

TAVŞANLARDA DENEYSEL OLARAK AŞIRI DEMİR YÜKLENMESİYLE OLUŞTURULAN OKSİDATİF HASARIN KARACİĞER DOKUSUNDA YAPTIĞI BİYOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER

Mehmet AKDOĞAN¹, Fatih GÜLTEKİN¹, İrfan ALTUNTAŞ¹, Namık DELİBAŞ¹, Süleyman KALELİ²

THE BIOCHEMICAL CHANGES DUE TO OXIDATIVE DAMAGE CAUSED BY EXPERIMENTALLY OVER LOADED IRON IN LIVER OF RABBITS

Summary: Over loaded transition metals such as iron to an organism can cause oxidative damage on some organs such liver, heart, joints and beta cells of pancreas. Antioxidant defense systems which reduce oxidative damage caused by free radicals are present in living organisms. Vitamin E and melatonin secreted from pineal gland are strong antioxidants. In this study, we aimed to investigate the effects of iron dextran, vitamin E and melatonin on liver function tests such as the activities of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and lactate dehydrogenase in plasma, and antioxidant enzyme activities such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GSSG-Rd) and catalase (CAT), and the level of malondialdehyde (MDA) which is a marker of lipid peroxidation in liver. Forty New Zealand male rabbits, weighing 600 - 800 g were used. Animals were divided into four groups. Physiologic saline, iron dextran (500 mg/kg), iron dextran (500 mg/kg) plus melatonin (100 mg/kg), iron dextran (500 mg/kg) plus vitamin E (100 mg/kg) were applied intraperitoneally in Group I (control), Group II, Group III and Group IV, respectively. Plasma AST, ALT and LDH activities elevated significantly ($p < 0,001$) in Group II, III and IV compared to Group I. Whereas SOD, GSH-Px, GSSG-Rd and CAT activities were seen to decrease ($p < 0,001$) in Group II, III and IV compared to Group I, MDA level was seen to increase ($p < 0,001$) in the same groups. On the other hand, SOD, GSH-Px and CAT activities were found to be increased ($p < 0,05$) in Group III and IV compared to Group II. However, MDA level was found to decrease only in Group III comparing with Group II ($p < 0,05$). As a result, it can be suggested that iron dextran causes to decrease in antioxidant enzyme activities with increasing lipid peroxidation, and vitamin E and melatonin which is more potent than vitamin E reduce this damage.

Key Words: Iron dextran, Antioxidant enzymes, Lipid peroxidation, Melatonin, Vitamin E

Özet: Organizmaya fazla miktarda alınan demir gibi geçiş metalleri karaciğer, kalp, eklemler ve pankreas β hücreleri gibi bir çok dokuda oksidatif hasar oluşturur. Yaşayan organizmalarda serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif hasarı indirgeyici yönde antioksidan savunma sistemleri mevcuttur. E vitamini ve pineal bezden sentez edilen melatonin güçlü antioksidan maddelerdir. Bu çalışmada demir dekstran, melatonin ve E vitamininin karaciğer fonksiyon testlerinden plazma Aspartat aminotransferaz (AST), Alanin aminotransferaz (ALT), Laktat dehidrogenaz (LDH) aktivite düzeyleri ile karaciğer dokusu antioksidan enzim sistemlerden süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSSG-Rd), katalaz (CAT) ve lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehid (MDA) düzeylerine etkisini araştırmayı amaçladık. Çalışmada ağırlıkları 600 - 800 gr arasında olan Yeni Zelanda türü, 40 erkek tavşan 10'erli 4 gruba ayrıldı. Grup I'e serum fizyolojik (kontrol grubu), Grup II'ye 500mg/kg demir dekstran, Grup III'e 500mg/kg demir dekstran ve 100 mg/kg melatonin, Grup IV'e 500mg/kg demir dekstran ve 100 mg/kg vitamin E intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Grup II, III ve IV'de plazma AST, ALT ve LDH aktivitelerinin anlamlı olarak arttığı ($p < 0,001$), karaciğer dokusunda ise SOD, GSH-Px, GSSG-Rd, CAT aktivitelerinin önemli oranda azaldığı ($p < 0,001$) ve MDA düzeylerinin arttığı ($p < 0,001$) gözlemlendi. Grup III ve IV'te Grup II ile karşılaştırıldığında SOD, GSH-Px ve CAT aktiviteleri önemli oranda yüksek ($p < 0,05$) bulunurken, MDA düzeyleri sadece Grup III'te anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0,05$). Sonuç olarak demir dekstranın karaciğer dokusunda antioksidan enzim aktivitelerinin azalmasına neden olurken lipid peroksidasyonunu artırdığı, melatonin ve vitamin E uygulamasının bu hasarı azalttığı, ayrıca melatoninin E vitaminine göre daha potent olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Demir dekstran, Antioksidan enzimler, Lipid peroksidasyonu, Melatonin, Vitamin E

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fak. Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı

² Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu Biyokimya



GİRİŞ

Normal metabolizmanın sürdürülmesi ve hücrelerde enerji üretimi için zorunlu olan bir çok reaksiyonda serbest radikaller üretilmektedir. Serbest radikallerin üretimi ile oluşan oksidatif stres, başlıca demir gibi metal iyonlarının varlığında artmaktadır (1).

Bu nedenle, demir eksikliği bulunmayan bazı hastalara, yanlış bir uygulama olarak, özellikle de parenteral yolla verilen fazla miktardaki demirin, bazı hastalarda demir yüklenmesine neden olabileceğinden, çalışmamızda demir yüklenmesiyle oluşturulan hasar üzerinde durduk. Organizmada, oksidan ve antioksidan yapılar arasında bir denge vardır. Hücrelerin sağlıklı bir şekilde fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri, oksidan ve antioksidan moleküller arasındaki dengeye bağlıdır (1,2).

Serbest radikaller hücrede lipid, protein, DNA ve karbonhidrat gibi önemli hücresel yapı ve bileşiklere etkilidir. Membranı oluşturan fosfolipitler, glikolipitler, gliseritlerin yapısındaki doymamış yağ asitleri ve membran proteinleri serbest radikaller için oldukça çekici makromoleküllerdir (2,3). Biyomoleküllerin tümü serbest radikallerin etki alanında olsalar da lipitler bu riske en duyarlı yapılardır (1). Serbest radikaller başlıca moleküler oksijenin normal metabolizma basamaklarında indirgenmesi ile açığa çıkmaktadır (4). Reaktif oksijen türleri insan vücudunda sürekli oluşur. Bunların çoğu yararlı fizyolojik görevleri yerine getirir. Fakat aşırı miktarlarda veya uygunsuz koşullarda oluşumu ile toksik olabilirler. Bu toksisite demir veya bakır gibi geçiş metallerinin varlığında artar (5,6).

Melatonin hormonu güçlü bir serbest radikal toplayıcısıdır. Melatonin özellikle organizmada yapılan ve son derece tahrip edici olduğu düşünülen hidroksil radikalinin (OH) dokulardaki olumsuz etkilerini engellemektedir (7). Pineal bezden melatonin üretimi yaşlanmayla birlikte

belirgin olarak azalmaktadır (8). Melatonin oldukça lipofilik bir hormon olduğundan bütün membranları kolayca geçebilmektedir. Böylece kan melatonin konsantrasyonundaki azalma hızla hücre içine de yansımakta ve melatoninin hücre içi düzeyi düşmektedir (7,9). Hücrede melatonin özellikle çekirdekte toplandığından, pineal bezin melatonin üretiminin azalmasından en fazla çekirdek etkilenmektedir (9). Melatoninin doğrudan hidroksil radikali toplama yeteneğinin yanı sıra, önemli bir antioksidan enzim olan nöral Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) enzimin aktivite düzeyini artırma yeteneği de vardır. Böylece melatonin doğrudan serbest radikalleri toplayarak oksidatif yıkımı önlemekle kalmayıp, aynı zamanda indirekt yoldan diğer oksidatif işlemleri de uyarır (7,9).

E vitamini enzimatik olmayan antioksidanlardan biridir. E vitamini türevlerinde antioksidan aktivitesi en yüksek olan a-tokoferoldür. Çok güçlü bir antioksidan olan E vitamini, hücre membran fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. E vitamini dokularda en önemli zincir kırıcı antioksidandır ve lipid peroksidasyonuna karşı ilk sıradaki koruma mekanizmasıdır (13,14). Bu etkisini ise erken dönemde hücre membranlarını serbest radikallerin zararlarından serbest radikalleri tutarak korumaktadır (15, 16). Bir antioksidan madde ile baskılanmadıkları sürece ileri derecede stabil olmayan bu serbest radikaller membran fosfolipidlerinin çoklu doymamış yağ asitlerine etki ederler. Bu işlem birkez başladığında ise serbest radikaller zincirleme bir reaksiyon biçiminde hücre membranlarının hem yapısını, hem de fonksiyonlarını bozarlar (17).

MATERYAL VE METOD

Çalışma, ağırlıkları 600 - 800 gr. arasında değişen albino türü Yeni Zelanda 40 erkek tavşan üzerinde gerçekleştirildi. Tavşanlar çalışma boyunca 12 saat aydınlık ve karanlık siklusunda

tutuldu. Tavşanlar pellet yem ve su ile beslendi. Çalışmaya alınan 40 erkek tavşan 10'arlı 4 gruba ayrıldı. Grup I kontrol, Grup II demir dekstran, Grup III demir dekstran ve melatonin, Grup IV demir dekstran ve vitamin E uygulanan grupları oluşturdu. Demir dekstran uygulanmasında 3 saat önce Grup I ve II'ye serum fizyolojik, Grup III'e 100 mg/kg dozunda melatonin, Grup IV'e 100 mg/kg dozunda α - tokoferol intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı. Grup II, III ve IV'deki tavşanlara demir dekstran uygulanması eş zamanlı, yüksek doz (500mg/kg) i.p. olarak yapıldı. Grup I'e ise yine serum fizyolojik ip olarak yapıldı. Demir dekstran verilmesinden 8 saat sonra çalışmadaki tüm tavşanların eter anestezisi altında göğüs kafesi açılarak 22 G iğne ile kardiyak kanları alındı. Biyokimyasal parametreleri saptamak üzere intrakardiyak alınan kan örnekleri K3EDTA'lı tüplere aktarıldı. Kan örnekleri 15 dk. oda ısısında bekletildikten sonra 3000rpm'de 10 dk. süreyle santrifüj edildi. Plazmaları başka bir deney tüpüne aktarıldı ve aynı gün Olympus AU 640 (Japan) otoanalizörde Olympus marka kit kullanarak plazma AST, ALT ve LDH aktivite düzeyleri saptandı. Ayrıca karaciğer doku örnekleri alınarak, dokuda SOD, GSH-Px, GSSG-Rd, CAT aktiviteleri ve MDA düzeyleri saptandı.

Biyokimyasal inceleme için alınan karaciğer doku örnekleri cam şişeler içinde etiketlenerek -80 Co'de derin dondurucuda saklandı ve 15 gün içinde çözülerek çalışıldı.

Dokunun homojenasyonu için; karaciğer dokuların kanlarını uzaklaştırmak için soğuk distile su ile yıkandı. 150 mM soğuk potasyum fosfat tamponu (pH=7,4) ile homojenizatör (IKA Labortechnik Ultra-Turrax T25 model) kullanılarak 1000 U'da yaklaşık 5 dakika süreyle homojenize edilerek %10'luk homojenatlar hazırlandı. Elde edilen homojenat +4 C°'de 10 dakika süreyle 6000g'de santrifüj edilerek çekirdek ve sitoskelaton çöktürüldü (18). Homojenatlardan protein konsantrasyonu Lowry yöntemi (19) ile ölçüldü.

Biyokimyasal analizler:

Hemojenat SOD, GSH-Px, GSSG-Rd, CAT aktivite düzeylerini ve MDA düzeylerini tesbit etmek için kullanıldı.

1- Süperoksit dismutaz aktivitesi tayini
Williams ve ark (20) nın yöntemiyle ölçüldü. SOD çeşitli yollarla ortaya çıkan süperoksit O₂⁻ radikalinin H₂O₂'ye dismutasyonunu katalizler. SOD aktivitesi, ksantin-ksantin oksidaz (XOD) sistemi tarafından üretilen süperoksit radikalinin, 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolium klorür (İNT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formazon boyasının 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin (OD) spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile tesbit edilir. %50 inhibisyon sağlayan SOD miktarı 1 enzim ünitesi olarak alındı. Sonuçlar U/mg protein cinsinden hesaplandı.

2- Glutasyon peroksidaz aktivitesi tayini, Paglia and Valentine (21) yöntemiyle ölçüldü. GSH-Px, H₂O₂ tarafından redükte glutasyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG) yükseltgenmesini katalize eder. GSH-Px reaksiyonunda oluşan GSSG, glutasyon redüktaz (GSSG-Rd) ve NADPH yardımıyla GSH'a indirgenir. GSH-Px aktivitesi, NADPH'ın NADP⁺'ye yükseltgenmesi sırasında oluşan absorbans farkının 340 nm'de okunmasıyla ölçülür. Sonuçlar U/mg protein cinsinden hesaplandı.

3-Glutasyon redüktaz aktivitesi tayini, Goldberg (22) yöntemiyle ölçüldü. Deneyde glutasyon redüktaz, NADPH+H⁺ varlığında glutasyonun redüksiyonunu katalize eder ve sonuçta GSH (redükte glutasyon) oluşur. NADPH+H⁺'in okside NADP⁺'ye yükseltgenmesi sırasında oluşan absorbans farkının 340 nm'de okunmasıyla ölçülür. Sonuçlar U/mg protein cinsinden hesaplandı.

4-Katalaz aktivitesi tayini, Aebi'nin metodu ile ölçüldü (23). Deney 240 nm dalga boyunda H₂O₂ miktarının katalaz tarafından azaltılması, 15 saniye aralıklarla 2.5 dakika süresince belirlendi.



Hesaplanan regresyonlara göre her bir analiz için uygun absorpsiyonlar alınarak k/ml homojenat olarak katalaz aktivite değeri elde edildi. Sonuçlar k/mg protein cinsinden hesaplandı.

5-MDA düzeyleri Ohkawa ve arkının yöntemiyle doku homejenatında tiyobarbitürik asit reaktif substans (TBARS) konsantrasyonları ölçülerek saptandı (24). 3 ml % 1'lik H₃PO₄ (Fosforik asit) ve % 0,6'lık TBA (Thiobarbitürik asit) solusyonu % 10 'luk 0,5 ml doku homejenatı ile karıştırıldı. Karışım 45 dakika süreyle kaynar su banyosunda tutuldu. Çeşme suyunda soğutuldu. 4 ml n - butanol eklendi. Vortekslendi. Absorbans 532 nm 'de butanole karşı (e =1.56. 105M⁻¹ cm⁻¹) okundu. nmol / gram protein cinsinden ifade edildi.

Tüm spektrofotometrik ölçümlerde Shimadzu 1601 UV, Kyoto, Japan spektrofotometre kullanıldı.

İstatistiki değerlendirmeler için "SPSS 9.05 for Windows" istatistik paket programından yararlanıldı. Veriler, aritmetik ortalama ± standart sapma şeklinde ifade edildi. Grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanıldı.

BULGULAR

Kontrol ve deney gruplarındaki tavşanlardan plazma AST, ALT ve LDH düzeyleri ile karaciğer dokusunda antioksidan enzimlerden SOD, GSH-Px, GSSG-Rd, CAT, aktivite düzeyleri, MDA düzeyleri Tablo 1, 2 ile Grafik 1- 5'de verilmiştir. Tablo ve şekillerde görüldüğü gibi Kontrol grubu (Grup I) ile karşılaştırıldığında Grup II, III ve IV'de plazma AST, ALT ve LDH aktivitelerinin anlamlı olarak arttığı (p<0,001), karaciğer dokusunda ise SOD, GSH-Px, GSSG-Rd, CAT aktivitelerinin önemli oranda azaldığı (p<0,001) ve MDA düzeylerinin arttığı (p<0,001) gözlemlendi. Ayrıca, Grup III ve IV'te Grup II ile

karşılaştırıldığında SOD, GSH-Px ve CAT aktiviteleri önemli oranda yüksek (p<0,05) bulunurken, MDA düzeyleri sadece Grup III te anlamlı olarak düşük bulundu (p<0,05).

Tablo 1. Kontrol ve deney grubu hayvanların plazma AST, ALT ve LDH aktivite düzeyleri.

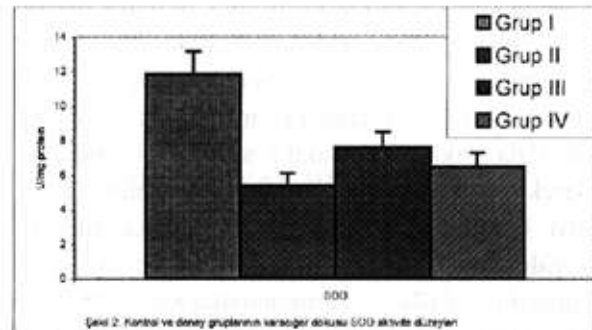
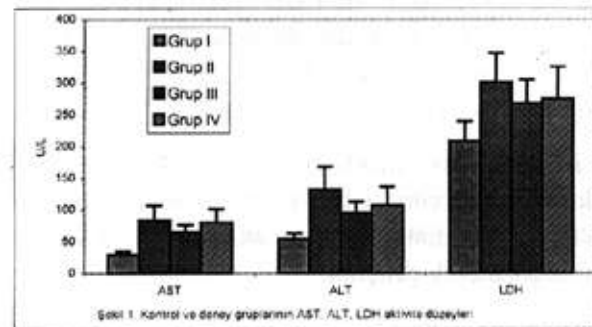
Gruplar	AST U/L	ALT U/L	LDH U/L
Kontrol (n=10)	30± 5	55± 8	208± 32
Grup II (n=10)	84± 23 ^a	133± 36 ^a	302± 45 ^a
Grup III (n=10)	65± 11,5 ^a	96± 17,7 ^a	268± 37 ^a
Grup IV (n=10)	80± 22 ^a	108± 29 ^a	275± 51 ^a

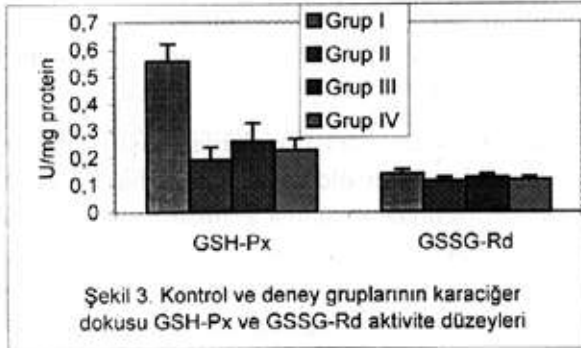
^a = p<0,001

Tablo 2. Kontrol ve deney gruplarının karaciğer dokusu SOD, GSH-Px, GSSG-Rd, CAT, G6PD aktivite düzeyleri ile MDA düzeyleri.

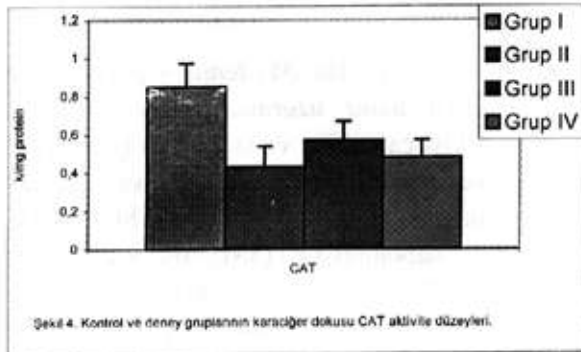
Gruplar	SOD U/mg protein	GSH-Px U/mg protein	GSSG-Rd U/mg protein	CAT k/mg protein	MDA nmol/gr protein
Kontrol (n=10)	11,87± 1,30	0,556± 0,066	0,140± 0,016	0,85± 0,120	275± 34
Grup II (n=10)	5,42± 0,72 ^a	0,194± 0,045 ^a	0,115± 0,012 ^a	0,43± 0,110 ^a	425± 85 ^a
Grup III (n=10)	7,62± 0,90 ^a	0,260± 0,067 ^a	0,126± 0,013 ^b	0,57± 0,098 ^a	350± 59 ^a
Grup IV (n=10)	6,48± 0,81 ^a	0,227± 0,042 ^a	0,119± 0,012 ^b	0,48± 0,096 ^a	383± 40 ^a

^a = p<0,001, ^b = p<0,01

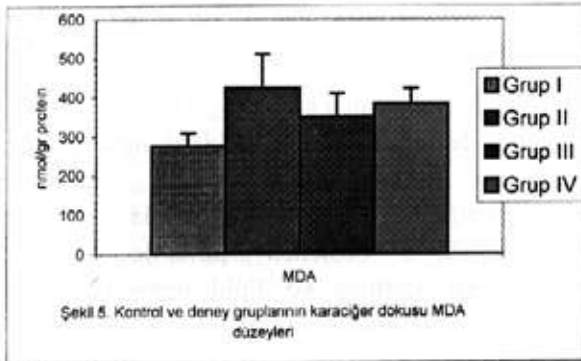




Şekil 3. Kontrol ve deney gruplarının karaciğer dokusu GSH-Px ve GSSG-Rd aktivite düzeyleri



Şekil 4. Kontrol ve deney gruplarının karaciğer dokusu CAT aktivite düzeyleri.



Şekil 5. Kontrol ve deney gruplarının karaciğer dokusu MDA düzeyleri

TARTIŞMA

Serbest radikallerin en fazla üretildiği metabolik işlem, mitokondriyal elektron transport zinciridir. Radikaller, oksijenin taşınması esnasında hemoglobinden ve solunum zincirinde NADPH'e bağlı dehidrojenazdan, elektron sızıntısı ile oluşabilmektedir (25).

Geçiş metalleri, özellikle demir ve bakır, fizyolojik şartlarda çeşitli oksidasyon basamaklarında bulunurlar. Geçiş metalleri serbest radikal hasarını hızlandırır ve katalizör vazifesi

görürler. Bu tip maddelere oksidan stressör adı verilir (26). Metal iyonlarının serbest radikal reaksiyonlarındaki asıl önemleri ise lipid peroksidasyonundaki etkileridir (13).

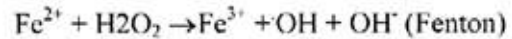
Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler oksijenin kendisi, süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), geçiş metallerinin iyonları ve hidrosil radikali (OH^\cdot)dir (13).

Yaşayan organizmalarda O_2^- ve H_2O_2 'in toksisiteleri bunların OH ve reaktif radikal metal komplekslerine dönüşmesinden kaynaklanır (1).

Süperoksitle reaksiyona giren hidrojen peroksit, hücre içi oldukça toksik olan hidrosil radikalini oluşturmak üzere Haber-Weiss reaksiyonu adı verilen tepkime ile parçalanır (1,27).



Haber-Weiss reaksiyonu ya katalizör varlığında ya da katalizörsüz cereyan edebilir. Fakat katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler (1,13). Reaksiyon demirle katalizlendiğinde (Fenton tepkimesinde) ortalama 4000 kat hızlanır (3,28,29).



Geçiş metalleri bu özelliklerinden dolayı serbest radikal reaksiyonlarını hızlandırır ve katalizör vazifesi görürler. Transferrine bağlı demir serbest radikal hasarına katılmazken serbest demir serbest radikal hasarını hızlandırır (30,31).

Biz de çalışmamızda, serbest radikal hasarını yukarıda bahsettiğimiz mekanizmalarla arttıracaklarını düşündüğümüz demir dekstran'ı kullandık.

Galleno ve ark. 500mg/kg i.p demir dekstranın tek doz uygulamasından 20 saat sonra karaciğer homojenatlarında CAT, SOD ve GSH-Px aktivitelerinin sırasıyla %25, 36 ve 32 oranında düşme gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca yüksek doz demir uyguladıktan sonra karaciğer ve böbrek dokusu homojenatlarında serbest radikal hasarı oluştuğunu göstermişlerdir (32).



Biz ise yaptığımız çalışmada serbest radikal hasarını yüksek doz demir uygulamasını takiben 8 saat sonra karaciğer dokusunda araştırdık. Çalışmamızda serum AST, ALT ve LDH aktivite düzeylerinin 500 mg/kg Demir dekstran verilen grupta (Grup II), kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek bulundu ($p<0,001$). Karaciğer dokusu antioksidan enzimlerden SOD, GSH-Px, GSSG-Rd, CAT aktivite düzeyleri Grup II'nin Kontrol Grubuna göre önemli derecede düşmesi MDA düzeyleri ise önemli derecede artması ($p<0,001$) yüksek doz demir demir dekstran uygulanmasını takiben karaciğer dokusunda önemli derecede serbest radikal hasarı oluşturduğunu gösteriyordu. Bizim çalışmamız Galleno ve ark. yaptığı çalışmayla uyumlu

Yaptığımız çalışmada karaciğer dokusunda oluşan bu oksidatif hasarı önlemek için diğer grupları (Grup III ve Grup IV) antioksidanlarla desteklemeyi planladık. Antioksidan olarak melatonin ve vitamin E'yi kullandık.

Melatonin güçlü bir serbest radikal toplayıcısıdır ve özellikle organizmada yapılan ve son derece tahrip edici olduğu düşünülen hidroksil radikali (.OH)'nin olumsuz etkisini engellemektedir (7). Melatoninin doğrudan hidroksil radikali toplama yeteneğinin yanı sıra eksojen melatonin verilmesinin önemli bir antioksidatif enzim olan nöral glutasyon peroksidazı da artırma yeteneği vardır (14,34,35). Yaptığımız çalışmada karaciğer dokusu antioksidan enzimlerden SOD, GSH-Px, GSSG-Rd, CAT aktivite düzeyleri Grup III'nin Kontrol Grubuna (Grup I) göre önemli derecede düşmesi MDA düzeyleri ise önemli derecede artması ($p<0,001$) yüksek doz demir demir dekstrana ilaveten 100mg/kg melatonin ilave olarak uygulanmasının karaciğer dokusundaki oksidatif hasarı önlemeye yetmediğini göstermektedir. Ancak Grup III te Grup II ile karşılaştırıldığında MDA'nın anlamlı olarak düşük ($p<0,05$), antioksidan enzimlerden SOD, GSH-Px ve CAT'ın

anlamlı olarak yüksek ($p<0,05$) olması, melatoninin koruyucu etkisinin olduğunu göstermektedir.

Yapılan bazı araştırmalarda, aşırı demir yüklemesinin neden olduğu oksidatif hasara karşı birkaç antioksidan savunma elamanının koruyucu etkileri rapor edilmiştir. İnan ve ark (36) demir uygulanmış hayvanların %71'nin karaciğerlerinde histopatolojik olarak gramuloma saptarlarken, E vitamini ile tedavi edilmiş hayvanların yalnızca % 33'ünde granüloma gözlemlenmiştir.

Bir başka çalışmada da demir yüklenmesine bağlı oksidatif hasar üzerine diyetle alınan E vitaminin etkisi çalışılmış ve sıçan karaciğerlerinde demir yüklenmesiyle artmış lipid ve protein oksidasyonunun vitamin E ile etkili bir şekilde engellendiği saptanmıştır (33). Bu çalışmaları destekler nitelikte birkaç çalışmada ise, yüksek doz demir uygulanmış sıçanların plazmalarında (33,37) ve böbrek (37) homojenatlarında a-tokoferol miktarının önemli oranda azaldığı bildirilmiştir.

Dabbagh ve ark. dişi sıçanları 10 hafta süreyle elementel demirden yoğun gıda alımına maruz bırakmışlar, serbest radikal hasarını araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada demir ağırlıklı gıdayla beslenen sıçanlarda endojen antioksidanlar azalmış ve lipid peroksidasyonu artırmıştır. Antioksidan savunma sistemlerinden plazma a-tokoferol ve askorbik asit seviyelerini düşük bulmuşlardır (33).

Yapılan bir diğer çalışmada, plazma α -tokoferol seviyesi de demir uygulamasını takiben 20 saat sonra %40 oranında düşük bulunmuştur (32).

Çalışmamızda akut dönemde etkisini tespit etmeye çalıştığımız diğer bir antioksidansa E vitamindir. Karaciğer dokusu antioksidan enzimlerden SOD, GSH-Px, GSSG-Rd, CAT aktivite düzeyleri Grup IV'nin Kontrol Grubuna (Grup I) göre önemli derecede düşmesi MDA

düzeyleri ise önemli derecede artması ($p<0,001$) yüksek doz demir dekstrana ilaveten 100mg/kg E vitamini ilave olarak uygulanmasını takiben karaciğer dokusundaki oksidatif hasarı önlemeye yetmediğini gözlemledik.

Sonuç olarak demir dekstranın karaciğer dokusunda anioksidan enzim aktivitelerinin azalmasına neden olurken lipid peroksidasyonunu artırdığı, melatonin ve vitamin E uygulamasının bu hasarı azalttığı, ayrıca melatoninin E vitaminine göre daha potent olduğu kanaatine varıldı.

KAYNAKLAR

1. Auroma OI. Characterization of drug as antioksidant prophylactics. *Free Radical Biology and Medicine* 1996; 20: 675-705
2. Codogan JIG. Principles of free radical chemistry. London ,The chemical society 1973: 230-70
3. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49 (3): 479-83.
4. Pal Yu B. Cellular defenses against damage from reactive species. *Physiology Reviews* 1994; 74(1):139-62.
5. Criolo MR, Fıçkın K, Martino AD, Corasaniti MT. Age-related changes in Cu, Zn, superoxide dismutase, Se-dependent and independent glutathione peroxidase and catalase activities in specific areas of rat brain. *Mech Ageing Dev* 1991; 61: 287-97.
6. Slater TF. Free radicals in medicine. *Free Radic Res Commun* 1989; 7: 119-30.
7. Reiter RJ. Pineal function during aging: attenuation of the melatonin rhythm and its neurobiological consequences. *Acta Neurobiol Exp* 1994; 54: 31-9
8. Pierpaoli W, Regelson W. Pineal control of aging, effect of melatonin and pineal grafting on aging mice. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91:787-91
9. Reiter RJ. Comparative physiology: Pineal gland. *Annu Rev Physiol* 1973; 35: 305 -28.
10. Paglia PE, Valentine WN. Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70(1): 158-59
11. Aebi H. Catalase in vitro. *Enzimol* 1984; 105: 121-26
12. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979) Assay for lipid peroxidation in animals tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95,351-358
13. Akkuş I. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza yayınları 1995: 5, 38, 543, 975.
14. Kovachova S, Ribarov S. Lipid peroxidation in the lung of rats exposed to endotoxin: Effect of Vitamin E Supplementation. *Pharmacology and toxicology*. 1996;79, 177-182.
15. Horwitt MK. Interpretation of requirements for thiamin , riboflavin niacin-tryptophan and vitamin E plus comments on balance studies and vitamin B6 . *Am. J. Clin. Nutr.* 1986;44, 973-985.
16. Vangossum A, Kurian R, Whitwell J. Decrease in lipid peroxidation measured by breath pentane output in normals after oral supplementation with vitamin E. *E. Clin Nutr.* 1988;7:53-57.
17. Oishi FA. Vitamin E-A radicals defense. *New Eng. J. Med.* 1980;303:454-455.
18. Tapıwanashe M, Yoheshkumar SN and Hasler JA. Effects of chloroquine treatment on antioxidant enzymes in rat liver and kidney. *Free Radical Biology Medicine*. 1997; 22:321-327.
19. Lowry OH, Rosebrough NJ, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent *J. Biol. Chem.* 1951;182: 265.
20. Williams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. *Research Veterinary Science*. 1983; 34: 253-256.
21. Paglia PE and Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*1967; 70(1): 158-169.
22. Goldberg DM and Spooner RJ. In *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer HV. Ed.) 3rd edn. Vol 3, 1983; pp. 258-265. Verlag Chemie, Deerfield Beach, FL.
23. Aebi H. Catalase In :Bergmeyer HU, *Methods of enzymatic analysis*. New York:Academic pres , London. 1974; 673.
24. Akgür FM, Kılınç K, Aktuğ T, et al. The effect of allopurinol pretreatment before detorting testicular torsion. *The Journal of Urology*. 1994; 151: 1715-7.
25. Sies H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. *Am. J. Med*, 1991; 3: 31-38.
26. Haber F, Wels JJ. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R.Soc. Lond (A)*, 1984; 147. 332-352.
27. Klebanoff SJ. Oxygen metabolism and toxic properties of phagocytes. *Ann Int. Med*, 1980; 93: 480-489.
28. Fenton HJH. Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J. Chem. Soc. Trans.* 1984; 65: 899- 910
29. Golstein S, meyerstein D. The fenton reagent. *Free Radicals Biol Med* 1993;15: 435-445.
30. Antebi H, Pages N, Zimmerman L. Resistance to oxidation of native lipoproteins and erythrocyte membrane lipids in rats with iron overload. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 1996; 1: 63-8.
31. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. An Overview *Methods Enzymol* 1990; 186: 63-8.
32. Galleno M, Puntarulo S. Effect of mild iron overload on liver and kidney lipid peroxidation. *Brazilian. J. Med. Biol. Res.* 1994; 27: 2349- 2358.
33. Dabbagh AJ, Mannion T, Lynch MS. The effect of iron overload on rat plasma and liver oxidant status in vivo. *Biochemical J*. 1994; 3000: 799-803.
34. Reiter RJ. The mammalian pineal gland: Structure and function. *Am. J. Anat.* 1981; 162: 287-313.
35. Karaca H, Özer ME, Özgüner F, Çalışkan S. Melatonin ve klinik yönleri. *PTT Hastanesi Dergisi*. 1998; 20(2): 118-121.
36. İnan C, Kılınç K, Kotiloglu E, Akman HO. Antioxidant therapy of cobalt and vitamin E in hemostiderosis. *J Lab Clin Med* 1998; 132 (29): 157-65.
37. Galleano M, Puntarulo S. Dietary alpha-tocopherol supplementation on antioxidant defenses after in vivo iron overload in rat. *Toxicology* 1997; 124 (1): 73-78.