). Bu duyarlılığın başta bronkokonstrüksiyon olmak üzere ürtiker, laringeal ödem ve/veya anjiyoödem olarak ortaya çıktığı ve bu şikâyetleri takiben oluşan anafilaktik şokun da ölümlere yol açtığı rapor edilmiştir. Şimdiye dek bu konuda yapılan çalışmalar, daha çok allerjik ve astımlı bireylerde olmak üzere normal bireylerde de oldukça yoğun olarak  $SO_3^{-2}$  hipersensitivitesi oluştuğunu ortaya koymuştur (1-4, 154-158). Dolayısıyla, normal bireylerde de gözlenmekle birlikte, diyetle alınan  $SO_3^{-2}$ 'lere duyarlılık astımlıların %5'inde görüldüğü için astımlı kişilerin  $SO_3^{-2}$  içeren yiyecek ve içeceklerden sakınmaları FDA tarafından tavsiye edilmektedir (2,4).

Bugüne kadar yapılan deneylerde  $SO_3^{-2}$ 'nin değişik dozları kullanılmış ve farklı yanıtlar gözlenmiştir. Alarie ve ark., 18 ay boyunca 0.1 ve 5 ppm  $SO_2$  gazı soluttukları maymun ve kobaylarda minimal zararlı etkiler bulmuşlardır (159, 160). Til ve arkadaşlarının yaptıkları bir başka çalışmada ise sıçanlara 2 yıl süresince ve 3 kuşak boyunca % 0.25  $Na_2S_2O_5$  içeren yem verilmiş ve  $SO_3^{-2}$ 'nin herhangi bir zararlı etkisi saptanmamıştır.(35). Bu araştırıcı grubunun kullandıkları ve herhangi bir zararlı etki bulamadıkları % 0.25  $Na_2S_2O_5$  içeren yemin tüketilmesi, yaklaşık olarak günde 72 mg/kg  $SO_3^{-2}$  alımına karşılık gelmektedir (35). Bu bulgu doğrultusunda, Dünya Sağlık Örgütü Besin Katkı Maddeleri Komitesi buna 100 katlık bir güvenlik faktörü ekleyerek (bu rakamı 0.01 ile çarparak) günlük kabul edilebilir  $SO_3^{-2}$  alımını (The Acceptable Daily Intake=ADI) 0.7 mg/kg olarak belirlemiştir (161). Dolayısıyla, günümüzde Dünya Sağlık Örgütünün maksimum 0.7 mg/kg olarak kabul ettiği günlük  $SO_3^{-2}$  alımı düzeyi, Til ve arkadaşlarının sıçanlarda yaptığı çalışmadan (26) elde ettikleri sonuçlara dayanmaktadır. Diğer yandan, sıçanlarda yapılan deneylerin sonuçlarına dayanarak Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) tarafından 30-100 mg  $SO_2$ 'nin insanlarda yan etkiler yaratmadığı şeklinde bir değerlendirme de yapılmıştır.

Sülfite miktarının özellikle karides, patates cipsi, kurutulmuş meyva gibi besinlerde 50-100 ppm, şarap gibi içeceklerde ise 350 ppm düzeyinde olduğu bildirilmektedir. Ayrıca,  $SO_3^{-2}$ 'nin bir çok ilaç grubunda da bulunduğu ve içeriğinin 0.01 mg/ml ile 3.2 mg/ml aralığında değiştiği tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak,  $SO_3^{-2}$ 'nin yemeklerin ve salataların taze kalması içinde kullanılması bir restoran öğününde 200 mg  $SO_3^{-2}$  olabilmesine neden olmaktadır (161). Diğer yandan, Sağlık Örgütü raporu incelendiğinde, Amerikan popülasyonunun % 99'unun 163 mg SDE (sulfur dioxide equivalents) maruz kaldığı görülmektedir. Bu verilerle birlikte pek çok besinin değişik düzeylerde  $SO_3^{-2}$  içerdiği dikkate alındığında, beslenme alışkanlığına göre örneğin sosis, sucuk, kurutulmuş meyve, bira ve şarap gibi gıdaları tüketenlerde dünya sağlık örgütü besin katkı maddeleri komitesinin (FAO/WHO) belirlediği (Joint FAO/WHO Expert Committee) günlük kabul edilebilir  $SO_3^{-2}$  (0.7 mg  $SO_2$ /kg) alımının kolaylıkla aşılabileceği açıktır (1, 4). Yiyecek ve içeceklerle birlikte hava kirliliği ve  $SO_3^{-2}$  içeren çeşitli ilaçlar da düşünüldüğünde, maruz kalınan  $SO_3^{-2}$  miktarının 163 mg/gün düzeyinin de üzerine çıkabileceği tahmin edilmektedir. Nitekim, günlük  $SO_3^{-2}$  tüketiminin hesap edildiği az sayıdaki çalışmada bu sınırın hayli üstüne çıkıldığı görülmüştür (1, 9).

Bu bilgiler doğrultusunda ve günlük  $\text{SO}_3^{-2}$  tüketiminin oldukça yüksek seviyelere ulaşabileceği düşünülerek, çalışmamızda metabisülfidin 10, 100 ve 260 mg/kg dozları kullanılmıştır. Projemizde yer alan metabisülfidin dozları, daha önceki araştırmalarla uygunluk içersindedir (27, 149)

Sülfit ve/veya  $\text{SO}_2$ 'ye maruz kalınma ile plazma S-sülfonat arasındaki yakın ilişki bir çok çalışmada bildirilmiştir (2, 20, 41, 162-164). Bilindiği gibi bu molekül plazma proteinleri ile  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin arasında gerçekleşen ve sülfitolizis olarak adlandırılan bir reaksiyonla oluşmaktadır. Kaynağı ne olursa olsun dışardan organizmaya alınan  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin plazma S-sülfonat düzeyini arttırdığı ve bu düzeyin  $\text{SO}_3^{-2}$ 'ye maruz kalmanın bir göstergesi olarak kullanılabilceği bildirilmiştir (41). Gunnison ve ark. yapmış oldukları çalışmada, hayvanlara enjeksiyon yoluyla 0.9 mmol/kg, oral yolla 26µmol/ml ve inhalasyonla 10 ppm  $\text{SO}_2$  dozları uygulanmış ve oral yolla alınan  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin inhalasyona göre S-sülfonat düzeyinde daha hızlı artışa sebep olduğu tespit edilmiştir. Bu araştırmada, Gunnison ve ark.'nın (41) yöntemi kullanılarak ölçülen plazma S-sülfonat düzeylerinin bu çalışmada belirtilen sonuçlarla uyum içersinde olduğu görülmüştür. Diğer yandan, motor nöron hastalığı, Parkinson ve Alzheimer gibi çeşitli nörolojik hastalıklarda sistein aminoasidinin plazma düzeyinin artması ve bu aminoasitin vücutta üretilen  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin ana kaynağı olması bu hastalarda  $\text{SO}_3^{-2}$  metabolizmasının bozulduğunu göstermektedir. Yine aynı hastalarda ksenobiyotiklerin  $\text{SO}_3^{-2}$  ile konjugasyonunda bir bozukluk ve artmış sistein/  $\text{SO}_3^{-2}$  oranı saptanmıştır (18). Bunun anlamı, organizmanın hem  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin hem de  $\text{SO}_3^{-2}$ 'la detoksifiye edilecek olan çeşitli ksenobiyotiklerin zararlı etkisine karşı savunmasız kalmasıdır. Diğer yandan, bir başka çalışmada  $\text{SO}_3^{-2}$  metabolizmasındaki bozukluğun bir sonucu olarak idrar ve kanda sistein-s-sülfat düzeyinin arttığı gösterilmiştir (164). Sonuç olarak daha önceki bilgilere dayanarak,  $\text{SO}_3^{-2}$ 'ye maruziyetin bir göstergesi kabul edilen plazma S-sülfonat düzeylerinin ölçülmesi bu hastalıkların değerlendirilmesinde kullanılabilcek önemli bir parametre olabilir. Bu konuya açıklık getirecek daha ileri çalışmalara gereksinim söz konusudur.

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin allerjik yan etkilerine ilaveten özellikle yüksek dozlarda, pek çok hücresele yapı ile etkileşebildiği gösterilmiş ve toksik özellikleri daha iyi tanımlanmaya başlanmıştır. Sülfür dioksidin solunum sisteminde bahsedilen hasarlarına ek olarak, kan ve beyin dokusunda da çeşitli etkileri rapor edilmiştir. Örneğin, in vitro çalışmalarda,  $\text{SO}_3^{-2}$ 'in DNA'daki sitozin ve RNA'daki urasil ile reaksiyona girdiği, serbest radikal mekanizmalarıyla DNA ve RNA zincirlerine zarar verdiği gösterilmiştir (33, 34, 35). Sülfidin birçok dokuda olduğu gibi nöronlar üzerinde de toksik etkileri söz konusudur (36, 37). Genetik olarak sülfid oksidaz eksikliği olan hastalarda yapılan çalışmalarda, endojen  $\text{SO}_3^{-2}$ 'e maruz kalma sonucu şiddetli nörolojik disfonksiyon, mental gerilik, beyin gelişiminin yavaşlaması (38) ve erken ölümlle karakterize olan vakalar tespit edilmiştir (39). Bu etkiler, beyin tümörlerinin görülme sıklığında artış, görsel ve somatosensorial uyarılma potansiyelerinde izlenen latens uzaması, eritrosit antioksidan savunma sistemi ve lipid peroksidasyonundaki değişiklikler olarak sıralanabilir (11,38, 165-167).

Sülfitin doza bağı olarak görsel sistemde oluşturacağı değişikliklerde lipid peroksidasyonun rolü ve antioksidanlarla ilişkisini araştırmak için planlanan bu projemizde, elektrofizyolojik parametrelerden biri olan görsel uyarılma potansiyelleri tercih edilmiştir. Görsel uyarılma potansiyelleri görsel sistemin fonksiyonel araştırılmasında ve optik yol patolojilerinin değerlendirilmesinde kullanılan duyarlı ve güvenilir bir yöntemdir. Özellikle sıçanların görsel sisteminin, insanlarınkine benzemesi nedeniyle; sıçanlardan kaydedilen VEP'lerin insan sağlığı üzerine olan olumsuz etkileri yansıtmada iyi bir model olduğu vurgulanmaktadır (43). Görsel uyarılma potansiyellerinin nörotoksik çalışmalarda kullanılması, ilk olarak karbonmonoksitin (CO) merkezi sinir sistemine etkilerinin incelenmesi amacıyla başlamıştır (39). Araki tarafından listelenen 764 nörotoksik ajanın yaklaşık % 20 kadarının görsel fonksiyonu değiştirdiği bilinmekle birlikte, sadece 36 tanesinin VEP'lerin genlik ve latenslerini etkilediği saptanmıştır (168). Bunlar içerisinde kurşun, kadmiyum, karbondisülfit, karbonmonoksit, civa, toluen gibi nörotoksik ajanlar yer almaktadır (147-151). Toluene ve n-hexzana maruz kalındığında, VEP'lerin P<sub>100</sub> latensinin uzadığı, genliğinin ise azaldığı; 50 ppm tetraklor etilene maruz kalındığında N<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> ve P<sub>100</sub> latenslerinin inhalasyon periyodu boyunca uzadığı saptanmıştır (168). Dolayısıyla bu çalışmaların bulguları nörotoksik maddelerin görsel sistemi önemli derecede etkilediğini ortaya koymuştur. Nörotoksik maddelerden biri olan SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>'nin farklı dozlarının VEP bileşenlerinde ne gibi etkileri olduğunu araştıran çalışmamızda, 10 mg/kg SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>'in herhangi bir etkisi yokken, 260 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarında uygulanan SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>'nin VEP bileşenlerinin latenslerini anlamlı derecede uzattığı saptanmıştır. Bu veriler SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>'nin görsel sistem üzerine etkisi olduğunu ve bu etkinin doza bağımlı olarak artış gösterdiğini açıkça ortaya koymaktadır. Çevre kirliliğinin hızla arttığı günümüzde insan sağlığını ciddi biçimde tehdit eden en önemli maddelerden biri olan SO<sub>2</sub>'nin görsel sistemi olumsuz yönde etkilediğini gösteren bulgularımız, laboratuvarımızda daha önce gerçekleştirilen araştırmalarla da paralellik göstermektedir. (72-75).

Bu çalışmamızda VEP latenslerindeki değişikliklerin oksidatif hasar ile ilişkisini değerlendirmek için TBARS ve 4-HNE yöntemleri kullanılarak lipid peroksidasyonun düzeyleri de belirlenmiştir. Serbest radikallerin biyolojik makromoleküllerde hasara ve hücresel fonksiyonlarında kayba neden olduğu iyi bilinmektedir. Özellikle hücre membranında bol bulunan lipidlerin oksidasyonu, membran yapısında ve nöronal fonksiyonda değişimlere neden olur. 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. Birçok araştırmada lipid peroksidasyon indeksi olarak kabul edilen MDA'yı ölçmeye dayalı yöntem kullanılmakla birlikte, biyolojik örneklerde uygulanması bazı sorunlar teşkil etmektedir. Çünkü TBA lipid peroksidasyon son ürünü olan MDA dışında diğer bileşiklerle de (aminoasitler, şekerler, lipid oksidasyon ürünleri) etkileşime girmektedir. Dolayısıyla, çok sayıda araştırmacı tarafından peroksidasyon indeksi olarak MDA yerine TBARS adının kullanılması önerilmektedir. TBARS yöntemi, ölçülen ürünlerin çoğunluğunu MDA teşkil etmesi, çok basit ve hızlı olması nedeniyle halen tercih edilen bir yöntemdir (169, 170).



Rutin klinik ve laboratuvar koşullarında TBARS'ın saptanması çoğu koşulda ilk seçenektir, ancak belirlenen TBARS seviyelerinin diğer duyarlı deneyler ile doğrulanması son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda tavsiye edilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda bir başka lipid peroksidasyon göstergesi olan 4-HNE tayini yapılmıştır. Lipid hidroperoksitlerin ayrılma reaksiyonları ile bozulmaları, alkanlar, 2-alkenler, 2,4-alkadrenaller ve 4-hidroksi alkenler gibi aldehitlerin oluşmasına yol açar. Omega 6 yağ asitlerinin oksidasyonu ile oluşan hekzanal ve 4-hidroksinonenal en başta gelen aldehitlerdir. Aldehitler özellikle de 4-hidroksinonenal sitotoksik, hepatotoksik, mutajenik ve genotoksik özellikler içerir ve oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonun ikincil toksik mesajcıları gibi davranır. Bu bileşiklerin ölçümü, hem lipid peroksidasyonun genişliğinin indeksini hem de belirli patojenik durumlara sebebiyet veren ajan olarak rollerini belirlemede destek olması nedeniyle yüksek bir kabul görmektedir (171).

Sülfitin, S1 grubunun hem retina hem de beyin dokularında lipid peroksidasyon üzerine anlamlı bir etkisi yokken, S2 grubunda lipid peroksidasyonu artırdığı, S3 grubunda ise kontrol ile kıyaslandığında lipid peroksidasyonu yaklaşık üç kat artırdığı saptanmıştır. Ayrıca, TBARS yöntemi ile elde edilen lipid peroksidasyon değerlerinin 4-HNE bulgularıyla benzer şekilde artmış olması, doz artışına bağlı olarak lipid peroksidasyonun da arttığı görüşünü teyid etmektedir. Bunun yanında, bu sonuçların VEP latenslerindeki doza bağlı uzama ile paralellik göstermesi  $SO_3^{-2}$ 'nin oksidan stresi tetikleyerek görsel sistem hasarına neden olduğunu düşündürmektedir. VEP latensleri ile TBARS arasındaki bağımlı analizleri de bu düşüncemizi destekler niteliktedir.

Sülfür dioksidin detoksifikasyonunda önemli bir molekül olduğundan dolayı çalışmamızda bir tripeptid olan GSH'nın  $SO_3^{-2}$  dozlarına bağlı değişiklikleri de incelenmiştir. Sülfür total beyin ve retina GSH seviyelerinde %40 düşüğe neden olmuştur.  $SO_2$ 'nin GSH sistemi üzerine olan bu etkisi daha önce yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir (27). Sülfür, vücut dokularında aminoasitlerin bir bölümünde (metionin, sistein ve taurin aminoasitleri) bulunur. Sistein içerisindeki sülfür atomları protein yapılarında majör kovalent çapraz bağlanmadan sorumludur. İki sistein molekülü arasındaki disülfür köprüsü protein konformasyonu için çok önemlidir. Sülfür aynı zamanda mukopolisakkaridoz ve sülfülipidlerin bir kısmında yapısal fonksiyona sahiptir. Sülfür atomları aynı zamanda demir içerikli flavoenzim olan süksinat dehidrogenaz ve NADH (nikotin amid adenin dinükleotit) için de çok önemlidir. Ayrıca, sülfür sülfhidril grubu, asetat gibi moleküllerin aktivasyonu için gerekli olan thioester bağlantılarını oluşturur. Disülfür ile sülfhidril grubu arasındaki dönüşümler, oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları ve hücreden  $H_2O_2$ 'nin hücre hasarına neden olmadan önce elimine edilmesi için kullanılır. Bu dönüşümler sülfür içerikli bileşik olan glutatyonun indirgenmesine ve yükseltgenmesine neden olur. Çalışmamızdaki GSH seviyelerindeki azalma,  $SO_3^{-2}$ 'nin neden olduğu oksidatif ajanların ortadan kaldırılması için oksitlenmesine bağlanabilir. Bu da beyin ve retinada oksidan stresin  $SO_3^{-2}$ 'ye bağlı olarak arttığını gösteren diğer bulgularımızla paralellik taşımakta ve görsel sistem hasarının lipid peroksidasyona bağlı olduğu yönündeki tezimizi desteklemektedir.

Özetle çalışmamız; endojen ve ekzojen bir toksik ajan olan  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin beyin ve retina dokularında lipid peroksidasyonunu arttırdığını, antioksidan bir molekül olan GSH'yı düşürdüğünü ve VEP latenslerini uzattığını göstermekte, böylece  $\text{SO}_3^{-2}$ 'nin oksidatif hasara bağlı görsel sistem bozukluklarına yol açabileceğini ortaya koymaktadır.

## SONUÇLAR

Çalışmamızın sonuçları şöylece özetlenebilir:

1. Sülfür dioksit maruz kalmanın bir göstergesi olarak kabul edilen plazma-S-sülfonat düzeylerinin doza bağlı olarak arttığı izlenmiştir.
2. Sülfid toksisitesinde lipid peroksidasyonun anlamlı düzeyde arttığını bildiren çalışmalar desteklenmiştir.
3. Sülfid, VEP latenslerini önemli ölçüde etkilediği saptanmıştır.
4. Sülfid oluşturduğu VEP değişikliklerinde lipid peroksidasyonun önemli rolünün olabileceğine işaret etmiştir.
5. Sülfid, VEP parametreleri üzerine olan etkisini potansiyalize ettiği gözlenmiştir.
6. Yüksek dozda sülfid beyin ve retina dokularında GSH seviyelerinde azalmaya neden olduğu saptanmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Lester MR. Sulfite Sensitivity: Significance in human health. *J Am Coll Nutr* 14:229-232, 1995.
2. Gunnison AF, Jacobsen DW. Sulfite hypersensitivity. A Critical Review. *Crit Rev Toxicol.* 17: 185-214, 1987.
3. Dalton-Bunnow MF. Review of sulfite sensitivity. *Am. J. Hosp. Pharm.* 42:2220-2226, 1985.
4. Simon RA. Sulfite sensitivity. *Ann Allergy.* 56:281-289, 1986.
5. Lavoie JC, Lanhance C, Chessex P. Antiperoxide activity of sodium metabisulfite. A double-edged sword. *Biochem Pharmacol.* 47:871-876, 1994.
6. Mottley C, Mason RP. Sulfate anion free radical formation by the peroxidation of (bi) sulfite and its reaction with hydroxyl radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.* 267:681-689, 1988.
7. Karoui H, Hogg N, Frejaville C, Tordo P, Kalyanaraman B. Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxyxynitrite. *J. Biol. Chem.* 271:6000-6009, 1996.
8. Hacıoğlu G, Açar A, Özkaya G, Yargıçoğlu P, Gümüşlü S. The effect of different hypertension models on visual evoked potentials. *Int. J. Neurosci.* 112:1321-1335, 2002.
9. Derin N, Yargıçoğlu P, Aslan M, Elmas O, Agar A, Aicigüzel Y. The effect of sulfite and chronic restraint stress on brain lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities. *Toxicol Ind Health.* 22:233-40, 2006.
10. Aydin S, Yargicoglu P, Derin N, Aliciguzel Y, Abidin I, Agar A. The effect of chronic restraint stress and sulfite on visual evoked potentials (VEPs): relation to lipid peroxidation. *Food Chem Toxicol.* 43:1093-101, 2005.
11. Kucukatay V, Agar A, Yargicoglu P, Gumuslu S, Aktekin B. Changes in somatosensory evoked potentials, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes in experimental diabetes: Effect of sulfur dioxide. *Arch Environ Health.* 58:14-22, 2003.
12. Atkinson DA, Sim TC, Grant JA. Sodium metabisulfite and SO<sub>2</sub> release: an under-recognized hazard among shrimp fisherman. *Ann Allergy.* 71:563-566, 1993.
13. Oda Y, Isohama Y, Kai H, Okano Y, Takahama K, Miyata T. Increased production and/or secretion of pulmonary surfactant in rats by long term sulfur dioxide exposure. *J Pharmacobio-dynam.* 12:726-730, 1989.
14. Kodavanti UP, Mebane R, Ledbetter A, Krantz T, McGee J, Jackson MC, Walsh L, Hilliard H, Chen BY, Richard, Costa DL. Variable pulmonary responses from exposure to concentrated ambient air particles in a rat model of bronchitis. *Toxicol Sci.* 54:441-451, 2000.
15. Gunnison AF, Farruggella TJ, Chiang G, Dulak L, Zaccardi J, Birkner JA. Sulphite-oxidase-deficient rat model: metabolic characterization. *Fd Cosmet Toxicol.* 19:209-220, 1981.

16. Gunnison AF, Sellakumar A, Currie D, Synder EA. Distribution, metabolism and toxicity of inhaled sulfur dioxide and endogenously generated sulfite in the respiratory tract of normal and sulfite oxidase-deficient rats. *J Toxicol Environ Health.* 21:141-162, 1987.
17. Parsons RB, Waring RH, Ramsden DB, Williams AC. Toxicity of cysteine and cysteine sulphinic acid to human neuronal cell-lines. *J Neurol Sci.* 152: 62-6, 1997.
18. Heafield MT, Fearn S, Steventon GB, Waring RH, Williams AC, Sturman SG. Plasma cysteine and sulphate levels in patients with motor neurone, Parkinson's and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett,* 110:216-220, 1990.
19. Brown GK, Scholem RD, Croll HB, Wraith JE, McGill JJ. Sulfite oxidase deficiency: clinical, neuroradiologic, and biochemical features in two new patients. *Neurology.* 39:252-7, 1989.
20. Johnson JL, Waud WR, Rajagopalan KV, Duran M, Beemer FA, Wadman SK. Inborn errors of molybdenum metabolism: combined deficiencies of sulfite oxidase and xanthine dehydrogenase in a patient lacking the molybdenum cofactor. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 77:3715-9, 1980.
21. Shi X, Mao Y. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine formation and DNA damage induced by sulfur trioxide anion radicals. *Biochem Biophys Res Commun.* 205:141-7, 1994.
22. Inouye B, Morita K, Ishida T, Ogata M. Cooperative effect of sulfite and vanadium compounds on lipid peroxidation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 53: 101-107, 1980.
23. Haider SS. Effects of exhaust pollutant sulfur dioxide on lipid metabolism of guinea pig organs. *Ind Health.* 23: 81-87, 1985.
24. Gokirmak M, Yildirim Z, Canan Hasanoglu H, Koksall N, Mehmet N. The role of oxidative stress in bronchoconstriction due to occupational sulfur dioxide exposure. *Clin Chim Acta.* 331:119-26, 2003.
25. Leung KH, Post GB, Menzel DB. Glutathione S-sulfonate, a sulfur dioxide metabolite, as a competitive inhibitor of glutathione S-transferase, and its reduction by glutathione reductase. *Toxicol Appl Pharmacol.* 77:388-94, 1985.
26. Khan AA, Schuler MM, Coppock RW. Inhibitory effects of various sulfur compounds on the activity of bovine erythrocyte enzymes. *J Toxicol Environ Health.* 22: 481-490, 1987.
27. Langley-Evans SC, Phillips GJ, Jackson AA. Sulphur dioxide: a potent glutathione depleting agent. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 114:89-98, 1996.
28. Kagedal B, Kallberg M, Sörbo B. A possible involvement of glutathione in the detoxication of sulfite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136:1036-1041, 1986.
29. Leung KH, Post GB, Menzel DB. Glutathione S-sulfonate, a sulfur dioxide metabolite, as a competitive inhibitor of glutathione S-transferase, and its reduction by glutathione reductase. *Toxicol Appl Pharmacol.* 77:388-94, 1985.
30. Heafield MT, Fearn S, Steventon GB, Waring RH, Williams AC, Sturman SG. Plasma cysteine and sulphate levels in patients with motor neurone, Parkinson's and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 110:216-220, 1990.

31. Marshall KA, Reist M, Jenner P, Halliwell B. The neuronal activity of sulfite plus peroxyxynitrite is enhanced by glutathione depletion: implications for Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med.* 27:515-520, 1999.
32. McFadden SA. Phenotypic variation in xenobiotic metabolism and adverse environmental response: focus on sulfur-dependent detoxification pathways. *Toxicology.* 111:43-65, 1996.
33. Samet JM, Dominici F, Curriero FC, Coursac I, Zeger SL. Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. Cities, 1987-1994. *N Engl J Med,* 343: 1742-1749, 2000.
34. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Toxicological Evaluation of Certain Food Additives with a Review of General Principle and of Specifications. 17<sup>th</sup> Report. Food and Agriculture Organization. Rome, 1974.
35. Til HP, Feron VJ, De Groot AP. The toxicity of sulphite. I. Long-term feeding and multigeneration studies in rats. *Food Cosmet Toxicol.* 10:291-310, 1972.
36. Yargicoglu P, Agar A, Gumuslu S, Bilmen S, Oguz Y. Age-related alterations in antioxidant enzymes, lipid peroxide levels, and somatosensory-evoked potentials: effect of sulfur dioxide. *Arch Environ Contam Toxicol.* 37:554-60, 1999.
37. Chiappa KH. Evoked potentials in clinical medicine. New York: Raven Press; 1983.
38. Halliday AM, McDonald WL, Mushin J. Delayed visual evoked response in optic neuritis. *Lancet.* 1:982-985, 1972.
39. Otto DA, Hudnell HK, Boyes WK, Janssen R, Dyer R. Electrophysiological measures of visual and auditory function as indices of neurotoxicity. *Toxicology.* 49:205-218, 1988
40. Wright CE, Harding GFA, Orwin A. The flash and pattern VEP as diagnostic indicator of dementia. *Doc. Ophthalmol.* 62:89-96, 1986.
41. Wright CE, Drasdo N, Harding GFA. Pathology of the optic nerve and visual association areas. Information given by the flash and pattern visual evoked potential, and the temporal and spatial contrast sensitivity function. *Brain.* 110:107-120, 1987.
42. Lehman DM, Harrison JM. Flash visual evoked potentials in the hypomyelinated mutant mouse shiverer. *Doc. Ophthalmol.* 104:83-95, 2002.
43. Hudnell HK, Boyes WK, Otto DA. 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.
44. Esterbauer H, Cheesemon K. Determination of aldehydic lipid-peroxidation products malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods. Enzymol.* 186:407-421, 1990.
45. Holley AE, Cheeseman KH. Measuring free radical reactions in vivo. *Br. Med. Bull.* 49:494-505, 1990.
46. Vander AJ, Sherman JA, Luciano DS: Part 2.9, The sensory systems. *Human Physiology,* pp: 249-257, 1994.
47. Guyton AC. *Tıbbi fizyoloji.* Çev: Çavuşoğlu H. Ünite 10. Özel duyuvar. ss:566-602, 2001

48. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Principles of neural science. Chapter 26. Visual processing by the retina. pp: 507-522, 2000.
49. Ganong WF: Section 3, Vision, pp: 287-354, Review of Medical Physiology, Ed. Ganong W, 1996.
50. Livingstone M, Hubel D. Segregation of form, color, movement and depth: Anatomy, physiology and perception. Science. 240:740-749, 1981.
51. Taylor WR, Vaney DI. New directions in retinal research. Trends Neurosci. 26:379-85, 2003.
52. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Section VI, perception, pp: 365-385, Essentials of Neural Science and Behavior. Appleton & Lange, 1995
53. Neitz J, Jacobs GH. Reexamination of spectral mechanisms in the rat (*Rattus norvegicus*). J. Comp. Psychol. 100:21-29, 1986.
54. Heckenlively JR, Arden GB. Principles and practice of clinical electrophysiology of vision. New York: Mosby, 1991.
55. Ogden TE. Clinical electrophysiology. Stephen JR. Retina, Vol.1, C.V. Mosby Company, St. Louis. Baltimore-Toronto, 285-296, 1989.
56. Gündüz K, Doğan ÖK. Elektrodyagnostik yöntemler I, II, III, Türk Oftalmoloji Gazetesi. 18:423-446, 1988.
57. Dawson GE. A summation technique for the detection of small evoked potentials. Electroenceph. Clin. Neurophysiol. 6:65-84, 1954.
58. Jörg J. und Hielscher H. Evozierte potenziale ( VEP, SEP, AEP ) in klinik und praxis. Springer-Verlag, Berlin, Heilderberg. 1-69, 1984.
59. Sokol S. Visually evoked potentials: Theory, techniques and clinical applications. Survey of Ophtalmology. 21:18-44, 1976.
60. Halliday AM, McDonald WL, and Mushin J. Delayed visual evoked response in optic neuritis. Lancet. 1:982-985, 1972.
61. Espinoza SG, Thomas HC. Retinotopic organization of striate and extrastriate visual cortex in the hooded rat. Brain Res. 272:137-144, 1983
62. Herr DW, King D, Barone S, Crofton KM. Alteration in the flash evoked potentials (FEPs) in rats produced by 3,3'-iminodipropionitrile (IDPN). Neurotoxicol Teratol. 17:645,656, 1995
63. Kraut MA, Arezzo JC, Vaughan HGJ. Intracortical generators of the flash VEP in monkeys. Electroenceph Clin Neurophysiol. 62:300-312, 1985
64. Dyer RS, Jensen KF, Boyes WK. Focal lesions of visual cortex: Effect on visual evoked potentials in rats. Exp. Neurol. 95:100-115, 1987
65. Shozo Tobimatsu, Gastone G. Celesia. Studies of human visual pathophysiology with visual evoked potentials. Clinical Neurophysiology. 117:1414-1433, 2006.
66. Regan D. Comparison of transient and steady state methods. Ann NY Acad. Sci.45-71, 1982.
67. Regan D. Some characteristics of average steady-state and transient responses evoked by modulated light. Electroenceph. Clin. Neurophysiol. 20:238-248, 1966.
68. Sanaç A.Ş. Visual evoked potansiyel. Türk Oftalmoloji Gazetesi, 1988, 18: 84-107
69. Gücükoğlu A. Retrobulber nevrinin VER ile tanısı ve klinik değeri. Türk Oftalmoloji Gazetesi. 16:424-435, 1988.

70. Halliday AM. Visual evoked responses in optic nerve disease. Transactions of the ophthalmological society of United Kingdom. 96:372-376, 1976.
71. Hetzler BE, Boyes WK, Creason J, Dyer RS. Temperature dependent changes in visual evoked potentials of rats. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 70:137-154, 1988.
72. Ađar A, Kūçukatay V, Yargiçođlu P, Aktekin B, Kipmen-Korgun S, Gūmūşlū D, Apaydin C. The effect of sulfur dioxide inhalation on visual evoked potentials, antioxidant status, and lipid peroxidation in alloxan-induced diabetic rats. *Arch Environ Contam Toxicol.* 39:257-64, 2000.
73. Gūmūşlū S, Bilmen S, Korgun DK, Yargiçođlu P, Ađar A. Age-related changes in antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in lungs of control and sulfur dioxide exposed rats. *Free Radic Res.* 34:621-7, 2001.
74. Aydin S, Yargicoglu P, Derin N, Aliciguzel Y, Abidin I, Agar A. The effect of chronic restraint stress and sulfite on visual evoked potentials (VEPs): Relation to lipid peroxidation. *Food and Chemical Toxicology*, 43:1093–1101, 2005.
75. Kucukatay V, Hacıoglu G, Savcıoglu F, Yargıoglu P, Agar A. Visual evoked potentials in normal and sulfite oxidase deficient rats exposed to ingested sulfite. *NeuroToxicology.* 27:93–100, 2006.
76. Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int.* 49:91-102, 1999.
77. Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Cargnoni A, Pasini E, De Giuli F, Albertini A. Role of oxygen free radicals in ischemic and reperfused myocardium. *Am J Clin Nutr.* 53:215-222, 1991.
78. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* 49:481-493, 1993.
79. Kusterer K, Pihan G, Szabo S. Role of lipid peroxidation in gastric mucosal lesions induced by HCl, NaOH or ischemia. *Am J Physiol.* 252:811-816, 1987.
80. Kusterer K, Pihan G, Szabo S. Role of lipid peroxidation in gastric mucosal lesions induced by HCl, NaOH, or ischemia. *Am J Pyhsiol.* 252:811-816, 1987.
81. Chih-Ching Yeh, Ming-Feng Hou, Shih-Meng Tsai, Shu-Kai Lind, Jen-Kuei Hsiao, Jung-Chih Huang, Li-Hsuan Wang, Szu-Hsien Wu, Linda Ann Hou, Hsu Ma, Li-Yu Tsai. Superoxide anion radical, lipid peroxides and antioxidant status in the blood of patients with breast cancer. *Clinica Chimica Acta.* 361;104– 111, 2005.
82. Stahl W, Seis H. Reactive oxygen species. *Research Monographs.* 1-2, 2002.
83. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkiler. ss: 85-91, 1995.
84. Betteridge J. What is oxidative stress? *Metabolism.* 49:3-8, 2000.
85. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 74:139-162, 1994.
86. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 244:6049-6055, 1969.
87. Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med.* 10:18-25, 2004.
88. Curnatte JT and Babior BM. Chronic granulomatous disease. *Adv. Hum. Genet.* 16:229–297, 1987.



- 89 Babior BM, Lambeth JD and Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 397: 342–344, 2002.
- 90 Hartz JW, Deutsch HF. Subunit structure of human erythrocyte superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 247:7043-7050, 1972.
- 91 Auroma OL, Halliwell B, Gajewski E, Dizdaroğlu M. Copper ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 273:601-604, 1991.
- 92 Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit. Care Med.* 21:1376-1386, 1993.
- 93 Park JL, Lucchesi BR. Mechanisms of myocardial reperfusion injury. *Ann Thorac Surg.* 689:1905-12, 1999.
- 94 Calabrese V, Bates TE, Stella AM. NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochem. Res.* 25:1315-1341, 2000.
- 95 Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA and Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87:1620–1624, 1990.
- 96 Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 11:298-300, 1956.
- 97 Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 324: 1-18, 1997.
- 98 Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:4533-4537, 1990.
- 99 Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 7:153–163, 2000.
- 100 Koster JF, Biemond P, Stam H. Lipid peroxidation myocardial ischaemic damage: cause or consequence? *Basic Res Cardiol.* 82:253-60, 1987.
- 101 Clemens MR, Waller HD. Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem. Phys. Lipids.* 45:251-268, 1987.
- 102 Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological system. *Trends Biochem Sci.* 15:129-35, 1990.
- 103 Frank L, Massaro D. Oxygen Toxicity. *Am. J. Med.* 69:117-26, 1980.
- 104 Garner MH, Spector A. Selective oxidation of cystein and methionine in normal and senile cataractous lenses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 77:1274-1277, 1980.
- 105 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.* 16:1273-1278, 1984.
- 106 Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry* 59:1609–1623, 1992.
- 107 Çakatay U, Kayalı R. The clinical importance of protein oxidation. *Cerrahpaşa J Med.* 35:140-149, 2004.
- 108 Sagone AL, Greenwald J, Kraut EH, Bianchine J, Sing D. Glucose: a role as a free radical scavenger in biological systems. *J. Lab. Clin. Med.* 101:97-104, 1983.

- 109 Hassan HM, Fridovich L. Chemistry and biochemistry of superoxide dismutases. *Eur J Rheumatol. Inflamm.* 4:160-172, 1981.
- 110 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.* 8:1959-61, 1987.
- 111 Lawrence RA, Parkhill LK, Burk RF. Hepatic cytosolic non selenium-dependent glutathione peroxidase activity: its nature and the effect of selenium deficiency. *J. Nutr.* 108: 981-987, 1978.
- 112 Leung HW, Morrow PE. Interaction of glutathione and ascorbic acid in guinea pig lungs exposed to nitrogen dioxide. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 31: 111-118, 1981.
- 113 Leung KH, Post GB, Menzel DB. Glutathione S-sulfonate a sulfurdioxide metabolite, as a competitive inhibitor of glutathione S-transferase, and its reduction by glutathione reductase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 77: 388-394, 1985.
- 114 Aslan M, Thornley-Brown D, Freeman BA. Reactive species in sickle cell disease. *Ann N Y Acad Sci.* 899: 375-91, 2000.
- 115 Aslan M, Freeman BA. Oxidases and oxygenases in the regulation of vascular nitric oxide signaling and inflammatory responses. *Immunologic Research.* 26:107-18, 2002.
- 116 Thomas CE, Aust SD. Rat liver microsomal NADPH-dependent release of iron from ferritin and lipid peroxidation. *J. Free. Radic. Biol. Med.* 1:293-300, 1985.
- 117 Wendel A, Cikryt P. The level and half-life of glutathione in human plasma. *FEBS-Lett.* 120:209-211, 1980.
- 118 Whiting JC, Bhamre S, Tham DM, Cohen HJ Extracellular glutathione peroxidase is secreted basolaterally by human renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 283:20-8, 2002.
- 119 Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 47:412-426, 1982.
- 120 Carlberg I, Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem.* 250:5475-5480, 1975.
- 121 Jernstrom B, Dock L, Martinez M. Metabolic activation of benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide to protein-binding products and the inhibitory effect of glutathione and cysteine. *Carcinogenesis* 5:199-204, 1984.
- 122 Traber MG. Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants. *Miner. Electrolyte Metab.* 23:135-139, 1997.
- 123 Chan AC. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71:725-731, 1993.
- 124 Al-Turk WA, Stohs SJ, El-Rashidy FH, Othman S, Shaheen O. Changes in glutathione reductase and glutathione-S-transferase as a function of cell concentration and age. *Pharmacology.* 34:1-8, 1987.
- 125 David P. Rall. Review of the Health Effects Of Sulfur Oxides. *Environmental Health Perspectives.* 8:97-121, 1974.

- 126 Gould M, Wilson D, Milne K, Paterson A, Golder D, and Russell D. Interaction of Imipenem with Erythromycin and Tetracycline Assessed by Microdilution Checkerboard Techniques. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 2407-2409, 1991.
- 127 Gunnison AF, Benton AW. Sulfur dioxide: Sulfite interaction with mammalian serum and plasma. *Arch. Environ Health*. 22:381-388, 1971.
- 128 Feng C, Tollin G, and Enemark JH. Sulfite oxidizing enzymes. *Biochim Biophys Acta*. 1774:527-539, 2007.
- 129 Tejnorova I. Sulfite oxidase activity in liver and kidney tissues in five laboratory animal species. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 44: 251-256, 1978.
- 130 Cabre F, Marin C, Cascante M, Canela EI. Occurrence and comparison of sulfite oxidase activity in mammalian tissues. *Biochem. Med. Metab. Biol*. 43: 159-62, 1990.
- 131 Gunnison AF, Palmes ED. Persistence of plasma S-sulfonates following exposure of rabbits to sulfite and sulfur dioxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 24:266-278, 1973.
- 132 Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, Jenner P, Marsden CD. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol*. 36:348-55, 1994.
- 133 Reist M, Marshall KA., Jenner P, Halliwell B. Toxic Effects of Sulphite in Combination with Peroxynitrite on Neuronal Cells. *J Neurochem*. 71:2431-2438, 1998.
- 134 Kodavanti UP, Jackson MC, Ledbetter A, Starcher BC, Evansky PA, Harewood A, Winstt DW, Costa DL. The combination of Elastase and Sulfur Dioxide Exposure Causes COPD-Like Lesions in the Rat. *Chest*. 117:299S-302S, 2000.
- 135 Atzori L, Bannenberg G, Corrigan AM, Lou YP, Lundberg JM, Ryrfeldt A, Moldeus P. Sulfur dioxide-induced bronchoconstriction via Ruthenium Red-sensitive activation of sensory nerves. *Respiration*. 59:272-278, 1992.
- 136 Samet JM, Dominici F, Curriero FC, Coursac I, Zeger SL. Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987-1994. *The New England Journal of Medicine*. 343:1742-1749, 2000.
- 137 Rencüzogullari E, Ila BH, Kayraldiz A, Topakta M. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes treated with sodium metabisulfite, a food preservative. *Mutation Research* 490;107-112, 2001.
- 138 Meng Z, Qin G, Zhang B, Geng H, Bai Q, Bai W, and Liu C. Oxidative damage of sulfur dioxide inhalation on lungs and hearts of mice. *Environmental Research*. 93:285-292, 2003.
- 139 Gunnison AF, Dulak L, Chiang G, Zaccardi J, Farruggella TJ. A sulphite-oxidase-deficient rat model: Subchronic toxicology. *Food. Cosmet. Toxicol*. 19:221-232, 1981.
- 140 Gunnison AF, Jacobsen DW. Sulfite hypersensitivity. A critical review. *CRC Crit. Rev. Toxicol*. 17:185-214, 1987.
- 141 Cohen HJ, Drew RT, Johnson JL, Rajagopalan KV. Molecular basis of the biological function of molybdenum: the relationship between sulfite oxidase

- and the acute toxicity of bisulfite and SO<sub>2</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70:3655-9, 1973.
- 142 Du Z, Meng Z. Modulation of sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons by sulfur dioxide derivatives. *Brain Research.* 1010:127–133, 2004.
- 143 Yargicoglu P, Şahin E, Gümüşlü S, Açar A. The effect of sulfur dioxide inhalation on active avoidance learning, antioxidant status and lipid peroxidation during aging. *Neurotoxicology and Teratology.* 29:211–218, 2007.
- 144 Johnson JL, Rajagopalan KV. Human sulfite oxidase deficiency characterization of the molecular defect in a multicomponent system. *The Journal of Clinical Investigation.* 58:551-556, 1976.
- 145 Du Z, Meng Z. Effects of derivatives of sulfur dioxide on transient outwardpotassium currents in acutely isolated hippocampal neurons. *Food and Chemical Toxicology.* 42:1211–1216, 2004.
- 146 Du Z, Meng Z. Sulfur dioxide derivatives modulation of high-threshold calcium currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience Letters.* 405:147–152, 2006.
- 147 Meng Z, Qin G, Zhang B, Zhang J. Inhalation of sulfur dioxide on the DNA damage of brain cells in mice. 36:370-3, 2002.
- 148 Açar A, Küçükataş V, Yargıçoğlu P, Bilmen S, Gümüşlü S, Yücel G. Effect of sulfur dioxide inhalation on erythrocyte antioxidant status and lipid peroxidation in experimental diabetes. *Diabetes Metab.* 26: 140-144, 2000.
- 149 Hui JY, Beery JT, Higley NA, Taylor SL. Comparative subchronic oral toxicity of sulphite and acetaldehyde hydroxysulphonate in rats. *Food Chem Toxicol.* 27:349-359, 1989.
- 150 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.* 39:2522-2526, 1993.
- 151 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254, 1976.
- 152 Amdur MO. Toxicologic appraisal of particulate matter, oxides of sulfur, and sulfuric acid. *J Air Pollut Control Assoc.* 19:638-44, 1969.
- 153 Mazumdar S, Sussman N. Relationships of air pollution to health: results from the Pittsburgh study. *Arch Environ Health.* 38(1):17-24, 1983.
- 154 Koepke JW, Selner JC, Dunhill AL. Presence of sulfur dioxide in commonly used bronchodilator solutions. *J Allergy Clin Immunol.* 72:504-8, 1983.
- 155 Brown RH, Greenberg RS, Wagner EM. Efficacy of propofol to prevent bronchoconstriction: effects of preservative. *Anesthesiology.* 94:851-5, 2001.
- 156 Halaby SF, Mattocks AM. Absorption Of Sodium Bisulfite From Peritoneal Dialysis Solutions. *J Pharm Sci.* 54:52-5, 1965.
- 157 Stevenson DD, Simon RA. Sensitivity to ingested metabisulfites in asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 68:26-32, 1981.
- 158 Vally H, De Klerk N, Thompson PJ. Alcoholic drinks: important triggers for asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 105:462-7, 2000.

- 159** Alarie Y, Ulrich CE, Busey WM, Swann HE Jr, MacFarland HN. Long-term continuous exposure of guinea pigs to sulfur dioxide. *Arch Environ Health*. 21:769-77, 1970.
- 160** Alarie YC, Krumm AA, Busey WM, Ulrich CE, Kantz RJ. Long-term exposure to sulfur dioxide, sulfuric acid mist, fly ash, and their mixtures. Results of Studies in Monkeys and guinea pigs. *Arch Environ Health*. 30:254-62, 1975.
- 161** Nair B, Elmore AR; Cosmetic Ingredients Review Expert Panel. Final report on the safety assessment of sodium sulfite, potassium sulfite, ammonium sulfite, sodium bisulfite, ammonium bisulfite, sodium metabisulfite and potassium metabisulfite. *Int J Toxicol*. 2:63-88, 2003.
- 162** Shih VE, Abroms IF, Johnson JL, Carney M, Mandell R, Robb RM, Cloherty JP, Rajagopalan KV. Sulfite oxidase deficiency. Biochemical and clinical investigations of a hereditary metabolic disorder in sulfur metabolism. *N Engl J Med*. 297:1022-8, 1977.
- 163** Shih VE, Carney MM, Mandell R. A simple screening test for sulfite oxidase deficiency: detection of urinary thiosulfate by a modification of Sörbo's method. *Clinica Chimica Acta*. 95:143-145, 1979.
- 164** Mudd SH, Irreverre F, Laster L. Sulfite oxidase deficiency in man: demonstration of the enzymatic defect. *Science*. 156:1599-602, 1967.
- 165** Agar A, Kucukatay V, Yargicoglu P, Bilmen S, Gumuslu S, Yucel G. Effect of sulfur dioxide inhalation on erythrocyte antioxidant status and lipid peroxidation in experimental diabetes. *Diabetes Metab*. 26:140-4, 2000.
- 166** Andersson E, Nilsson T, Persson B, Wingren G, Toren K. Mortality from asthma and cancer among sulfite mill workers. *Scand J Work Environ Health*. 24:12-7, 1998.
- 167** 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, 1990.
- 168** Araki S, Murata K, Aono H. Central and peripheral nervous system dysfunction in workers exposed to lead, zinc and copper. A follow-up study of visual and somatosensory evoked potentials, *Int Arch Occup Environ Health*. 59:177-87, 1987.
- 169** Esterbauer H, Cheeseman K. Determination of aldehydic lipid-oxidation products malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods. Enzymol*. 186:407-421, 1990.
- 170** Holley AE, Cheeseman KH. Measuring free radical reactions in vivo. *Br. Med. Bull*. 49: 494-505, 1990.
- 171** Esterbauer H. Estimation of peroxidative damage. A critical review. *Pathol Biol*. 44:25-8, 1996.

## ÖZGEÇMİŞ

Nihal ÖZTÜRK, 1979 yılında Afyon'un Dinar ilçesinde doğdu, ilk, orta ve lise öğrenimini Afyon'da tamamladı. 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü'nde üniversite eğitimine başladı. Lisans diplomasını 2003 yılında aldı ve 2005 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizce'dir.