

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

138012

VİTİLİGOLU HASTALARIN PLAZMA GLUTATYON
PEROKSİDAZ, GLUTATYON, SELENYUM,
MALONDİALDEHİT VE HİDROKSİPROLİN
DÜZEYLERİNİN SAĞLIKLI BİREYLERLE
KARŞILAŞTIRILMASI

T.C. YERSELİNEBİLİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ
DOKTORA TEZİ

138012

Kadir BATÇIOĞLU
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. İ. Çetin ÖZTÜRK

Malatya-2003

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**VİTİLİGOLU HASTALARIN PLAZMA GLUTATYON PEROKSİDAZ,
GLUTATYON, SELENYUM, MALONDİALDEHİT VE
HİDROKSİPROLİN DÜZEYLERİNİN SAĞLIKLI BİREYLERLE
KARŞILAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

**Kadir BATÇIOĞLU
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. İ.Çetin ÖZTÜRK**

Bu tez, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2002/46 proje numarası ile desteklenmiştir.

Malatya-2003

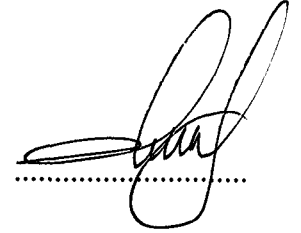
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

İş bu çalışma, jürimiz tarafından Biyokimya Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof.Dr.Engin M. GÖZÜKARA

İMZA


Üye Doç.Dr.Ercüment ÖLMEZ



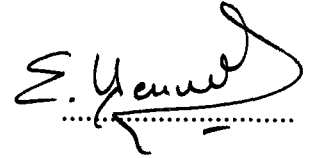
Üye Doç.Dr.Abdullah TULİ



Üye Yrd.Doç.Dr.İ.Çetin ÖZTÜRK




Üye Doç. Dr. Elif Yeşilada



Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

..26..1...4.../ 2003


Doç.Dr.Tayfun GÜLDÜR
Enstitü Müdürü

TEŐEKKÜR

Bu araştırmanın gerçekleşmesinde bana yol gösteren ve ışık tutan danışman hocam sayın Yrd.Doç.Dr. İ. etin ztürk'e, numune temini konusunda büyük kolaylık sağlayan sayın Yrd.Doç.Dr. Ersoy Hazneci'ye, istatistiksel analiz konusunda yardımcı olan sayın Doç.Dr. Metin Genç'e ve anabilim dalı başkanımız sayın Prof.Dr.Engin Gözükara'ya teŐekkürlerimi sunarım. Ayrıca tüm doktora süresince bana destek olan eŐime ve yardımlarını esirgemeyen mesai arkadaşlarıma Őükranlarımı iletirim.



İÇİNDEKİLER

1.	Giriş	1
2.	Genel Bilgiler	3
2.1.	Vitiligo	3
2.1.1.	Otoimmün Teori	6
2.1.2.	Nöral Teori	7
2.1.3.	Otositotoksik Teori	9
2.1.4.	Vitiligoya Biyokimyasal Yaklaşım	10
2.2.	Melanogenezis	12
2.3.	Serbest Radikaller	16
2.3.1.	Genel Tanımı	16
2.3.2.	Serbest Radikallerin Oluşma Şekilleri	17
2.3.3.	Serbest Radikallerinin Biyolojik Kaynakları	19
2.3.4.	Serbest Radikallerin Organizmadaki Etkileşimleri	22
2.3.4.1.	Nükleik Asitlere Etkileri	23
2.3.4.2.	Proteinlere Etkileri	24
2.3.4.2.1.	Hidroksiprolin	24
2.3.4.3.	Lipitlere Etkileri	26
2.3.4.3.1.	Malondialdehit	27
2.3.4.4.	Karbonhidratlara Etkileri	28
2.4.	Organizmanın Antioksidan Savunma Mekanizmaları	28
2.4.1.	Glutasyon	30
2.4.2.	Glutasyon Peroksidaz, EC 1.11.1.9	31
2.4.3.	Selenyum	32
3.	Materyal –Metod	34
3.1.	Numunelerin Toplanması	34
3.2.	Kullanılan Araç ve Gereçler	34
3.3.	Kimyasallar	34
3.4.	Deneysel Prosedür	35
3.4.1.	Protein Tayini	35
3.4.2.	Glutasyon Peroksidaz Aktivite Tayini	37

3.4.3. Glutatyon Düzeyi Tayini	38
3.4.4. Malondialdehit Düzeyi Tayini	41
3.4.5. Hidroksiprolin Düzeyi Tayini	42
3.4.6. Selenyum Düzey Tayini	44
3.5. İstatistiksel analiz	46
4. Bulgular	47
4.1. GSHPx Enzim Aktivitesi Sonuçları	49
4.2. GSH Düzeyleri	50
4.3. GSSG Düzeyleri	51
4.4. GSSG/GSH Oranları	52
4.5. MDA Düzeyleri	53
4.6. Selenyum Düzeyleri	54
4.7. Hidroksiprolin Düzeyleri	55
5. Tartışma	56
6. Sonuç ve Öneriler	66
7. Özet	67
8. Summary	69
9. Kaynaklar	71
10. Özgeçmiş	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil I: Vitiligolu bir çocukta yaygın lezyonlar	3
Şekil II: Lokal vitiligoda göz ve etrafını tutmuş bir lezyon	4
Şekil III: Unilateral vitiligo lezyonu	4
Şekil IV: Bilateral vitiligo lezyonu	5
Şekil V: Katekolaminler ile serbest radikallerin etkileşimleri	8
Şekil VI: BH ₄ siklüsü	12
Şekil VII: Epidermal melanin ünitesi	14
Şekil VIII: Ömelanin ve feomelanin sentez basamakları	15
Şekil IX : Guanin Hidroksilasyonu	23
Şekil X: MDA ve izomerleri	27
Şekil XI: Oksidan sisteme karşı enzimatik savunma	29
Şekil XII: Protein standart grafiği	36
Şekil XIII: GSH Standart Grafiği	39
Şekil XIV : GSSG Standart Grafiği	41
Şekil XV : MDA standart grafiği	42
Şekil XVI : Hidroksiprolin Standart Grafiği	44
Şekil XVII: Selenyum standart grafiği	45
Şekil XVIII: GSHPx enzim aktivite düzeyleri	49
Şekil XIX: GSH düzeyleri	50
Şekil XX: GSSG düzeyleri	51
Şekil XXI: GSSG/GSH oranları	52
Şekil XXII: MDA düzeyleri	53
Şekil XXIII: Se düzeyleri	54
Şekil XXIV: Hidroksiprolin düzeyleri	55

TABLO VE ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo I: Reaktif Oksijen Türlerinin Ortalama Yarı Ömürleri	19
Tablo II: Serbest Radikallerin Organizmadaki Kaynakları	21
Tablo III: One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test sonuçları	46
Tablo IV: “VİTİLİGO GRUBU” genel bilgileri	47
Tablo V: “KONTROL GRUBU” genel bilgileri	48
Tablo VI: GSHPx aktivite düzeyleri	49
Tablo VII: GSH düzeyleri	50
Tablo VIII: GSSG düzeyleri	51
Tablo IX: GSSG/GSH oranları	52
Tablo X: MDA düzeyleri	53
Tablo XI: Selenyum düzeyleri	54
Tablo XII: Hidroksi Prolin düzeyleri	55

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

NADH: Nikotinamid adenin dinükleotid (redükte)

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid 3'-fosfat (redükte)

cAMP: Siklik adenozin monofosfat

PUFA: Poli unsature yağ asidi

MDA: Malondialdehit

CAT: Katalaz, EC 1.11.1.6

SOD: Süperoksit dismutaz, EC 1.15.1.1

GSHPx: Glutatyon peroksidaz, EC 1.11.1.9

GSH: Glutatyon (redükte)

GSSG: Glutatyon (okside)

DTNB: 5,5'-ditiyo bis nitrobenzoik asit

TCA: Trikloro asetik asit.

BSA: Sığır serum albumini

PBS: Fosfat tamponu

Se: Selenyum

Ab: Antikor

Ag: Antijen

Ig: İmmünglobulin

DOPA: Dihidroksifenilalanin

R: Elektrofilik grup

DNA: Deoksiribonükleik asit

RNA: Ribonükleik asit

OH: Hidroksil radikali

O_2^- : Süperoksit radikali

ml: Mililitre

mmol: Milimol

μ l : Mikrolitre

nmol: Nanomol

pmol: Pikomol

μmol : Mikromol

μM : Mikromolar

pH: Hidrojen iyon derişiminin negatif logaritmik değeri

UV: Ultraviyole

GTP: Guanozin trifosfat



1. GİRİŞ

Vitiligo dünyada ve ülkemizde yaygın olarak görülen, melanosit kaybı sonucu gelişen, depigmente maküler lezyonlarla karakterize, spesifik bir deri hastalığıdır (1,2). Vitiligo kelimesi Latince *vitium* (leke) sözcüğünden köken alarak ortaya çıkmıştır (3). Tüm dünya üzerinde lökodermanın en yaygın nedenlerinden biri olarak gösterilen vitiligonun muhtemel insidansı %1-4 arasındadır (4).

Halen etiopatogenezi tam olarak açıklanamamıştır. Yapılan çalışmalar genetik predispozisyon varlığında bir çok presipitan faktörün uyarımı ile hastalığın geliştiği doğrultusunda birleşmektedirler. Genellikle 20 yaşından önce başlar ve insidans yaşla birlikte azalır. Her iki cinsten de hastalığın görülme sıklığı aynıdır. Tüm ırklarda vitiligoya rastlanır (2).

Vitiligonun oluşum mekanizmasını aydınlatılmaya yönelik çalışmalar sonucunda üç temel teori öne sürülmüştür; i) Otoimmün teori, ii) Nöral teori ve iii) Ototoksik teori (5). Melanojenik sistem antijenlerine karşı gelişen antikorların antijenlerle etkileşimleri sonucunda oluşan otoimmün reaksiyonlar ile melanosit yıkımı **otoimmün teorisinin** (i) temelini oluşturmaktadır. **Nöral teori** (ii); sinir uçlarından salgılanan nörokimyasal mediatörlerin melanositlere toksik etki göstermesi temeline dayanır. **Ototoksik teorisinin** (iii) temel dayanağı ise; hidrokinonların (fenol türevleri) pigment hücrelerine in vitro selektif olarak sitotoksik olmasıdır. Melanin sentezi sırasında konsantrasyonu artan ve hücrede biriken bu toksik ara ürünler indol türevlerine ve serbest radikallere dönüşerek melanosit harabiyetine neden olmaktadır (6).

Diğer yandan organizmanın, birçok metabolik yolda ara ürün olarak ortaya çıkan serbest radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak üzere sahip olduğu antioksidan savunma sistemleri mevcuttur. Ototoksik teori uyarınca, vitiligolu hastalarda melanositler içerisinde biriken serbest radikaller de aynı antioksidan sistemler tarafından detoksifiye edilmektedir, özellikle biriken hidrojen peroksit ve diğer organik peroksitler Se bağımlı bir enzim olan glutatyon peroksidaz tarafından detoksifiye edilmektedir. Tümünüyle uzaklaştırılmayan serbest radikaller organizmadaki tüm hücreler ve hücreler arası komponentler üzerinde etki göstererek

yapısal ve fonksiyonel bozukluklara yol açmaktadır. Malondialdehit, serbest radikallerin lipitlerde oluşturduğu oksidatif hasarı gösterirken hidroksiprolin protein oksidasyonu ve kollajen degradasyonu için bir göstergedir (7).

Biz bu çalışmada, vitiligo gelişimi ile serbest radikaller arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla vitiligolu olgularla sağlıklı bireyler arasında, plazma antioksidan sistemin göstergelerinden olan GSH-Px (EC 1.11.1.9), GSSG, GSH, Se, MDA ve hidroksiprolin düzeylerini karşılaştırdık.



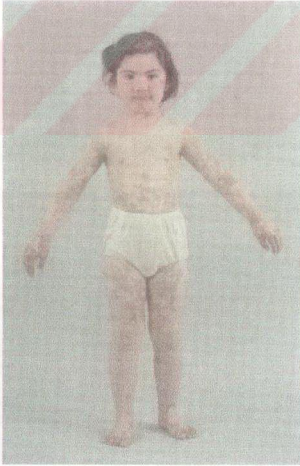
2. GENEL BİLGİLER

2.1. VİTİLİGO

Vitiligo ülkemizde ve dünyada %1-4 arası sıklıkta görülen, fizyopatolojik mekanizması henüz tümüyle aydınlatılmamış ve melanositlerin kaybı sonucu depigmente maküler lezyonların gelişimi ile kendini gösteren akkiz bir deri hastalığıdır(4) Latince de leke anlamına gelen *vitium* kökü ile *-igo* ekinin birleşmesi ile vitiligo ismi türetilmiş, hastalık ismini buradan almıştır (3).

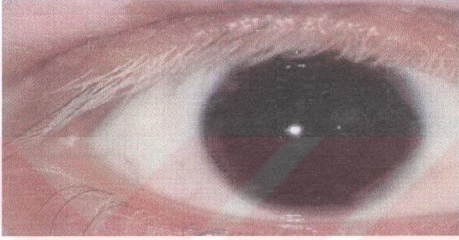
Hastalık kadın ve erkekler arasında bir insidans farkı göstermezken, tropikal bölgelerde ve koyu derili insanlarda vitiligo prevalansı daha yüksek bulunmuştur. Vitiligonun ortaya çıkışı daha çok genç yaşlarda olmaktadır. Olguların yarısına yakınında hastalığın 20 yaş altında ortaya çıktığı ve 10-30 yaş arasında belirgin bir yığılma olduğu bildirilmektedir. Yakın akrabalarında vitiligo bulunanlarda hastalığın ortaya çıkışı daha erken yaşlarda olmaktadır (8).

Hastalık, lezyonun tüm derideki bulunma oranı ve şekli göz önünde tutularak lokal ya da genel diye adlandırabileceğimiz iki gruba ayrılabilir (3).



Genel ya da bir diğer deyişle yaygın vitiligoda hastanın tüm vücut yüzeyine yayılmış lezyonlar gözlenmektedir. Şekil 1'de görüldüğü gibi lezyonlar vitiligolu çocuğun tüm derisine yayılmış haldedir. Genel vitiligoda prognoz daha kötüdür, hastalık hızlı ilerler ve lezyonlar kısa sürede tüm deriyi sarar. Bu hastalarda güneş ışınlarına karşı hassasiyet de lokal vitiligolu hastalara göre daha fazladır.

Şekil 1: Genel vitiligolu bir çocukta yaygın lezyonlar.



Şekil II: Lokal vitiligoda göz bölgesinin, etrafının ve kirpiklerin tutulumu ile karakterize bir lezyon

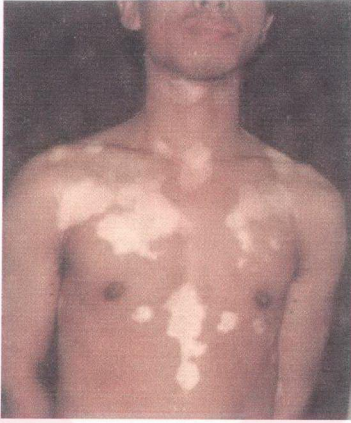
Lokal vitiligoda ise hastalık derinin belli bir bölümünü tutmuştur ve o bölgede yavaş bir şekilde genişlemektedir ya da hastalığın durağan ya da aktif olmasına bağlı olarak stabil kalabilmektedir (9). Şekil II’de göz bölgesinde lezyonu olan lokal vitiligolu bir olgunun lezyonu görülmektedir.

Bir başka yaklaşıma göre ise, lezyonların vücudun ortasından geçtiği farzedilen simetri ekseninin her iki yanında bulunup bulunmaması dikkate alınmıştır. Bu bağlamda eğer vücudun tek bir yanında lezyonlar lokalize olmuşsa buna unilateral lezyonlu vitiligo, eğer lezyonlar vücudun her iki yanında da yer alıyorsa buna da bilateral vitiligo adı verilmiştir(9).



Şekil III: Unilateral vitiligo bir olgunun lezyonu.

Yandaki şekilde vücudunun sol yanında lezyon bulunmayan ancak sağ omuz ve kol bölgesinde lokalize olmuş lezyonları görmekteyiz.



Şekil IV: Bilateral vitiligo bir olgunun lezyonu (1).

Yandaki şekilde vücudun her iki yanında kaba bir simetri gösteren vitiligo lezyonları görülmektedir.

Vitiligo gelişiminde genetik faktörlerin kısmen etkili olabileceği öne sürülmüştür. Epidemiyolojik çalışmalar, vitiligolu hastaların dörtte birinin akrabalarında da hastalığın tespit edildiğini göstermiştir.

Vitiligo hastalarında ve ailelerinde otozomal dominant veya otozomal resesif bir genetik geçişin olmadığı gösterilmiştir. Ancak bu hastalarda olgunlaşmamış eritrositler üzerinde kromozom 1 üzerindeki Rh (Rhesus factor), kromozom 2 üzerindeki ACP 1 (acid phosphatase gene) ve kromozom 4 üzerindeki MN (micronucleus) bölgeleri gibi çok sayıda otozomal alan tespit edilmiştir. Bu da multifaktöryel genetik geçişi desteklemektedir. Vitiligonun genetik aktarımının, tek lokuslu basit Mendelien geçişe uymayan en az dört veya daha fazla sayıda resesif bağımsız allelik yapıda gene bağlı olabileceği bildirilmiştir. Ailesinde vitiligo hastalığı olan bireylerin hastalığa yakalanma olasılığı kontrol grubuna göre dört kat daha yüksek bulunmuştur (10,11).

Vitiligo etiopatogenezi ile ilgili farklı teoriler öne sürülmüştür ancak en çok üzerinde durulan üç teori hala güncelliğini korumaktadır. Bu teoriler; humoral veya hücre sel immünolojik olayların sonucunda melanositlerin tahrip olduğu görüşünü ortaya koyan otoimmün teori (12), nöral mediatörlerin melanositler üzerindeki tahrip edici etkilerine dayanan nöral teori (13) ve melanin sentezi ile ilişkili metabolik yollardaki düzensizlikler sonucu derişimleri artan ara ürünlerin ve metabolitlerin toksik etki göstererek melanositlerin tahrip olmalarına neden olduğunu ileri süren otositotoksik teoridir (14). Daha sonraki dönemlerde ortaya atılan ve her üç teorisinin de etkili olduğunu savunan birleşik teori pek çok araştırmacı tarafından destek bulunmuştur (15).

2.1.1. OTOİMMÜN TEORİ

Vitiligo gelişimi ile immün sistem arasında organik bir bağ olduğunu düşündüren çok sayıda klinik gözlem ve laboratuvar çalışması vardır. Klinik olarak, vitiligo ile beraber bir çok otoimmün hastalığın varlığı, vitiligo lezyonlarında inflamatuvar ve immunolojik olayların gelişimi, dolaşımında otoantikörlerin (oto-ab) yüksek düzeyi, humoral ve hücresele immün sistem bozukluklarının bulunması bu hipotezi destekler gözükmeştir. Otoimmunizasyon gelişiminde primer olarak organizmada immunolojik mekanizmaların oluşumu sırasında meydana gelen değişikliklerin rol oynadığı ve melanojenik sistemin bu değişikliklere bağı antijenik özellik kazandığı, oto-ab varlığını açıklamada kullanılan bir hipotezdir. Ancak hasarlanan melanositlerden salgılanan antijenik özellik taşıyan maddelere karşı gelişmiş akkiz bir immunizasyonun da olabileceği düşünölmektedir (16). Oto-ab bağımlı hücresele sitotoksosite gelişimi ab'ların hücre yüzey ag'lerine bağlanmasını gerektirmektedir. Deneysel vitiligo hayvan modellerinde melanositlere karşı oto-ab varlığı ilk olarak Smyth cinsi tavuklarda gösterilmiştir (12). Vitiligolu olgularda da, serumda melanosit yüzey ag'lerine karşı gelişmiş oto-ab varlığı gösterilmiştir. Hastaların serumlarında bulunan bu ab'ların in vitro ortamda kompleman aracılı sitotoksosite ile selektif olarak melanositleri öldürdükleri ileri sürölmektedir. Hastalık aktivitesi ile ab düzeyleri arasında bir korelasyon olduğu da saptanmıştır. Melanosit ve keratinositlere bağı immunoglobölin (Ig) G depolanması indirekt immunofloresan yöntemlerle gösterilmiştir. Keratinositlere bağı IgG birikimleri dejenere keratinositlerin varlığı ile koinsidans göstermeyecek şekilde dağılım göstermektedirler. Vitiligolu hasta örneklerinde yapılan incelemelerde melanositlere karşı şiddetli sitotoksik etki tespit edilirken keratinositlere karşı bu etkinin daha zayıf olduğu saptanmıştır (17,18).

Al Badri ve arkadaşları (19), yaptıkları çalışma sonucu elde ettikleri bulgulardan yola çıkarak lenfosit aracılı melanosit yıkımı görüşünü ortaya koymuşlardır. Vitiligolu hastalarda lezyon ve çevresinde belirgin olarak T lenfosit ağırlıklı epidermal ve yüzeysel dermal infiltrasyon saptamışlardır. Özellikle CD3, CD4 ve CD8 düzeylerinde artışın belirgin olduğunu rapor etmişlerdir.

2.1.2. NÖRAL TEORİ

Nöral teori, sinir uçlarından salgılanan nörokimyasal mediatörlerin melanosit hücrelerini tahrip ettiği görüşünden dayanak almaktadır. Vitiligo lezyonlarının paralizili ekstremiteler üzerinde yayılmaması, viral ensefalit, multipl skleroz ve Horner sendromu ile birlikte vitiligo gelişen olguların varlığı bu teoriyi destekleyen bulgulardır. Ayrıca, sıklıkla emosyonel stres sonrası başlaması ve segmental tutulumun olması da bu teoriyi güçlendirmektedir (13).

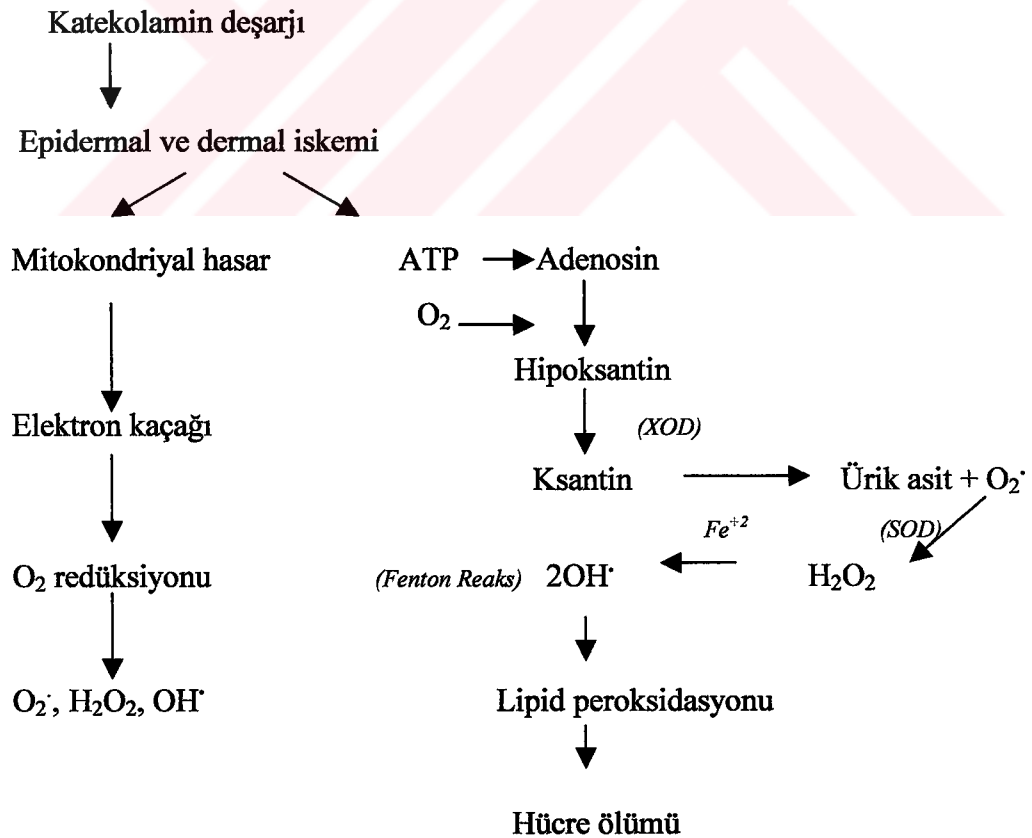
Melanositler de, sinir hücreleri gibi embriyolojik olarak nöral yaraktan köken alırlar. Vitiligo maküllerinde, yanındaki normal deriyle kıyaslandığında terleme daha fazla, lokal ısı daha yüksek, ve kanama zamanı daha uzundur. Ayrıca lezyon ortasında ve periferinde otonomik sinir hücrelerinde dejeneratif ve rejeneratif değişiklikler ve dermal Schwann hücrelerinin %75'inde basal membranda kalınlaşma gözlenmiştir. Hastaların yarısında minör aksonal hasar olduğu bildirilmiştir (1).

Bu teoriyi destekleyen biyokimyasal veriler de bulunmaktadır. **Asetilkolinin** depigmentasyona neden olduğu ve lezyon kenarlarındaki melanositlerde dopa oksidaz aktivitesinin baskılandığı gösterilmiştir. **Asetil kolin esteraz** aktivitesi repigmente deride görülürken depigmente deride saptanamamıştır (20). Tirozin, hem epinefrin hem de melanin sentezinde bir substrattır. **Epinefrin** ratlara enjekte edildiği zaman depigmentasyona neden olmaktadır. Epinefrin ve melanin prekürsörleri arasındaki kimyasal benzerlikler bulunmaktadır ve epinefrin oluşumu esnasında sinir uçlarından salınan çeşitli ara ürünler melanositler üzerinde tahrip edici etkiye sahip olabilirler. Depigmente alanlardaki keratinositlerde, beta-adrenerjik reseptörlerle ilişkili **kalsiyum** transportunda defekt saptanmıştır (21). Bunun sonucunda, bu hücreler presinaptik sinir sonlanmasından bağımsız olarak katekolamin sentezleyebilirler. Ayrıca vitiligolu olgularda epidermal ve plazma **norepinefrin** düzeyleri yüksek bulunmuştur (22). Melanin biosentezinin regülasyonunda kofaktör olan **6-tetra hidrobipterin** (6BH₄), L-fenilalaninden L-tirozin dönüşümünde hız kısıtlayıcı bir kofaktördür. Aktif vitiligolu hastaların epidermisinde bipterin düzeyi artmıştır, bu da hidrojen peroksit birikimine neden olur. Hidrojen peroksit (H₂O₂) güçlü bir peroksidatif ajandır, ani artışı sitotoksiktir ve depigmentasyona neden olur (14). Etkilenen alanlarda epinefrin düzeyleri belirgin

olarak azalmıştır. Norepinefrin düzeyleri ise lezyon olan bölgelerde daha şiddetli olmak üzere belirgin bir şekilde artmıştır. Epinefrin plazma düzeyi normalden norepinefrinin plazma düzeyinde de önemli ölçüde artış saptanmıştır (22). Bu durumun muhtemel nedeni vitiligo alanlardaki melanosit ve keratinositlerde monoamin oksidaz aktivitesinin artması sonucu norepinefrinin 4 kat fazla sentez edilmesi, epinefrin sentezinin ise azalmasıdır (23).

Vitiligo hastalarının lezyon alanlarının kenarında tümör nekroz faktör- α (TNF- α), hücre içi adhezyon molekülü (ICAM-1) ve interferon gama düzeyleri yüksek bulunmuştur. Bir in vitro çalışmada melanositlerde nörotensin, nöropeptid, uyarılmış TNF- α düzeyleri normale göre 500 kat ve UV-B sonrasında göre ise 50 kat daha fazla bulunmuştur, bu da vitiligo ile nörojenik reaksiyonlar arasındaki ilişki olasılığını kuvvetlendirmektedir (24).

Şekil V. Katekolaminler ile serbest radikallerin etkileşimleri



2.1.3. OTOSİTOTOKSİK TEORİ

Vitiligo gelişimini açıklamak üzere ortaya atılan teorilerden biri de otositotoksik teoridir. Bu teori temelde vitiligolu olgularda bozulan metabolik mekanizmalarla birlikte oksidan/antioksidan dengenin de bozulması sonucunda oksidan ajanların yeterince detoksifiye edilememesi ile başlayan oksidatif hasarın vitiligo patogenezinde etkili olması şeklinde özetlenebilir. Schallreuter ve arkadaşları (25) vitiligolu olgularda keratinositlerde önemli antioksidan kapasiteye sahip olan tioredoksin redüktaz enzim aktivitesini sağlıklı bireylere oranla düşük bulmuşlardır. Araştırmacıların bir başka önemli bulguları ise, vitiligolu keratinositlerde kalsiyum konsantrasyonunun yüksek olduğunu ve yüksek kalsiyum konsantrasyonunun tioredoksin redüktaz enzim aktivitesini inhibe ettiğini rapor etmeleridir (26).

Ayrıca, melanin sentezi sırasında melanositler için oldukça toksik olan tirozin analogları ve araürünler ortaya çıkar. Oluşan ara ürünlerden özellikle dihidroksifenilalanin (DOPA) ve dopakrom 5,6-dihidroksiindol melanositler içerisinde birikir ve serbest radikal konsantrasyonunun artmasına sebep olurlar (27). Artan serbest radikaller oldukça reaktif olup saniyenin milyonda biri ile ifade edilebilecek yarıömre sahip moleküllerdir. Bu moleküller tüm hücre içi organellere, lipidlere, proteinlere ve nükleik asitlere saldırarak hücrenin normal morfolojisinin ve fonksiyonlarının bozulmasına neden olurlar. Özellikle nükleik asitlerde oluşabilecek hasarlar genetik defekt ile sonuçlanabilir ve hücrenin sentez ettiği tüm metabolitlerde kendini gösterebilir ya da hücrenin ölümüyle sonuçlanabilir (28).

Vitiligo gelişimi ile ilişkilendirilen moleküllerden biri de melatonindir. Melatoninin, tirozinaz enzim aktivitesini inhibe etmeden melanin sentezini inhibe ettiği ileri sürülmektedir (29). Sentezin tirozinaz enziminin rol aldığı basamaktan sonra inhibe edilmesi melanositler içinde önemli miktarda ara ürün ve serbest radikal oluşumuna neden olur. Bu da melanosit harabiyeti ve yıkımı ile sonuçlanır. Bu yaklaşım otoimmün teori ile de ilişkilidir. Şöyle ki; bozulmuş melanogenezis sonucu meydana gelen başkalaşmış melanositin kendi içindeki maddelere veya değişime uğramış yüzey antijenlerine karşı otoimmün yanıtı indüklediği ileri sürülmektedir (18).

Otositotoksik teoriyi destekleyen yaklaşımlardan biri de vitiligolu hastalarda

hastalığın ortaya çıkışından bir süre önce yaşanmış olan ağır psikolojik stres ya da çeşitli travma öykülerinin bulunmasıdır (30). Yoğun stres presinaptik hücrelerden katekolamin salınımını artırır, artmış katekolamin sonucu vazokonstrüksiyon ve buna bağlı olarak epidermis ve dermiste hipoksi gelişir ve ardından reoksijenasyon meydana gelir. Bu da serbest oksijen radikallerinin ve toksik moleküllerin konsantrasyonlarının artmasına neden olur (31). Oluşan serbest oksijen radikallerinin reaktivitesi ortamdaki antioksidan kapasite ile sınırlandırılabilir. Schallreuter ve arkadaşları vitiligolu hastaların lezyonlu ve normal derilerinde epidermiste peroksidatif ajanların detoksifikasyonundan sorumlu bir enzim olan katalaz aktivitesinin azaldığını saptamışlardır (32). Yetersiz katalaz aktivitesi hücre içinde hidrojen peroksit birikimine ve hücrenin peroksidatif hasara maruz kalmasına neden olur. Özellikle hücre membranında yapısal ve fonksiyonel işlev gören membran lipidleri çok kolay peroksidasyona uğrayabilen moleküllerdir. Membranda meydana gelen lipid peroksidasyonu sonucu membran yapısı ve hücre bütünlüğü bozularak hücrenin ömrü kısalır. Passi ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmalarında vitiligolu hastaların epidermisinde ubikinon, vitamin E, glutatyon ve poliansature yağ asidi düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalmış olduğunu saptamışlardır (33). Bu bulgular vitiligolu olgularda antioksidan sistemin zayıflığını ortaya koymakta olgularda deride oluşacak oksidatif stres durumunda detoksifikasyonun yetersiz olması ve hücrelerin patolojik etkilenimlerine neden olacaktır. Oksidatif strese en duyarlı hücrelerden biri olan melanositler bu olaydan en fazla ve ilk etkilenen hücre olarak karşımıza çıkmaktadır.

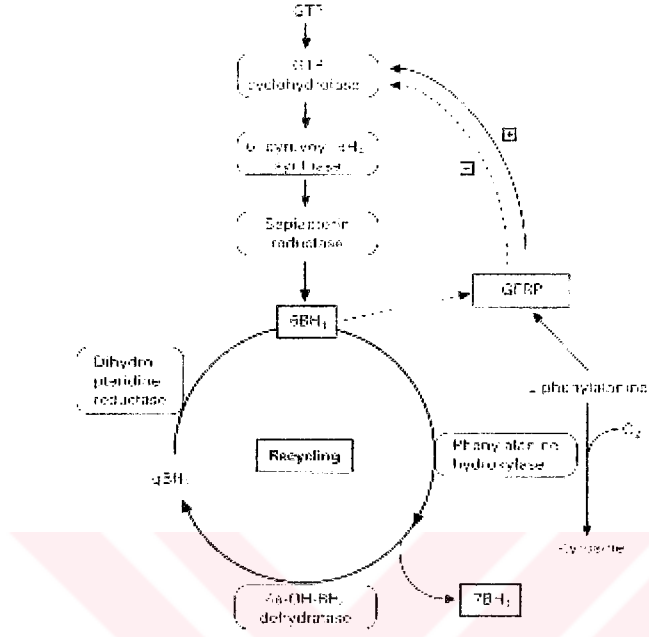
2.1.4. VİTİLİGOYA BİYOKİMYASAL YAKLAŞIM

Vitiligo patogenezi ile ilgili olarak tespit edilen ve patogenezin aydınlatılması yolunda önemli mesafe kat edilmesini sağlayan ilk dikkate değer bulgu tetrahidrobiopterinin de novo sentezindeki bozukluktur. (6R)-L-eritro 5,6,7,8-tetrahidrobiopterin (6BH₄) aromatik aminoasitlerin (fenilalanin, tirozin, triptofan gibi) hidroksilasyonu gibi değişik hücre metabolik yollarda esansiyel kofaktör (elektron sağlayıcısı) olarak rol oynar (34). Ayrıca NOS (nitrik oksit sentaz) da aktivite gösterebilmek için 6BH₄'e gereksinim duyar (35). Epidermiste siklus şöyle cereyan etmektedir; (6R)-L-eritro 5,6,7,8-tetrahidrobiopterin, fenil alaninin moleküler oksijen varlığında PAH (fenilalanin hidroksilaz) aracılığıyla tirozine

dönüşümünde major kofaktördür. Bu esnada elektron sağlayıcı olarak rol alan (6R)-L-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterin, 4a-karbinolamin (4a-OH-BH₄)'e dönüşür, oluşan bu ara ürün spesifik bir dehidrataz enzimi olan 4a-OH-BH₄ dehidrataz ile kinonoid dihidropterin (qBH₂)'e dönüşür, bunun da bir ileri redüksiyonu sonucu 6BH₄ yeniden oluşur. Kofaktörün bu metabolik yolla geri kazanımının dışında bir de GTP'den GTP siklohidrolaz I enzimi ile kontrol edilen ve normal epidermal hücrelerde tirozin düzeylerini gereksinim doğrultusunda regüle eden 6BH₄ de novo sentez siklüsü söz konusudur. Ve araştırmacılar vitiligoda GTP siklohidrolaz I enziminin regülasyonunun bozulduğunu ve bu bozukluğun sonucunda GTP siklohidrolaz I enzimin aşırı çalışması nedeniyle 6BH₄'ün gereğinden fazla sentez edildiğini ve epidermal birikiminin söz konusu olduğunu rapor etmişlerdir (36,37). 6BH₄ sentezi sırasında belli oranlarda ve non enzimatik olarak 7BH₄ de oluşmaktadır. 7BH₄'ün zamana bağımlı olarak konsantrasyonu artmakta ve bir araştırmacının yaptığı çalışma bulgularına göre konsantrasyonu 8x10⁻⁶ M'a kadar yükselmektedir. Normal hücrelerde fizyolojik konsantrasyonlarda (< 10⁻⁷ M) oluşan 7BH₄ herhangi bir risk oluşturmazken 8x10⁻⁶ M ve daha üzerindeki derişimlerinin PAH enzimi için inhibitör etki gösterdiği ve bu inhibisyonun kompetitif inhibisyon olduğu tespit edilmiştir (38).

Fenilalanin'in GTP siklohidrolaz I enzimi üzerine pozitif feedback etkisi söz konusudur. GTP siklohidrolaz I enziminin ilk indüksiyonunun neden kaynaklandığı bilinmemektedir -ve bu yöndeki araştırmalar bütün hızıyla sürmektedir – ancak indüksiyon sonucunda derişimi artan 6BH₄ ve non enzimatik yolla oluşan 7BH₄'ün yüksek konsantrasyonları fenilalanin hidroksilaz'ı inhibe etmekte (39), bu inhibisyon ile fenilalanin'in tirozin'e dönüşümü önemli ölçüde yavaşlamakta ve ortamda fenilalanin birikimi söz konusu olmaktadır. Yüksek konsantrasyonlara ulaşan fenilalanin, GTP siklohidrolaz I enzimi üzerinde pozitif feedback etki göstermek suretiyle 6BH₄ ve 7BH₄ üretimini daha da artırmaktadır ve vitiligoda bu kaskat böylece devam etmektedir. Fenilalaninin pozitif feedback etkisi ise GFRP (GTP cyclohydrolase I feedback regulatory protein) adı verilen küçük bir protein molekülü ile kompleks oluşturması ve bu kompleks molekülün enzime allosterik olarak bağlanması suretiyle gerçekleşir (40).

Şekil VI: BH₄ siklüsü (9)



Aynı siklüste düzensiz çalıştığı tespit edilen bir diğer enzim de 4a-OH-BH₄ dehidrataz enzimidir. Araştırmacılar bu enzimin de aktivitesinde azalma olduğunu ve bu azalmanın sonucunda ortamda kinonoid dihidrobiopterin birikimi, nonenzimatik 7BH₄ oluşumu ve hidrojen peroksit birikimi meydana geldiğini saptamışlardır. Çalışmalar epidermal hidrojen peroksit birikiminin 10⁻⁷ M derişim düzeyine

kadar yükseldiğini göstermiştir ki bu düzey hidrojen peroksitin sitotoksik etkilerinin gözlenebileceği derişimin çok üzerindedir (27,28). Bu noktada şunu söyleyebiliriz ki, epidermal hidrojen peroksit birikiminin major kaynaklarından birisi aşırı sentezi sonucu yüksek konsantrasyonlara ulaşan 6 ve 7 tetrahidrobiopterinlerin moleküler oksijen varlığında UV ışınları etkisiyle oksidasyona uğramaları ve bu oksidasyon süresince yan ürün olarak sürekli hidrojen peroksit oluşmasıdır (41).

2.2. MELANOJENEZİS

Melanin biyosentezi ve pigment hücrelerinde meydana gelen reaksiyonların mekanizmaları 1920'lere kadar bilinmemekteydi. Raper ve arkadaşları (42) 1928 yılında yaptıkları çalışma sonucunda omurgalı canlılarda pigment hücrelerinin varlığından ve tirozinden başlayan melanin sentez mekanizmasından söz etmişlerdir. Daha sonraki çalışmalarla melanositler ve melanogenez hakkında çok daha ayrıntılı bilgiler elde edilmiştir.

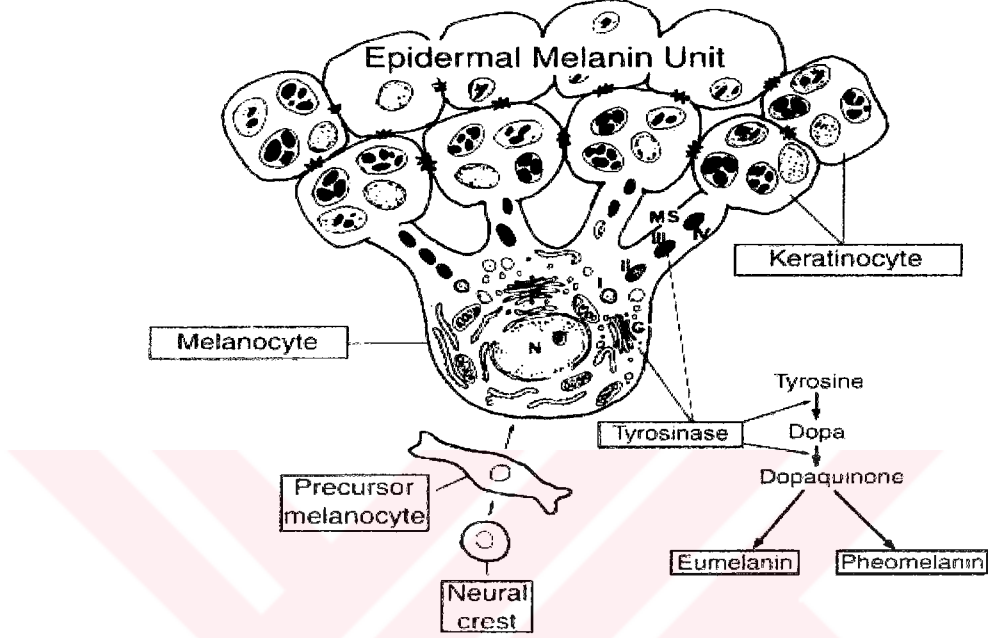
Bu gün artık bilinmektedir ki; insan epidermal melanositleri, melanojenik enzimlerin rol aldığı ve tirozinden başlayıp melanin sentezi ile sonlanan bir dizi

reaksiyon zincirine sahiptir. Bu sentez yoluna kısaca melanogenez adı verilmektedir. Melanositler, embriyojenik nöral yarıktan köken alan melanoblastların epidermise göçü ve epidermal melanositlere dönüşümü ile oluşurlar. Epidermis dışında kıl folikülü matriksinde, nadiren dermiste, mukozalar, leptomeninksler, gözün uvea tabakasında, kulakta koklear bölgede, stria vaskülariste ve vestibular labirentte de melanosit bulunur. Epidermal melanositlerin her biri dendritleri aracılığı ile yaklaşık 36 keratinosite komşuluk etmektedir (43).

Melanin sentezi, melanositler ve keratinositler içerisinde yer alan melanozom üniteleri içerisinde gerçekleşir. Sentezlenen melanin, deri renginin temel belirleyicisi olup melanozomların tipi, boyutu, rengi, biçimi ile melanosit ve keratinositler arasındaki dağılımından etkilenmektedir.

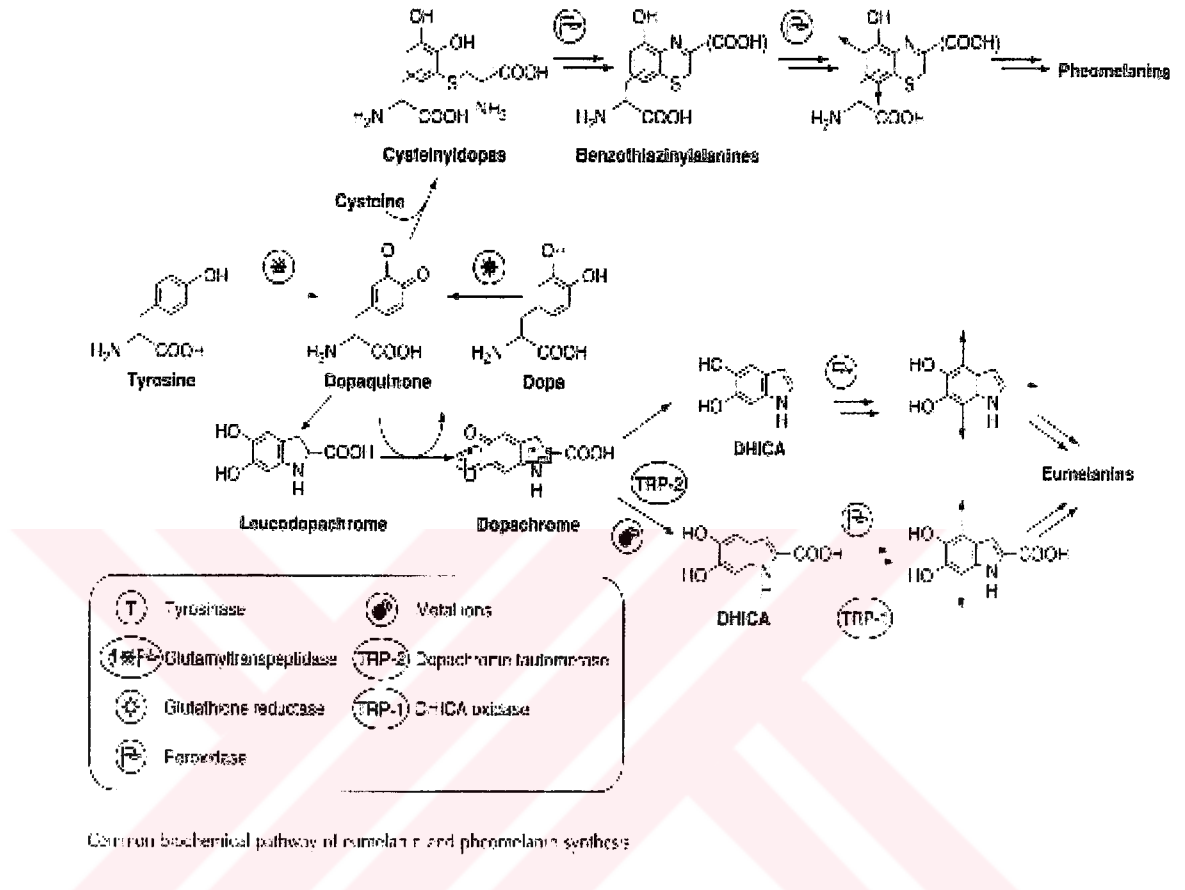
Melanozomlar oldukça organize organellerdir ve fiziksel yapıları elips şeklindedir. Normal deride, melanin konsantrasyonu oldukça yüksektir ve genellikle ultraviyole ışınları önemli ölçüde absorbe eden polimerik yapıda ve yapısal proteinlere bağlı halde bulunurlar. Memeli melanin pigmentleri iki kimyasal yapıda bulunmaktadır; ömelanin, kahverengi bir polimerdir ve tirozinin, alkali ve düşük çözünürlüğe sahip kromofor bir yapıya dönüştürülmesi ile ortaya çıkar. Feomelanin, tirozinin tirozin-melanin sentez yolunda dopakinonun sistein ya da glutatyon ile birleşerek sisteinildopa üzerinden sarı-kırmızımsı bir pigmente dönüşmesi ile meydana gelir. Bu dönüşüm esnasında sistein ya da glutatyon katılımından sonra katılma ürünü kinona oksitlenir, halka oluşturur ve indol-5,6-kinon ile birlikte feomelanin oluşumuna yönelir. Bazı kişilerin sarı ve kızıl saçlarından sentezin bu yola sapması sorumludur (5,44).

Şekil VII. Epidermal melanin ünitesi (1).



Melanogenez boyunca, tirozinden DOPA ve DOPA'dan dopakinon dönüşümleri bakır bağımlı bir aerobik oksidaz olan (fenol oksidaz) tirozinaz tarafından katalizlenir (45). Sentezin ilk iki adımı yani DOPA ve dopakinon oluşumu birbirine sıkı bağlantılıdır. İndol oluşacak şekilde halka kapanması kinoid sisteme bir katılma ve indolkinonun melanine polimerizasyonu termodinamik olarak istemli yürüyen basamaklardır. Sentezlenen melanin çoğunlukla ömelanin ile feomelaninin belli oranlarda karışımlarından oluşmuştur ve genelde alınan melanin örnekleri analiz edildiğinde farklı oranlarda ömelanin ve feomelanin içerdikleri görülmüştür

ŞekilVIII. Ömelanin ve feomelanin sentez basamakları (1).



2.3. SERBEST RADİKALLER

2.3.1. GENEL TANIMI

Atom ya da moleküllerin sahip olduğu elektronlar belirli enerji düzeylerine ait ve orbital adı verilen uzaysal hacimler içerisinde yer alırlar. Her bir orbital bünyesinde maksimum iki elektron barındırır ve bu elektronların spinleri birbirine zıttır. Atom ya da moleküller kovalan bağ oluşumu sırasında son yörüngelerindeki elektronların bir yada ikisini kullanarak bağ yaparlar. Bu sayede genelde son yörüngelerinde yer alan orbitallerdeki çiftleşmemiş elektrondan kaynaklanan kararsızlıklarını gidermiş olurlar. İşte son yörüngesindeki orbitallerinde çiftleşmemiş elektron içeren atom veya moleküllere serbest radikal adı verilir. Sembolize edilirken atom ya da molekül formüllerinin yanına bir nokta konarak yazılır. Örneğin hidroksil radikali OH \cdot şeklinde gösterilir (46).

Bu moleküller organik ya da anorganik yapılı moleküller olabilir. Stabil olmayıp sisteme yoğun bir kararsızlık veren yük dengesizliklerini giderebilmek için yani elektron konfügrasyonlarını pozitif yüke dengeleyebilmek için oldukça aktif bir yapı özelliği gösterirler. Radikallerin aktif olma özelliği başlıca difüzyon mesafesi ile ilişkilidir. Ancak hidroksil radikali (OH \cdot) son derece yüksek aktif özellikte olduğundan genellikle meydana geldiği hücrenin bulunduğu bölgeden daha uzağa diffüze olamadan oluştuğu yerde derhal reaksiyona girer. Buna karşılık süperoksit radikali, hidroksil radikalinden daha az reaktif olduğu için açığa çıktığı hücre bölümünden daha uzak noktalara rahatlıkla diffüze olabilir. Hidrojen peroksit ise kendisi doğrudan radikal olmamakla beraber çok önemli bir serbest radikal kaynağı ve peroksidatif bir ajandır. Bu molekül mitokondriyal membranlar, peroksisomal membranlar ve plazma membranından kolayca diffüze olarak toksik etkisini açığa çıktığı noktadan daha uzak hücre bölümlerinde gösterebilir (47,48).

Çok kısa yaşam süreleri olan serbest radikaller tüm hücre bileşenleri ile kolayca etkileşebilme özelliğine sahiptirler. Hücrenin tüm fraksiyonlarında oluşabilme özelliğine sahiptirler. Radikal oluşumu hücre tiplerine göre değişiklik göstermesine rağmen tüm aerobik hücrelerde belirli düzeylerde radikal oluşabilmektedir.

Serbest radikallere yaygın birkaç örnek olarak merkezinde oksijen bulunan süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$), kükürt bulunan tiyil radikali (RS^{\cdot}), karbon bulunan triklorometil (CCl_3^{\cdot}), hidroksil radikali (OH^{\cdot}) ve çiftleşmemiş elektronun her iki atom arasında delokalize olduğu nitrik oksit (NO^{\cdot}) verilebilir (7).

Oksijenin dış moleküler yörüngesine bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektronların eklenmesi yaygın şekilde bulunan bu molekülü güçlü bir toksine, bir serbest oksijen radikaline dönüştürür. Biyolojik kaynaklı serbest radikallerin önemli bir bölümü reaktif oksijen türevleridir. Bu moleküller, oksijenin belirli koşullarda kısmen indirgenmesi sonucu oluşan çok kısa ömürlü ve güçlü oksidan nitelikli oksijen metabolitleri olan hidrojen peroksit, süperoksit anyonu, singlet oksijen ve hidrojen peroksittir (49).

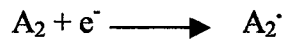
Aslında normal hücre biyokimyasının bir parçası olan serbest radikaller, zararlı etkilerinin yanı sıra, transport ve hücre büyümesinin regülasyonu gibi birçok normal hücresel mekanizmada rol oynarlar.

2.3.2. SERBEST RADİKALLERİN OLUŞMA ŞEKİLLERİ

Serbest radikaller genel olarak iki temel kimyasal yol üzerinden meydana gelirler. Bunlar;

A) Elektron Transferi:

Herhangibir moleküle, tek elektron eklenmesi ya da o molekülden tek elektron uzaklaştırılması sonucu serbest radikal oluşur.



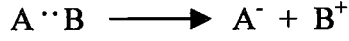
B) Homolitik Parçalanma:

Birbiri ile kovalent bağlı farklı iki atom, bağı oluşturan her bir atom birer elektronu kendi bünyesinde tutarak yapıdan ayrılırsa yani bağ koparsa oluşan komponentlerden her biri bir radikal oluşturur.



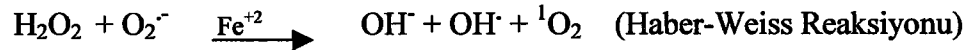
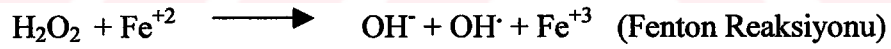
Bunların dışında moleküler bağ parçalanmasının bir diğer türü de heterolitik

parçalanma olup, bağı oluşturan atomlardan biri her iki elektronu kendi üzerine alarak yapıdan ayrılır ve iki ayrı iyon oluşur.

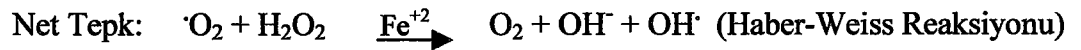
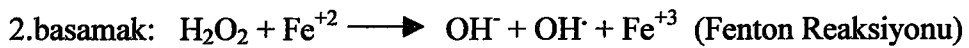
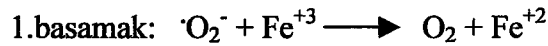


Metabolik olayların normal sıralanımında oksijen toplam dört elektron kabul edebilir. Moleküler oksijene bir elektron eklenmesi süperoksit anyonu, proton katılımı beraberinde iki elektron eklenmesi hidrojen peroksit, bu yapıya üçüncü bir elektronun eklenmesi hidroksil radikali ve hidroksil radikaline dördüncü elektronun eklenmesi su oluşumuna neden olur. Oksijen kökenli ara ürünlerin birbirleri ile ilişkili oldukları bilinmektedir. Bu moleküllerin göreceli konsantrasyonları endojen gidericilerin ve katalitik metal iyonların varlığına bağlıdır. Süperoksit anyonu sulu ortamda fazla reaktif değildir, yarı geçirgen hücre membranından kolaylıkla geçebilir, muhtemelen iyon kanalları aracılığıyla intrasellüler kaynağından dışarı difüze olmaktadır (50).

Serbest oksijen radikalleri arasında en reaktif ve en sitotoksik olanlar hidroksil radikali ve singlet oksijendir. Bu iki radikal serbest demir iyonu varlığında Fenton ve Haber-Weiss Reaksiyonları aracılığıyla meydana gelir (51).



Haber-Weiss Reaksiyonu Fenton Reaksiyonu'nu da içeren ve süperoksit anyon radikalinin de reaktan olarak rol aldığı bir tepkimedir,



Tablo I: Reaktif Oksijen Türlerinin Ortalama Yarı Ömürleri:

Molekül Formülü	Molekülün Adı	Yarı Ömür (sn)
HO·	Hidroksil radikali	10 ⁻⁹
RO·	Alkoksil radikali	10 ⁻⁶
ROO	Peroksil radikali	7
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit	Ortama bağlı olarak değişir
O ₂ ·	Süperoksit radikali	Ortama bağlı olarak değişir
O ₂ ¹	Singlet oksijen	10 ⁻⁶
Q	Semikinon	Günler
NO·	Nitrik oksit	1-10
ONOO·	Peroksinitrit	0,05-1

2.3.3. SERBEST RADİKALLERİN BİYOLOJİK KAYNAKLARI

Oksijen tüketen aerobik organizmalar için serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir. Normal metabolizmada moleküler oksijenin %98'i oksidaz enzimler aracılığıyla suya indirgenirken geriye kalanı oksijenaz enzimler tarafından potansiyel toksik reaktif türlere dönüştürülür (49).

Oksijenin bir elektron alarak redüksiyonu ve aerobik hücrelerin enzimatik oksidasyonu sırasında negatif yüklü bir ara ürün olan, son yörüngesinde çiftleşmemiş elektron içeren süperoksit anyon radikali açığa çıkar. Sitoplazmadaki oksijenin başlıca kaynağı endoplazmik retikulumdaki sitokrom P450 sistemidir. Çok toksik etkili olmayan süperoksit radikali asıl etkisini daha reaktif metabolitlerin açığa çıkmasına yol açarak gösterir (49).

Hidrojen peroksit gerçek bir serbest radikal değildir ancak özellikle yüksek konsantrasyonlarda güçlü reaktif oksijen türlerinin ortaya çıkmasına yol açarak toksik etki gösterir (51).

Oksijenin protonlanmasıyla da hidroperoksil radikali ($\text{HO}_2\cdot$) oluşur. Bu radikalin herhangi bir biyolojik sistemde sitotoksik rolü kanıtlanmamış olmasına rağmen uzun yarı ömrü sayesinde biyolojik membranları kolayca geçebilmesi ve yağ asitleriyle direk etkileşime girebilmesi yönünden önemli olabileceği düşünülmektedir.

Diğer bir fizyolojik serbest radikal nitrik oksittir ($\text{NO}\cdot$), kan basıncını düzenleme ve hücreler arası sinyal oluşumu ve iletimi gibi yararlı fonksiyonlarının yanı sıra yüksek konsantrasyonlarda özellikle peroksinitrite dönüşmek suretiyle toksik etkili olabilmektedir (52).

Vücutta üretilen radikaller her zaman tehlikeli kimyasal türler olarak değerlendirilmemelidir. Oksijenin biyokimyasal tepkimelerde kullanılması için reaktif formlarına çevrilmesi zorunludur.

Örneğin,

- * Steroid yapıdaki çok sayıdaki bileşiklerin, eikozanoidler gibi biyolojik aktif moleküllerin sentezi
- * Ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu
- * Çok sayıdaki oksidaz ve hidroksilaz enzimlerinin etkileri için
- * Sitotoksik etkilere sahip hücrelerin fonksiyonları için radikal yapımı olmazsa olmaz bir koşuldur.
- * Fizyolojik yaşlanmanın gerçekleşmesini sağlamak

Yaşam için mutlaka gerekli olan oksijen, canlıların yaşamının sona erdirilmesinde de etkili olan faktörlerin başında gelir. Canlıların yaşlanması ve birçok patoloji radikallerin neden olduğu kalıcı hasarların bir birikimi olarak değerlendirilmektedir.

İzole edilmiş mitokondrilerde yapılan çalışmalarda organizmanın temel radikal kaynağının iç membranda yerleşen solunum zinciri olduğu anlaşılmıştır. Normal

hidrojen peroksit ve süperoksit yapımı mitokondriyal oksijen sarfının yaklaşık %1-2 kadarını oluşturmaktadır (53).

Peroksizomlar hidrojen peroksitin hücredeki en önemli kaynağıdır. Peroksizomlarda bulunan D-aminoasit oksidaz L- α -hidroksi asid oksidaz enzimleri hidrojen peroksit açığa çıkarma özelliğine sahiptirler.

Çözünebilir özelliği olan ve nötral sıvı ortamda oksidoredüksiyon reaksiyonlarına girebilen hücre komponentlerinin çoğu serbest radikalleri açığa çıkarırlar. Tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler ve tetrahidrobipterinler bu gruba dahildirler.Tablo II'de genel anlamda organizmadaki serbest radikal kaynakları sıralanmaktadır,

Tablo II: Serbest Radikallerin Organizmadaki Kaynakları

A) Endojen Kaynaklar

- Galaktoz oksidaz
- Siklooksijenaz
- Lipooksijenaz
- Monoamin oksidaz
- Mitokondriyal elektron transport zinciri
- Mikrozomal elektron transport zinciri
- Kloroplast elektron transport zinciri
- Oksidan enzimler
- İndolamin dioksijenaz
- Fagostik hücreler
- Nötrofiller
- Eosinofiller
- Endotel hücreler
- Otooksidasyon reaksiyonları

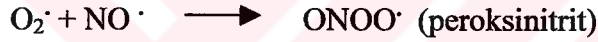
B) Eksojen kaynaklar

- Redoks siklüsü yapan maddeler
- İlaç oksidasyonları

- Sigara dumanı
- İyonize radyasyon
- Ultraviyole ışınlar
- Isı şoku
- Glutasyon oksitleyici ajanlar
- Kanserojen maddeler
- Alkol

2.3.4. SERBEST RADİKALLERİN REAKSİYONLARI VE ORGANİZMADAKİ ETKİLEŞİMLERİ

İki serbest radikal karşılaştığında eşleşmemiş elektronlarını birleştirerek bir kovalent bağ oluşturur. Bu şekilde süperoksit ve nitrik oksit çok hızlı reaksiyona girer,



Fizyolojik pH'da peroksinitrit direkt olarak proteinlerde hasar oluşturur ve nitronyum iyonu, nitrojen dioksit gazı ve hidroksil radikali gibi toksik etkili bileşenlere parçalanır. NO'nin toksisitesi oksijen ile olan etkileşimi ile doğrudan ilişkilidir (54).

Bir radikalın, radikal olmayan başka moleküllerle olan etkileşimlerinden yeni radikaller ortaya çıkar ve bu olaya radikalik zincir reaksiyonları adı verilir. Serbest radikal reaksiyon zinciri atom transferlerini içerir, yağ asitleri ve aromatik halkalarda olduğu gibi doymamış bağlara radikal eklenmesi de hücre içinde gerçekleşen diğer bir radikal reaksiyonudur.

Çeşitli patolojik durumlarda ya da organizmanın, radikal oluşumunu indükleyen birtakım etkenlere (bazı kimyasallar, ışınlar vb.) maruz kalması durumunda, serbest radikal konsantrasyonunun artması ve beraberinde antioksidan sistemin yetersiz kalması sonucu pekçok hücre ile hücre alt bileşenleri ve hücre dışı makromoleküller bu radikallerin saldırısı sonucu yapısal ve fonksiyonel bozulmalara uğrarlar. Serbest radikallerin saldırısından en fazla etkilenen biyokimyasal bileşenler, çoğu kritik

reaksiyonlarda rol alan enzimler, nükleik asitler, nörotransmitterler ve hücre membranlarının yapısal komponenti olan yağ asitleridir.

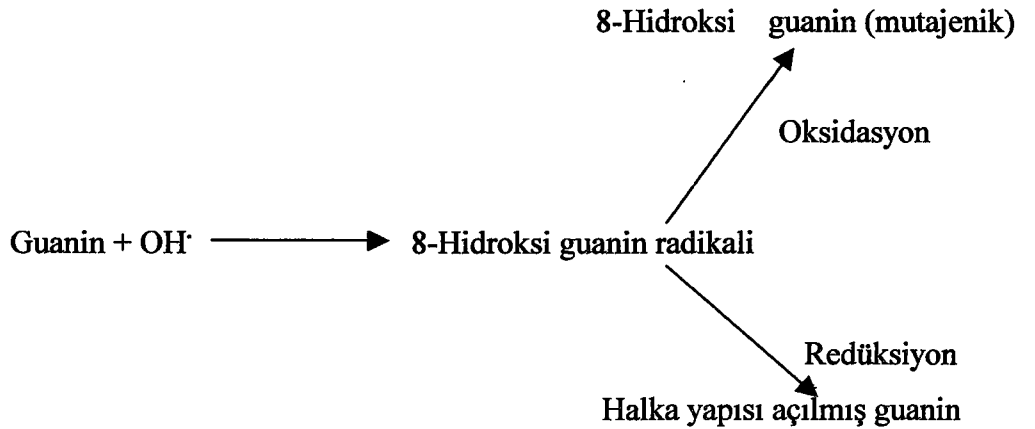
2.3.4.1. Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere Etkileri

Nükleik asitler genetik bilginin depolanması ve ifade edilmesi fonksiyonunu üstlenmiş moleküller olup canlılığın devamı açısından hücrenin en kritik öneme sahip molekülleridir. Bu nedenle, serbest radikallerin organizmada oluşturabilecekleri en ciddi hasarlar bu moleküllerde gerçekleşir.

Hücre çekirdeğine yakın bir yerde hidroksil radikali oluşumu, pürin ve pirimidin bazlarının oksidasyonuna, birtakım mutasyonlara ve DNA iplik kırılmalarına yol açar. Serbest radikaller DNA polimerazı inhibe eder.Çeşitli kaynaklardan üretilen hidrojen peroksit, uzun yarı ömrü ve hücre membranlarından kolayca geçebilme özelliği sayesinde çekirdek içerisine diffüze olabilir. Ortamda bulunabilecek bir metal iyonu ile hidroksil radikali oluşumuna meydan vererek baz oksidasyonuna ya da hidroksilasyonuna neden olur. Özellikle guanin oksidatif hasara oldukça açık bir baz olup tümör hücrelerinden saflaştırılan DNA moleküllerinde önemli ölçüde hidroksi guanin saptanmıştır (55).

Serbest radikallerin nükleik asitler üzerinde yaptığı hasarlar birtakım tamir enzimleri tarafından, modifiye olmuş bazların zincir yapısından çıkarılarak idrar yoluyla atılması şeklinde düzeltilmeye çalışılır. DNA üzerine olan oksidatif etki, idrarda atılan okside nükleobazların tespiti yoluyla takip edilebilir (56).

↓
Şekil IX : Guanin Hidroksilasyonu



Guaninin, 8-hidroksi guanine dönüşümü translasyonda hataya neden olurken,

guanin halka yapısının açılması DNA replikasyonunu durdurur. Yapının zincirden tümüyle uzaklaştırılması da delesyonla sonuçlanır.

2.3.4.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Proteinlerin serbest radikallerden etkilenme derecesi, aminoasit içeriklerine bağlıdır. Proteinin hücre lokalizasyonuna ve radikalın toksisite gücüne bağlı olarak protein harabiyetinin boyutları değişir. Sülfür içeren aminoasitlerin radikalik hasarlanmaya karşı duyarlılığı daha fazladır. Sistein, histidin, metionin, triptofan ve tirozin içeren proteinler oksidasyonlara karşı en duyarlı olanlardır. Serbest radikaller aminoasitlerin oksidasyonu yanında peptid bağlarının hidrolizine ve çapraz bağlanmalara yol açabilirler. Radikalik oksidasyon protein degradasyonunun temel nedenlerinden biridir ve protein agregatlarının oluşmasına yol açar (57).

Enzim yapısındaki proteinlerin oksidatif hasarlardan etkilenmesi daha ciddi sorunlar doğurur. Özellikle radikalik hasara daha hassas olan aminoasitlerin, aynı zamanda enzim aktif merkezinde de en fazla bulunan aminoasitler olması oluşan hasarın önemli ölçüde aktivite kaybı ya da enzimin tümüyle inaktive olmasıyla sonuçlanmasına meydan verir.

Yapılan çalışmalarda Na,K-ATPaz, Ca-ATPaz, laktat dehidrogenaz (LDH), piruvat kinaz, kreatin kinaz, DNA polimeraz enzimlerinin serbest radikal hasarıyla aktivite kaybına uğradığı tespit edilmiştir. α -1-antitripsin ve α -2-makroglobulin gibi hücre dışı proteinlerde de aktivite kaybı sonucu doku hasarı meydana gelir. Oksidatif hasardan en fazla etkilenen hücre dışı doku bileşenleri kollajen ve hyaluronik asittir. Kollajen süperoksit radikalının jel oluşumunu inhibe etmesi sonucu tahrip olur (58,59).

2.3.4.2.1. Hidroksiprolin

Prolin ve hidroksiprolin (oksirolin) esansiyel olmayıp endojen aminoasitlerdendir. Sentezi esnasında glutamik asit, önce semialdehit glutamik asit dehidrogenaz tarafından glutamik asit semialdehite dönüştürülür. Oluşan glutamik asit semialdehit halkalaşarak prolin-5-karboksilik asiti oluşturur. Prolin-5-karboksilik

asit, prolin redüktaz yardımıyla proline indirgenir. Prolin ise, prolin hidroksilaz aracılığıyla hidroksiprolini oluşturur. Arnitin'in oksidasyonlu deaminasyonu ile oluşan glutamik asit semialdehit de prolin sentezinin prekürsörü olarak kullanılır (60).

Organizmada hidroksiprolin enzimatik yolla oluşur ve üretimin aminoasitin gerekli miktarı kadar olması yine enzimi regüle eden metabolik mekanizmalar ile kontrol edilir. Prolin, süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali üreten reaksiyonlara maruz kaldığında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilir ve hidroksiprolin düzeyi artabilir (7).

Kollajen ve hidroksiprolin; Fibröz bir protein olan kollajen, memeli organizmalarında en fazla bulunan protein ailesini oluşturmaktadır. Tipleri ve organizasyonu dokuda üstlenmiş olduğu role göre değişir. Bazı dokularda kollajen ekstrasellüler matrikste veya göz sıvısında olduğu gibi yapıyı güçlendirmek üzere bir jel gibi yayılmışken diğer dokularda tendonlarda olduğu gibi büyük sağlamlık sağlayacak sıkı paralel demetler halinde bulunur. Kollajen molekülünün polipeptid öncülleri fibroblastlarda oluşur ve ekstrasellüler matrikste salgılanır. Enzimatik modifikasyondan sonra olgun kollajen monomerleri birleşir ve çapraz bağlar oluşturarak kollajen liflerini meydana getirir. Lifler α zincirleri adı verilen ve ortalama 1000 amino asit uzunlukta, ancak birbirlerinden amino asit dizilimi bakımından küçük farklılıklar içeren polipeptid zincirlerinden oluşmaktadır. Kollajen içermiş olduğu α zincirlerine göre tip I, II, III ve IV olmak üzere dört ayrı sınıfa ayrılır. Her bir tipin zincir bileşimi, görev yaptığı doku ve fonksiyonu benzerlik göstermesine rağmen birbirinden farklıdır (61).

Kollajen polipeptidleri sentezlenirken pürüklü endoplazmik retikulumun lümeninde çok sayıda enzimatik basamak ile işlenir. Yapıda arka arkaya tekrarlanan tripeptidlerde yer alan prolin ve lizin, hidroksiprolin ve hidroksilizine dönüştürülür. Bu işlem prolin hidroksilaz ve lizin hidroksilaz adı verilen enzimler tarafından moleküler oksijen ve askorbik asit yardımıyla gerçekleştirilir (62).

Deride bazal membran yapısında 2 adet α 1 ve 1 adet α 2 zincirinden oluşan tip IV kollajen bulunmaktadır.

2.3.4.3. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri

Lipidler, hücre membranı ve diğer membranöz yapıların temel yapısal ve fonksiyonel bileşenleridir. Bünyelerinde önemli ölçüde doymuş ve doymamış karbon-karbon bağları içerirler. Yapılarında doymamış bağlar (çift bağlar) içeren unsature yağ asitleri serbest radikaller için çok uygun hedeflerdir.

Membran yapısında yer alan yağ asitlerinin peroksidasyonu, membran yapısında ciddi ve geri dönüşümsüz defektlere sebep olur. Membran geçirgenliği, yapısı, akışkanlığı, hareket kabiliyeti, transmembran iyonik gradienti bozulur (63).

Biyolojik hasarla karakterize radikalik reaksiyonlar arasında en belirgin olanı lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonu organizmada oluşan kuvvetli bir radikal etkisiyle membran yapısında bulunan, konjüğe olmayan doymamış yağ asidi zincirlerindeki α -metilen (-CH₂) gruplarındaki bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlar. Zincirden bir hidrojen atomunun uzaklaşması yağ asidi zincirinin radikal haline gelmesine neden olur. Oluşan lipid radikali (L[•]) dayanıksız bir yapıya sahip olup bir dizi spontan değişikliğe uğramaktadır. Önce molekül çift bağ aktarımıyla 233 nm de spesifik UV absorbanısı veren konjüğe dienlere dönüşmektedir. Lipid radikalinin moleküler oksijenle reaksiyona girmesi sonucu ise lipit peroksit radikali (LOO[•]) meydana gelmektedir. Bu radikaller de membran yapısındaki diğer doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşmasını sağlamakta, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını bünyelerine katarak lipit hidroperoksitlere (LOOH) dönüşmektedir. Bu otokatalitik reaksiyonlar lipit hidroperoksitlerinin aldehit, keton türü yapılara ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesi ile son bulmaktadır. Aldehit yapılı moleküller membranlardan kolayca geçebilmekte ve hedef organda sitotoksik etki gösterebilmektedir. Lipit peroksitleri ise hücresel hasara yol açan, metabolik yollara girişimde bulunan ve kan akımını yavaşlatan kararlı kimyasal yapılardır (64).

Şu ana kadar, hücre ve dokularda, serbest radikallerin neden olduğu tespit edilmiş olan zararları şöyle sıralayabiliriz:

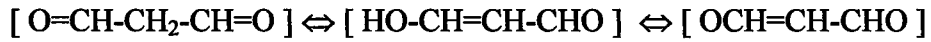
- 1) DNA tahribatı nedeniyle kanser oluşumu ve gelişiminde rol oynamaları

- 2) Nükleotid yapıli koenzimlerin yıkımı
- 3) Enzim aktivitelelerinde aksaklıklar; Tiollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, hücre ortamının tiol/disülfid oranının değişmesi
- 4) Proteinlere kovalan bağlanmalar, protein tahribatı, kollajen ve elastin gibi uzun ömürlü bileşiklerdeki oksidoredüksiyon olaylarının bozularak kapillerde aterofibrotik değişikliklerin oluşması, membran proteinlerinde tahribat, taşıma sistemlerinin bozulması
- 5) Mukopolisakkaritlerin yıkımı
- 6) Lipit peroksidasyonu, membran yapı ve fonksiyon bozuklukları
- 7) Pigment birikimi ya da sentezinin inhibe olması

2.3.4.3.1. Malondialdehit (MDA)

Poliansature yağ asitlerinin oksidatif yıkımı sonucu son ürün olarak malondialdehit (MDA) oluşur. Memelilerde bu yağ asitleri en çok araşidonik asit ve dokosaheksanoik asittir. Oleik asit ve linoleik asitin oksidasyonundan çok az miktarda malondialdehit oluşur. Bazı dokularda MDA enzimatik reaksiyonlar sonucu da oluşabilir. PgH₂, PgH₃ ve PgG₂'den tromboksan sentetaz kataliziyle 1:1:1 oranında sırasıyla MDA, TxA₂ ve 17 karbonlu bir bileşik oluşur (65).

Şekil X: MDA ve izomerleri



MDA

MDA sulu çözeltilerde pH'a bağlı olarak çeşitli formlarda bulunabilir. MDA'nın sulandırılmış asit veya nötral çözeltileri 4 °C'de 20 gün saklanabilir. Yüksek konsantrasyonlarda özellikle oda sıcaklığında veya uzun süre bekletildiğinde MDA çözeltilerinde aldol tipi kondensasyonlar oluşur.

MDA proteinlerin amino gruplarına, fosfolipitler veya nükleik asitlere bağlanarak toksik etkisini gösterir. MDA miktarı tiyobarbiturik asit testi ile ölçülmekte ve bu yöntem lipit peroksidasyon düzeyinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır (66). Serbest radikallerle birlikte lipit peroksitlerinin de birçok patolojinin oluşumunda

önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir (67).

2.3.4.4.Serbest radikallerin karbonhidratlara etkileri

Serbest radikaller için bir diğer hedef molekül de karbonhidratlardır. Polisakkarit depolimerizasyonu ile mono ve oligosakkaritlerin otooksidasyonu karbonhidratlarda yapısal ve fonksiyonel bozulmalara neden olur. Otooksidasyon sonucu genellikle peroksitler ve okzoaldehitler oluşur. Okzoaldehitler, karbonhidratların nükleik asit ve proteinlere bağlanabilme, çapraz bağlar oluşturabilme özelliği kazanmasını sağlarlar. Örneğin okside glukoz, tüm organların bağ doku proteinleriyle çapraz bağlar yaparak ilgili dokularda protein agregasyonu ve bazal membran kalınlaşmasına neden olup katarakt ve mikroanjyopati gibi patolojilerin oluşumunda rol oynar (68).

Poliansature yağ asitlerinin ve karbonhidratların oksidasyonunun bir ürünü olan glyoxal hücre bölünmesini inhibe eden bir moleküldür (69).

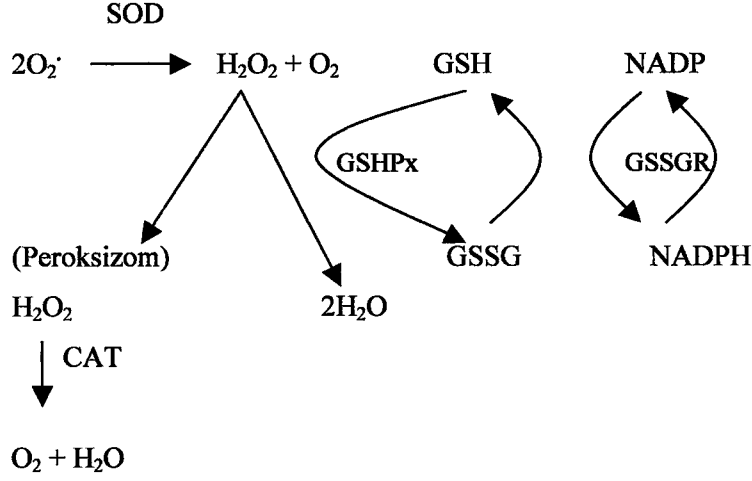
2.4. ORGANİZMANIN ANTIOKSİDAN SAVUNMA MEKANİZMALARI

Aerobik organizmalar gerek normal metabolik fonksiyonlar esnasında, gerek eksojen kaynaklı oluşan serbest radikallerin konsantrasyonlarının fizyolojik sınırlar içerisinde kalmasını sağlayan, detoksifikasyon mekanizmalarına sahiptir. Bu mekanizmaların tümü antioksidan sistem olarak adlandırılmaktadır. Bu sistem antioksidan enzimleri ve enzimatik aktiviteleri olmayan ancak radikal süpürücü (scavenger) özelliğe sahip pek çok molekülü içermektedir. Bunların dışında organizmaya dışardan alınan (ekzojen) bir çok molekül de antioksidan sisteme katkı sağlar.

Antioksidan sistemin bileşenlerini genel olarak şu şekilde sınıflandırabiliriz,

a) Serbest radikalleri daha az toksik ürünlere dönüştüren antioksidan enzim sistemleri; Süperoksit Dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1)), Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) ve glutasyon redoks siklüsü enzimleri (Glutasyon Peroksidaz EC 1.11.1.9, Glutasyon Redüktaz EC 1.6.4.2, Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz EC 1.1.1.49, Glutasyon-S-Transferaz EC 2.5.1.18 vb.).

Şekil XI: Oksidan sisteme karşı enzimatik savunma



b) Radikalleri, yakalayıp nötralize eden nonenzimatik antioksidan maddeler; alfa tokoferol, askorbik asit, beta karoten, glutatyon, ürik asit, melatonin, taurin ve yüksek molekül ağırlıklı antioksidanlar olan mukus ve albumin de bu gruba dahil edilebilir (70,71).

c) Reaktif oksijen radikallerinin oluşmasını önleyen ve oluşanın yayılmasını engelleyen sistemlerdir ki bunlar; hidrojen peroksit ve süperoksit anyonundan hidroksil radikali oluşmasını sağlayan Haber-Weiss Reaksiyonu'nu katalizleyen demir ve bakır iyonlarını plazmada ve hücrede bağlayan bakır transport proteini seruloplazmin ile ferritin, transferrin, laktoferrin ve mitokondrilerde doğal olarak oluşan serbest radikalleri suya indirgeyen mitokondriyel sitokrom oksidazdır (72). Ayrıca bu grup içerisinde haptoglobulin, bilirubin, yüksek dansiteli lipoproteinler, α -1-antitripsin, fibronektin ve IgG sayılabilir (73).

Organizma oksidatif hasardan birkaç farklı şekilde kendisini korur,

- 1- Oluşan radikallerin detoksifikasyonu
- 2- Radikalik zincir reaksiyonların sonlandırılması
- 3- Radikal oluşumunun sınırlandırılması
- 4- Hedef molekülde oluşan oksidatif hasarın tamiri.

Son yıllarda yapılan araştırmalarla memeli organizmasında sentez edilmeyen ancak diyetle alınabilecek pek çok molekülün antioksidan özelliği ortaya konmuştur. Bunlardan en fazla dikkat çekenler bal arısı propolisinde bulunan CAPE (Kafeik asit

fenil esteri) ile daha çok domates, karpuz, kayısı gibi bitkilerden saflaştırılan likopendir.

Görüldüğü üzere organizmanın antioksidan sistemi, endojen ve eksojen bir çok molekülden oluşmaktadır. Ancak, burada sadece bu çalışmada ölçülen parametrelerden ayrıntılı söz edilecektir.

2.4.1. GLUTATYON (GSH)

Glutatyon (γ -glutamil sisteinil glisin), N-terminal glutamatın α -peptidil olmayan bir bağ aracılığı ile sisteine bağlandığı bir atipik tripeptiddir. De Rey-Pailhode tarafından 1888'de keşfedildikten sonra 1921'de ilk kez Hopkins tarafından yapısı aydınlatılmıştır (74). Genelde, GSH olarak kısaltılır; SH sisteinin sülfidril grubuna işaret eder ve molekülün alış-veriş yapan kısmıdır. Potansiyel olarak toksik bazı elektrofilik ksenobiyotikler aşağıdaki reaksiyonda şematize edildiği gibi nükleofilik redükte glutatyon ile konjuge olurlar.



Burada R elektrofilik ksenobiyotiği göstermektedir. Bu reaksiyonları kataliz eden enzimlere glutatyon-S-transferazlar denir. Bu enzimler karaciğer sitozolünde yüksek diğer dokularda daha düşük konsantrasyonlarda bulunurlar. Eğer toksik potansiyele sahip ksenobiyotikler glutatyon (GSH) ile konjugasyona uğramasalar DNA, RNA veya hücre proteinlerle kovalan etkileşimlere girerek hücre hasara yol açabilirler. Bu nedenle glutatyon bir çok kimyasal ve kanserojen türe karşı önemli bir savunma molekülüdür.

Glutatyon konjugeleri ekskresyon öncesi daha ileri metabolizasyona uğrarlar. Glutatyona ait glutamil ve glisinil grupları spesifik enzimler tarafından uzaklaştırılırlar ve geri kalan sisteinil kısmının amino grubuna bir asetil grubu eklenir. Sonuçta meydana gelen bileşik idrarla atılıma uğrayan L-asetil sisteinin konjugesi olan merkapturik asittir. Bu basamaklarda rol alan enzim glutatyon- γ -glutamil transferaz enzimidir (75).

Eritrositlerde bulunan indirgenmiş glutatyon hemoglobinin sistein gruplarını ve diğer hücre proteinlerinin tiol gruplarını ve diğer hücre proteinlerinin tiol gruplarını indirgenmiş şekilde tutar. Böylece hemoglobini oksidasyondan koruyarak hücrenin

bütünlüğünü sağlar. Ayrıca Zn, Cd, Hg, Cu ve Pb gibi ağır metal iyonlarıyla kompleks oluşturarak vücuttan atılmalarını kolaylaştırır (76).

Glutasyonun bir diğer hayati fonksiyonlarından biri de hücre içine aminoasit tranportunda rol almasıdır.

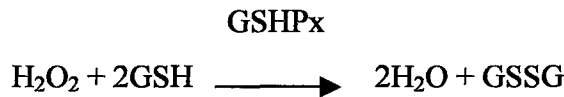
Glutasyon, antioksidan savunma sisteminin önemli bileşenlerinden biri olan, glutasyon peroksidaz enziminin substratı olarak mekanizmada görev alır ve enzimin hidrojen peroksiti ve diğer organik peroksitleri detoksifiye etmesinde fonksiyon görür.

Glutasyon konsantrasyonu memeli eritrositlerinde yaklaşık 2 mM, tam kanda 0.7-0.8 mM arasındadır. Organizmada glutasyon dağılımı, karaciğerde %30, böbrekte %34, kalpte %20 ve beyinde %30 oranlarında bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar yaşlanmayla, organlardaki glutasyon içeriği arasında negatif bir korelasyon olduğunu ortaya koymuştur (77).

2.4.2. GLUTATYON PEROKSİDAZ (GSHPx, EC 1.11.1.9)

Normal koşullarda hücrede bulunan hidrojen peroksidin detoksifikasyonundan esas olarak glutasyon peroksidaz sorumludur. GSHPx lipid peroksidasyonunun başlamasını ve gelişmesini engelleyici özellikte olan bir enzimdir. Selenyum bağımlı ve selenyum bağımsız olmak üzere iki farklı tipi vardır. Selenyuma bağımlı olan glutasyon peroksidaz hem hidrojen peroksiti hem de lipid hidroperoksitlerini metabolize ettiği halde hücrenin mitokondri (%30) ve sitozol (%70) fraksiyonlarında lokalize olan selenyum bağımsız glutasyon peroksidaz ise sadece lipid hidroperoksitlerini metabolize etmektedir (78).

Hidrojen peroksit ve çeşitli organik hidroperoksitlerin glutasyon peroksidaz ile indirgenmeleri reaksiyonunda redükte glutasyon kosubstrat olarak görev alır;



Katalitik reaksiyon sonucu H₂O ve okside glutasyon (glutasyon disülfit) oluşur.

Hücre sel glutasyonun eksikliğine yol açan GSSG efluksu glutasyon peroksidaz

aktivitesindeki artışın bir sonucudur. Eritrosit veya karaciğer hücrelerinde oluşan okside glutatyonun minör bir konsantrasyonu hücreler tarafından atılır. Bu miktar hidroperoksit metabolizması sırasında yükselir. GSSG'nin hücre içinde birikimi ve eflusu hücresele NADPH/NADP⁺ redox oranı ile ilişkilidir. Sitozolik NADPH/NADP⁺ oranını azaltan metabolik olaylar GSSG/GSH oranını artırarak hücreden GSSG eflusunun hızlanmasına yol açarlar (79).

Plazma glutatyon peroksidaz enzimi, hücresele glutatyon peroksidazdan immünolojik, fiziksel ve kinetik yönünden farklılıklara sahiptir. Plazma glutatyon peroksidazın aminoasit dizisi hücresele glutatyon peroksidaz ile %57 oranında homoloji göstermektedir. İnsan plazma glutatyon peroksidaz enzimi 24 kD' luk epidimal sekretör proteini ile % 67 oranında homoloji göstermektedir. Plazma glutatyon peroksidaz geninin ekspresyonu normal hücrelerde görülürken tümörlü hücrelerde gözlenmediği bildirilmiştir. Hücresele glutatyon peroksidaz geninin ekspresyonu ise normal dokulara oranla kanserli dokularda 3-4 kat daha yüksek bulunmuştur (80).

İodoasetat, siyanür ve süperoksit radikali glutatyon peroksidaz enziminin inhibitörleridir. Hidrojen peroksitin sitotoksik etkisi büyük ölçüde hücre içi glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimlerinin aktivitesi ile sınırlıdır. Bu iki enzim hücrenin farklı bölgelerinde lokalize olup oluşan hidrojen peroksitin seviyesinin düzenlenmesinde birlikte etkinlik gösterirler.

E vitamini takviyesi, demir eksikliği, ağır metal iyonları toksisitesi ve hormonal denge glutatyon peroksidaz aktivitesini etkileyen parametrelerdir.

2.4.3. Selenyum

Canlılardaki selenyumun asıl kaynağı, biyolojik çevrim yoluyla toprak, bitkiler ve hayvanlar, dolayısıyla besinlerdir. Selenyum (Se) genellikle selenür (-2) ve selenat (+4, +6) iyonları şeklinde bulunur. Bunlardan +4 ve +6 yükseltgenme basamağına sahip olan bileşikler oldukça kararlıdır. Selenyum, glutatyon peroksidaz enziminin önemli bir bileşenidir. Enzimin yapısına girerek onun aktif bölgesinde yapısal ve fonksiyonel rol üstlenir. Yapılan araştırmalara göre, glutatyon peroksidaz enziminin her molekülünde 4 atom gram selenyum bulunur. Enzimin molekül ağırlığı yaklaşık 84000

Dalton olup molekül, her birinin ağırlığı 21000 Dalton olan dört subunite içermektedir. Her subunitede bir Se atomu bulunup, enzimin total ağırlığının %0,37'si oranında Se içerdiği bilinmektedir (81).

Canlı sistemlerde selenyum ya dimetil selenür gibi düşük molekül ağırlıklı bileşikler halinde ya da proteinlere bağlı olarak bulunur. Selenyum insan ve hayvanlara inorganik yapıda (sodyum selenür gibi) verildiği zaman kolayca organo-selenyum bileşiklerine dönüşür. Selenyum bitkilerde aminoasitlerden sistein ve metiyoninin yapısındaki sülfürlerin yerine geçebilmektedir. Se kükürt atomları ile S-Se-S şeklinde ve fosfor atomları ile P-Se-P şeklinde bağlanmalar yapabilir.

Selenyum antioksidan özelliği olan bir eser element olup, organizmada ağır metal iyonlarının toksisitesini azaltmaktadır. Eksikliğinde beyaz kas hastalığı olarak bilinen Keshan Hastalığı ortaya çıkar. Canlılar üzerinde yapılan çalışmalar selenyumun antikanserojen etki gösterdiğini, kanser oluşturulmuş farelerde tümör gelişimi ile selenyum tutulumu arasında negatif korelasyon olduğu gösterilmiştir (82).

İmmün sistemin tüm komponentlerinin fonksiyonlarında selenyumun önemli etkisi olduğu belirtilmiştir. Hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalarda, otoimmün yanıtı azalttığı ve antijen ile birlikte verildiği zaman immünoadjuvan olarak fonksiyon gördüğü saptanmıştır (83).

3. MATERYAL – METOD

3.1. Numunelerin Toplanması

Çalışma, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Turgut Özal Tıp Merkezi'nin, Dermatoloji Polikliniği'ne başvurmuş olan vitiligo vulgaris'li ve yaş ortalaması $23,6 \pm 7,4$ olan 30 hasta ile herhangi bir dermatolojik problemi olmayıp yaş ortalaması $27,9 \pm 7,1$ olan 30 sağlıklı bireyden oluşturulan kontrol grubu üyeleri üzerinde yapıldı. Hasta ve kontrol grubu bireylerinden heparinize cam tüplere 10 ml venöz kan alınarak derhal laboratuvarında 4°C 'da soğutmalı santrifüj ile 400 g'de santrifüj edilip plazmaları ayrılarak çalışılacak ana kadar -40°C 'da dondurularak saklandı. Hasta ve kontrol grubuna dahil edilen bireylerin son bir ay içerisinde herhangi bir enfeksiyon geçirmemiş ve hiçbir şekilde ilaç kullanmamış olmalarına özen gösterildi.

Çalışma için İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Kan alınması esnasında 10 ml'lik steril enjektörler kullanıldı. Kanlar ilk alındıklarında cam tüplere konulurken santrifüj sonrası ayrılan plazmaların saklanması için 5 ml'lik kapaklı polipropilen tüpler kullanıldı. Santrifügasyon işlemi Hettich Ratina 46R cihazı yardımıyla yapıldı. Tüm numuneler -40°C 'da, Boch marka soğutucu içerisinde saklandı. Hazırlanan tamponların pH'sı Hanna marka pH metre cihazı yardımıyla ayarlandı. Tüm pipetleme işlemlerinde 0-5, 5-50, 50-200 ve 200-1000 μl hacim aralıklarına sahip Socorex marka mikropipetler kullanıldı. Spektrofotometrik ölçümler Shimadzu UV 1201 spektrofotometresi ile gerçekleştirildi. Se ölçümünde CECIL 1100 marka HPLC cihazı kullanıldı.

3.3. Kimyasallar

Çalışma sırasında kullanılan NaOH, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , Na_2HPO_4 , EDTA, H_2O_2 , Na,K-Tartarat, CuSO_4 , NaN_3 , Na_2CO_3 , GSH, GSSG, GSH-Redüktaz, NADPH,

BSA(Bovine Serum Albumin), Folin Fenol Reaktifi, n-bütanol, HNO₃, HCL, HClO₄, HCOOH, diaminobenzidin, toluen, CH₃COONa, kloramin-T, isopropanol, p-dimetil amino benzaldehit, H₃PO₄, TCA, tetrametoksipropan bileşikleri analitik saflıkta olup tüm kimyasallar Sigma Company'den temin edilmiştir.

3.4. Deneysel Prosedürler

Santrifügasyon sonrası ayrılmış olan plazmalar 750'şer µl'lik bölümler halinde yedi ayrı polipropilen tüpe alınarak donduruldu ve bu sayede her ölçüm için kullanılan numunenin tek bir kez dondurulup çözülmesi sağlandı.

3.4.1. Protein Tayini

Numunelerin protein içerikleri Lowry (84) yöntemi uyarınca yapıldı. Bu metod, proteinin yapısında bulunan tirozin ve triptofan aminoasitlerinin fosfotungstat kompleksini molibden mavisine indirgemesi prensibine dayanır. Reaksiyon bakır (Cu²⁺) ile belirginleştirilir. Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı ve ölçüm tekniği aşağıdaki gibidir:

Gerekli Çözeltiler

A Çözeltisi

- * 100 hacim, %2'lik Na₂CO₃'ün 0,1 N NaOH içerisindeki çözeltisi.
- * 1 hacim, %2'lik Na₂K-Tartarat çözeltisi.
- * 1 hacim %1'lik CuSO₄ çözeltisi.

A çözeltisi yukarda belirtilen her üç çözeltinin deneye başlamadan hemen önce belirtilen hacim oranlarında karıştırılmasıyla taze olarak hazırlandı.

B Çözeltisi

* 1 hacim, folin fenol reaktifi.

* 1 hacim bidistile su.

Belirtilen hacimlerde iki bileşen yine hemen deney öncesi belirtilen oranlarda karıştırıldı.

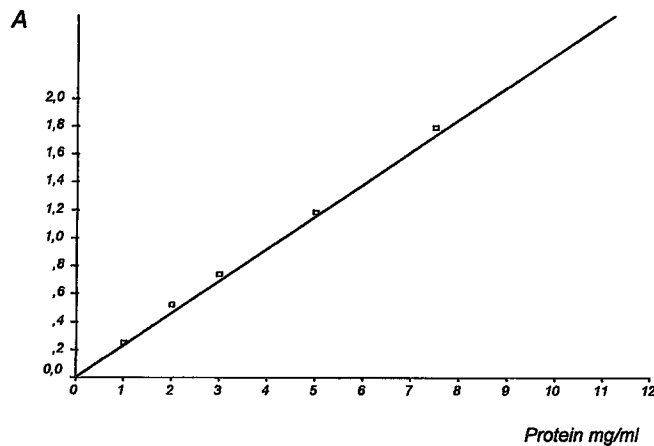
BSA Çözeltisi

Standart protein çözeltisi olarak kullanılan BSA (Bovine serum albumin) önce 25,0 mg/ml konsantrasyonda hazırlandı ve daha sonra hazırlanan bu stok çözelti değişik oranlarda seyreltilerek standart grafiği için kullanılacak derişimi belli BSA numuneleri elde edildi.

Ölçüm

Boş ve ilk kez kullanılacak olan polipropilen tüpler içerisine A çözeltisinden 2,5 ml konuldu. Üzerine 10 µl örnek ilave edildi ve vorteksle iyice karışması sağlandıktan sonra bu tüpler 10 dakika bekletildi. Daha sonra üzerine 250 µl B çözeltisinden eklene tüpler kompleks oluşumunun sonuçlanması için 45 dakika karanlıkta bekletildi. Bu sürenin bitiminde karanlık ortamdan çıkarılan çözeltilerin spektrofotometre ile 695 nm'deki absorbands değerleri okundu.

Aynı işlem değişik konsantrasyonlardaki BSA standartları için de tekrar edildi ve elde edilen standart grafiğinden her bir numunenin protein içeriği hesaplandı.

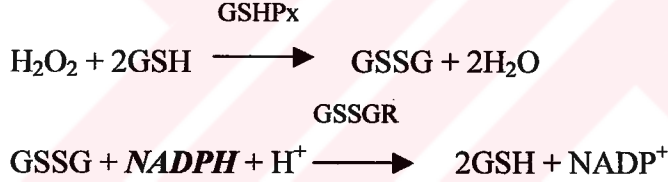


Şekil XII: Protein standart grafiği

3.4.2. Glutasyon Peroksidaz (EC 1.11.1.9) Aktivite Tayini

GSHPx, redükte glutasyonu kullanarak hidrojen peroksite suya dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Reaksiyon sonunda redükte glutasyon (GSH) okside forma dönüşürken, hidrojen peroksit ise suya katalizlenir. Oluşan okside glutasyonun (GSSG) tekrar kullanılabilmesi (başka bir hidrojen peroksit molekülünün suya katalizi için) okside glutasyonun redükte glutatona dönüşmesini gerektirir. Bu dönüşüm, ortamda NADPH ve glutasyon redüktaz (GR) enzimi varlığında gerçekleşir. Bu durumda NADPH, (okside formu olan) NADP'ye çevrilirken okside glutasyon redükte forma dönüşür.

Enzim aktivitesi, aşağıdaki reaksiyonlar zincirinde yer alan NADPH'nin spesifik absorbanasının 340 nm'de izlenmesi temel alınarak ölçülmüştür. Yöntem, Lawrance RA (85) ve arkadaşlarının uygulamış oldukları yöntemde, doku homojenatı yerine plasma kullanarak modifiye edilmesiyle elde edilmiştir.



Gerekli Çözeltiler

Tampon; İçerisinde 5 mM EDTA içeren, pH 7 ve 50 mM derişimde $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$ tamponu.

- * 1 mM NaN_3 (Sodyum azid),
- * 2 mM GSH (Redükte glutasyon),
- * 0,25 mM H_2O_2 (Hidrojen peroksit),
- * 0,2 mM NADPH,
- * 1,2 U/ml GSSG Redüktaz.

Ölçüm

Belirtilen derişimlerde hazırlanan çözeltilerle önce kör ardından da örnek deneyleri yapıldı. Bunun için 1 ml tampon, 10 µl NADPH, 10 µl GSH, 10 µl NaN₃ ve 5 µl GSSG Redüktaz enzimi polipropilen tüpe kondu. 37 °C'de 5 dakika süre ile inkübasyona tabii tutulan çözelti karışımı spektrofotometre küvetine alınarak hidrojen peroksit ilave edildi. Bu aşamada kör denemeler için ortama 10 µl bidestile su, numune ölçümleri için 10 µl plasma ilave edilerek 340 nm'de 3 dakika boyunca absorbans değişimi kaydedildi.

1 Ünite GSHPx: 1 dakikada okside olan NADPH'nin µmol cinsinden miktarıdır.

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

E = NADPH'nin molar absorpsiyon katsayısı ($6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

V_t = Total reaksiyon hacmi

V_s = Total reaksiyon içindeki numune hacmi

L = Küvet çapı (Işık yolu, 1cm)

ΔA/t = Dakikadaki absorbans değişimi

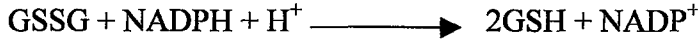
10⁶ = Molün mikromole çevrilmesi

Spesifik aktivite için bulunan sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

3.4.3. Glutasyon Düzeyi Tayini

Total glutasyon düzeyi ölçümü, Owens (86) yöntemi uyarınca 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoikası'tın (DTNB), glutatyondaki sülfhidril grupları ile reaksiyona girip okside glutasyon ve sarı renkli bir kompleks olan 5-tiyo-2-nitrobenzoikası (TNB)'i oluşturması temeline dayanır. Oluşan TNB miktarı 412 nm'de spektrofotometrik olarak takip edilebilmektedir. Hesaplamalar GSH standardı kullanarak elde edilen standart grafiği yardımıyla yapıldı.





Gerekli Çözeltiler

*Tampon; 143 mM derişimde, pH'sı 7,5 olan ve içerisinde 6,3 mM EDTA içeren fosfat tamponu,

* 0,248 mg/ml derişimde tampon içinde çözülmüş NADPH,

* 6 mM derişimde tampon içinde çözülmüş DTNB,

* 266 U/ml aktivitede GSSG Redüktaz,

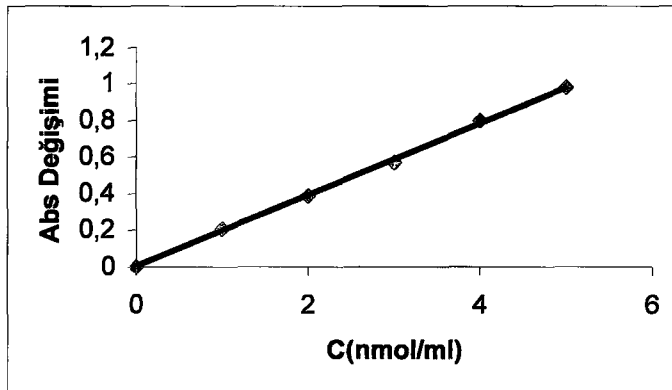
* 100 mM GSH çözeltisi.

Ölüm

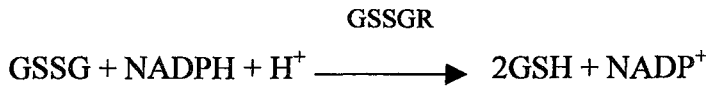
Polipropilen tüpler içerisinde, içerisinde 0,248 mg/ml derişimde NADPH çözülmüş olan tampon çözeltisinden 700 µl kondu, üzerine 100 µl DTNB solüsyonu ilave edildi, son olarak 25 µl numune eklenip son hacim distile su ile 995 µl'ye tamamlandı. Kör için numune yerine bidistile su ilave edildi. Tüpler 30 °C sıcaklıktaki su banyosunda 15 dakika bekletildi ve bu sürenin sonunda spektrofotometre küvetine alınan karışım üzerine 5 µl GSSG Redüktaz ilave edilerek tepkime başlatıldı. Oluşan TNB'nin absorbans değişimi 412 nm'de 1 dakika boyunca izlendi.

Standart grafiğı için, aynı prosedür 100 mM derişimdeki stok glutatyon çözeltisinin değişen oranlarda seyreltilmesiyle elde edilen standart çözeltilerine uygulandı ve elde edilen OD(Optik dansite)-C (Derişim) grafiğinden numunelerin glutatyon içerikleri hesap edildi.

Şekil XIII : GSH Standart Grafiğı



Okside glutatyon düzeyi ölçümü; Owens Yöntemi'nce (86) okside glutatyonun NADPH ile GSSG Redüktaz aracılığıyla redüksiyonu esnasında tüketilen NADPH'ın 340 nm'deki absorbansının spektrofotometrik olarak izlenmesi temeline dayanmaktadır. Okside glutatyon ölçümünde problem yaratması muhtemel bir nokta redükte glutatyonun oksidasyonundan kaynaklanacak girişimdir. Ortama ilave edilen vinil piridin, ortamdaki redükte glutatyon ile kompleks oluşturarak meydana gelebilecek interferansı önler.



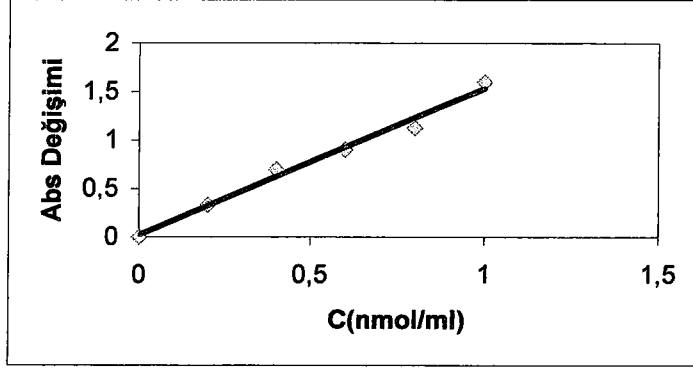
Gerekli Çözeltiler

- * Tampon; 143 mM derişimde, pH'sı 7,5 olan ve içerisinde 6,3 mM EDTA içeren fosfat tamponu,
- * 2-vinil piridin herhangi bir dilisyona maruz bırakılmadan kullanıldı,
- * 50 mM GSSG çözeltisi
- * 266 U/ml aktivitede GSSG Redüktaz,
- * 0,248 mg/ml derişimde tampon içinde çözülmüş NADPH,

Ölçüm

Polipropilen tüp içerisine 100 µl plasma konuldu ve üzerine 2 µl 2-vinil piridin eklenerek karıştırıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Tüpe, içerisinde 0,248 mg/ml derişimde NADPH bulunan pH 7,5 fosfat tamponundan 850 µl eklendi, son olarak ortama GSSG Redüktaz çözeltisinden 25 µl eklenmesiyle reaksiyon başlatıldı ve spektrofotometre ile 340 nm'deki absorbans değişimi 1 dakika boyunca izlendi. Kör ölçümü yapılırken aynı bileşenler tüpe konarken sadece plasma yerine eşit hacimde bidestile su kullanıldı.

Standart grafiği için, aynı prosedür 50 mM derişimdeki stok okside glutatyon çözeltisinin değişen oranlarda seyreltilmesiyle elde edilen standart numunelerine uygulandı ve elde edilen ΔOD-C (Derişim) grafiğinden numunelerin okside glutatyon içerikleri hesap edildi.



Şekil XIV : GSSG Standart Grafiği

3.4.4. Malondialdehit (MDA) Düzeyi Tayini

Lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA), tiyobarbutirik asit (TBA) ile reaksiyona girerek 532 nm’de spesifik absorbans veren bir kompleks oluşturur. MDA düzeyi tayini Ohkawa yöntemi (87) uyarınca, oluşan bu kromojenik kompleksin 532 nm’de absorbansının ölçülmesi temeline dayanır.

Gerekli Çözeltiler

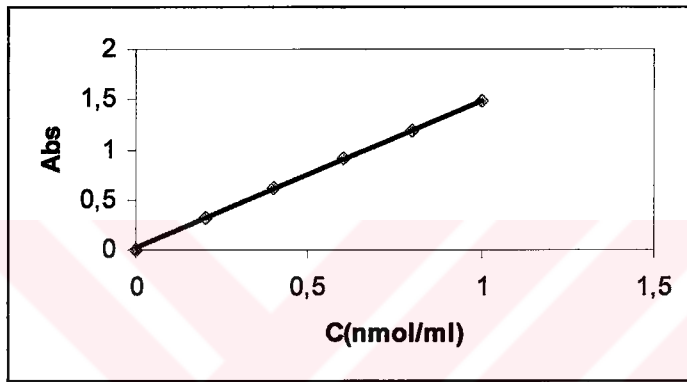
- * %8’lik sodyum dodesilsülfat (SDS)
- * %0,8’lik tiyobarbutirik asit (TBA)
- * %20’lik asetik asit
- * %99’luk n-bütanol
- * 1,1,3,3-tetraetoksi propan (TEP)

Ölçüm

10 ml’lik kapaklı cam tüpler içerisine 200 µl plazma konuldu. Üzerine 200 µl %8’lik sodyum dodesilsülfat ve 1,5 ml %20’lik asetik asit ilave edildi. Daha sonra 1,5 ml %0,8’lik tiyobarbutirik asit ve 0,6 ml saf su eklenerek tüplerin ağzı kapatıldı. Daha önceden hazırlanmış olan kaynar su banyosunda 1 saat bekletildi. Su banyosundan çıkarılan tüpler soğutuldu ve üzerine 5 ml n-bütanol ilave edilerek 4000 g’de 15 dakika

santrifüj edildi. Tüpler içerisindeki organik faz (üstteki faz) alınarak 532 nm’de absorbands ölçümü yapıldı.

Standart ölçümü için, 1 μM derişimde hazırlanan stok 1,1,3,3-tetraetoksipropanın değişen oranlarda seyreltilmesi ile elde edilen standart çözeltileri, numune yerine kullanılarak tüm işlemler hiçbir değişiklik yapılmadan uygulandı. Elde edilen absorbands değerleri standart derişimlerine karşı grafiğe alınarak standart eğrisi elde edildi. Numunelerin MDA içerikleri standart grafiği yardımıyla belirlendi.



Şekil XV : MDA standart grafiği

3.4.5. Hidroksiprolin Düzeyleri Tayini

Hidroksiprolin düzeyi tayini Bergman (88) yönteminin, doku homojenatı yerine plasma kullanılarak modifiye edilmesi suretiyle gerçekleştirildi.

Gerekli Çözeltiler

- * Derişik HCl
- * Serum fizyolojik
- * Oksitleyici Ayıraç

A: %7’lik Kloramin T

B: pH 7 Sodyum asetat tamponunun 500 ml’si üzerine 385 ml isopropanol eklendi ve son hacim 1000 ml’ye tamamlandı. Karışım final pH’sı 6’ya ayarlandı.

Deneye başlarken A ve B çözeltileri A/B:1/4 oranında karıştırılarak oksitleyici ayıraç hazırlandı.

* Ehrlich Ayıracı

A: 2 g, p-dimetil amino benzaldehitin 3 ml %60'lık perklorik asit içerisinde çözülmesiyle hazırlandı.

B: İsoopropanol

Deneye başlamadan hemen önce A'dan 3 ml, B'den de 13 ml alınarak karıştırıldı ve Ehrlich Ayıracı elde edildi.

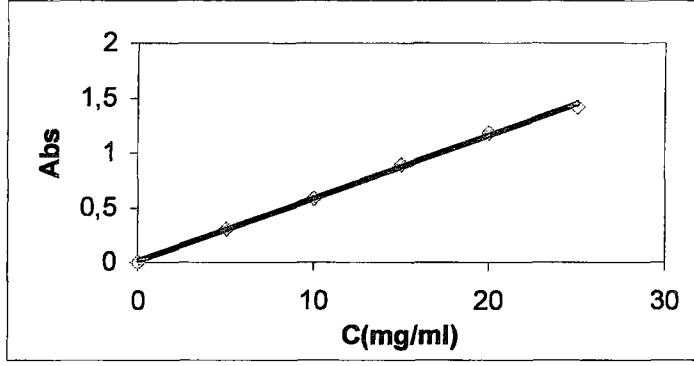
Numunenin Hazırlanması

Kapaklı cam tüp içerisinde 0,5 ml plazma ve 4,5 ml serum fizyolojik karıştırıldı, üzerine 5 ml derişik HCL eklendi ve tüplerin ağız kapatılarak 110 °C etüvde 12 saat boyunca hidroliz edildi. Hidroliz sonrası karışımdan 1 ml alınarak pH 7'ye ayarlandı. Elde edilen nötral karışımdan 0,25 ml alınarak analizde kullanıldı.

Ölçüm

0,25 ml nötral karışım üzerine 0,50 ml isopropanol ve 0,25 ml oksitleyici ayıraç eklendi. Vortekslenip oda sıcaklığında 4 dakika bekletildi. Üzerine 3,25 ml Ehrlich Ayıracı eklendi ve 60 °C su banyosunda 25 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda karışım soğutuldu ve spektrofotometrede 558 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Kör için aynı işlemler 0,25 ml nötral karışım yerine 0,25 ml bidestile su kullanılarak tekrar edildi.

Standart ölçümleri için ise, serum fizyolojik içerisinde hazırlanan 50 mg/ml derişimindeki L-hidroksiprolin çözeltisinin değişen oranlarda seyreltilmesiyle elde edilen örnekler kullanıldı. Numune ölçümlerinde kullanılan prosedürün aynısı uygulandı ve ölçümler köre karşı yapıldı. Elde edilen standart grafiğinden bulunan faktör ve hacim dönüşümleri hesaba katılarak numunelerin hidroksiprolin düzeyleri saptandı.



Şekil XVI : Hidroksiprolin Standart Grafiği

3.4.6. Selenyum Düzeyleri Tayini

Selenyum Arain ve ark.'nın (89) uyguladıkları yöntem uyarınca HPLC'de tayin edildi.

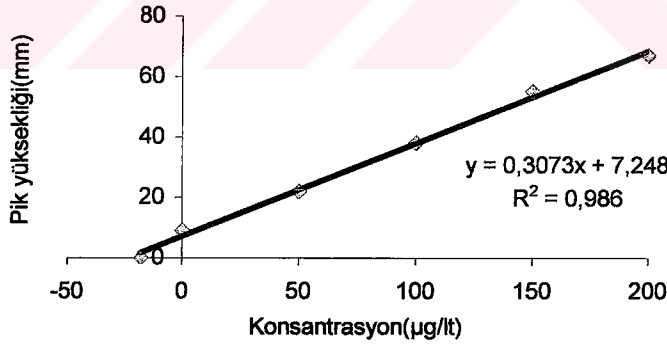
Gerekli Çözeltiler

- * Derişik hidroklorik asit
- * Derişik perklorik asit
- * Derişik nitrik asit
- * 2,5 M formik asit
- * 0,1 M EDTA çözeltisi
- * n-hekzan ya da toluen
- * 4 N Amonyak çözeltisi
- * 1500 ppm derişimde 3,3-diamino benzidin

Ölçüm

Selenyum tayini için 1-0.5 ml serum örneği 5.0 ml perklorik asit/nitrik asit (1/5;v/v oranında) karışımında teflon bomba içerisinde 120°C da etüvde 12 saat bekletilerek parçalandı (90). Daha sonra oda sıcaklığına kadar soğutulan parçalanmış örnek üzerine ortamın derişimi 4N HCl olacak şekilde derişik HCl ilave edilerek 90°C'da su banyosunda 15 dk ısıtılarak ortamda HNO₃ etkisiyle +6 değerliğe yükseltgenmiş olan selenyumun +4 değerlikliğe indirgenmesi sağlandı. Daha sonra oda sıcaklığına soğutulan örnekler üzerine 0.1 M EDTA çözeltisinden 5ml ve 2.5 M HCOOH çözeltisinden de 2 ml katılarak karıştırıldı. Daha sonra ortamın derişimi 1

mg/ml olacak şekilde 1,2-diaminobenzidin çözeltisi katılarak karıştırıldı. Kompleks oluşumu için 4N amonyak (NH₃) ile pH 1.5'e ayarlandı. Kompleks oluşumunun tamamlanması için karanlıkta 60 dk bekletildi. Sürenin sonunda örnekler üzerine 0.5 ml n-hegzan ilave edilerek ayırma hunisine alındı ve iyice karıştırıldı. Ayırma hunisinde üstteki n-hegzan fazı bir tüpe alındı. Tüpe alınan n-hegzan fazından 20 µl alınarak HPLC'de [Supelcosil LC-18-DB (15cmx4.6mm, 5µm)] kolonuna enjekte edildi. HPLC'de dalga boyu 330 nm mobil faz 1:1 oranında metanol su karışımı pH: 4) kullanılarak akış hızı 1 ml/dk'ya ayarlandı. Standart ekleme metodunda herbir serum örneğinden 1.0'er ml dört ayrı erlene alınarak bir tüp hariç diğer dört tüpe sırasıyla ortamın selenyum derişimi 50 ppb (µg/lt), 100 ppb, 150ppb ve 200 ppb olacak şekilde standart stok selenyum çözeltisi katılarak yukarıda belirtilen tüm işlemler aynen uygulandı ve çalışma grafiğinde selenyum eklenmeyen pik yüksekliği değerinden geçecek şekilde diğer noktalar birleştirilerek ekstrapole edilip örnekteki selenyum miktarı hesaplandı. Burada amaç ortamda selenyum tayininde interferans yapan metal iyonlarının interferansını önlemektir.



Şekil XVII: Selenyum standart grafiği.

3.5. İstatistiksel Analiz

Verilerin normal dağılıma uyup uymadığını test etmek için nonparametrik testlerden “One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test” yapılmış olup sonuçlar aşağıdaki tabloda sunulmuştur,

Tablo III: One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test sonuçları

		One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test						
		GSH-PX	GSH	GSSG	MDA	Se	YAS	HİDROKSI PROLİN
N		60	60	60	60	60	60	60
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	,4949	4,5324	4,555E-02	,5683	121,5500	25,8000	15,9258
	Std.Dev.	9,443E-02	,4892	5,844E-03	,1231	26,1109	7,5729	2,2346
Most Extreme Differences	Absolute	,125	,091	,102	,071	,100	,159	,129
	Positive	,125	,091	,102	,071	,073	,159	,106
	Negative	-,086	-,048	-,081	-,066	-,100	-,089	-,129
Kolmogorov- Smirnov Z		,970	,706	,790	,551	,776	1,230	1,002
Asymp. Sig. (2-tailed)		,303	,702	,560	,922	,583	,097	,268

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Yukarıdaki tabloda görüldüğü üzere, tüm parametrelere ait değerlerin dağılımı herbiri için normal dağılıma uymaktadır. p değeri sırasıyla GSH-Px için 0,303; GSH için 0,702; GSSG için 0,560; MDA için 0,922; Se için 0,583; Hidroksiprolin için 0,268 ve deneye alınan bireylerin yaşları için 0,097 olup tüm p değerlerinin 0,05’den büyük olması normal dağılıma uygunluğu gösterir.

Bu noktada gruplar arasında fark olup olmadığını incelemek için “Bağımsız Gruplarda t-Testi” kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Numunelerin (Vitiligo ve Kontrol) genel bilgileri,

Tablo IV: "VİTİLİGO GRUBU" genel bilgileri

No	Ad-Soyad	Cinsiyet	Yaş	Kaç yıldır vitiligo	Sigara kullanımı	Meslek	Geçirdiği başka hast.
1	F.K.	K	31	3	-	Ev hanımı	yok
2	H.C.	E	42	3	-	Öğretmen	yok
3	K.Ş.	K	18	2	-	Öğrenci	yok
4	N.Y.	K	18	2	-	Ev kızı	yok
5	M.T.	K	20	5	-	Ev kızı	yok
6	B.T.	E	18	3	-	Öğrenci	yok
7	A.Y.	E	25	4	+	Öğrenci	yok
8	A.G.	K	23	3	-	Öğrenci	yok
9	İ.K.	E	19	4	-	Öğrenci	yok
10	H.B.	K	43	10	-	Ev hanımı	yok
11	Ç.C.	K	18	2	-	Ev hanımı	yok
12	C.A.	K	16	2	-	Öğrenci	yok
13	R.B.	K	17	2	-	Öğrenci	yok
14	G.Ö.	K	28	10	+	Memur	yok
15	S.Ç.	K	30	5	-	Ev hanımı	yok
16	H.D.	E	19	2	-	Öğrenci	yok
17	O.D.	E	19	3	-	Öğrenci	yok
18	Y.A.	E	20	2	-	Öğrenci	yok
19	Y.K.	E	29	3	+	Memur	yok
20	R.Ö.	E	22	7	+	Öğrenci	yok
21	M.Ş.	K	30	5	-	Ev hanımı	yok
22	P.K.	K	21	4	+	Öğrenci	yok
23	M.K.	E	19	2	-	Öğrenci	yok
24	S.K.	K	12	2	-	Öğrenci	yok
25	H.M.	K	20	3	+	Öğrenci	yok
26	L.A.	E	33	12	+	Memur	yok
27	M.K.	K	28	5	+	Ev hanımı	yok
28	A.Ö.	K	21	4	+	Öğrenci	yok
29	M.Ç.	K	33	6	-	Öğretmen	yok
30	Y.A.	K	18	3	-	Ev kızı	yok

Tablo V: "KONTROL GRUBU" genel bilgileri

No	Ad-Soyad	Cinsiyet	Yaş	Sigara kullanımı	Meslek	Geçirdiği başka hast.
1	B.K.	K	29	-	Doktor	yok
2	T.A.	K	27	+	Asistan	yok
3	Y.B.	E	31	+	Doktor	yok
4	G.B.	K	22	-	Öğrenci	yok
5	İ.Ç.	K	28	-	Asistan	yok
6	M.K.	K	23	+	Öğrenci	yok
7	O.İ.	E	32	-	Doktor	yok
8	M.A.	E	38	-	Doktor	yok
9	M.H.	E	19	-	Öğrenci	yok
10	S.Z.	E	21	-	Öğrenci	yok
11	N.T.	E	27	-	Doktor	yok
12	H.S.	K	29	-	Doktor	yok
13	G.M.	E	31	+	Memur	yok
14	K.N.	K	19	-	Öğrenci	yok
15	N.A.	E	17	-	Öğrenci	yok
16	T.S.	E	20	+	Öğrenci	yok
17	D.E.	E	32	-	Asistan	yok
18	R.C.	K	33	-	Memur	yok
19	D.U.	K	30	+	Öğretmen	yok
20	Ş.K.	E	33	+	Laborant	yok
21	N.İ.	K	34	-	Teknisyen	yok
22	F.T.	E	39	-	Öğretmen	yok
23	L.E.	K	19	-	Öğrenci	yok
24	D.M.	E	20	-	Öğrenci	yok
25	B.D.	E	41	+	Memur	yok
26	F.G.	K	18	-	Öğrenci	yok
27	A.F.	E	22	-	Öğrenci	yok
28	A.A.	E	28	-	Öğretmen	yok
29	M.N.	E	36	+	Laborant	yok
30	M.G.	E	30	-	Memur	yok

4.1. GSH-Px Enzim Aktivitesi Sonuçları

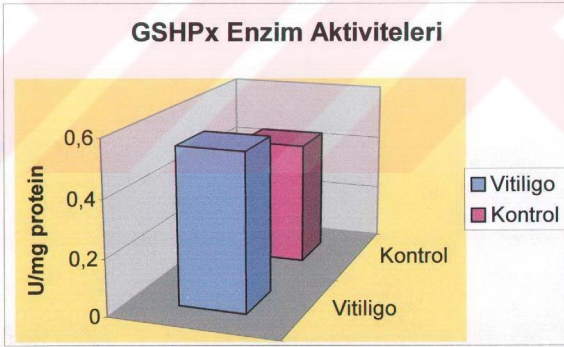
Vitiligolu hastaların plazma GSH-Px aktivitesi kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı olup sonuçların Aritmetik Ortalama \pm Standart Sapma değerleri aşağıdaki tabloda sunulmuştur.

Tablo VI: GSHPx aktivite düzeyleri.

Gruplar (n=30)	Art. Ort. \pm Std. Sapma
Vitiligo	0,550 \pm 0,077(U/mg prt)
Kontrol	0,439 \pm 0,075(U/mg prt)

$t = 5,646$ ve $p = 0,000$ 'dir.

GSHPx enzim aktivite düzeylerini grafikte ifade edecek olursak;



Şekil XVIII : GSHPx enzim aktivite düzeyleri

4.2. GSH Düzeyleri

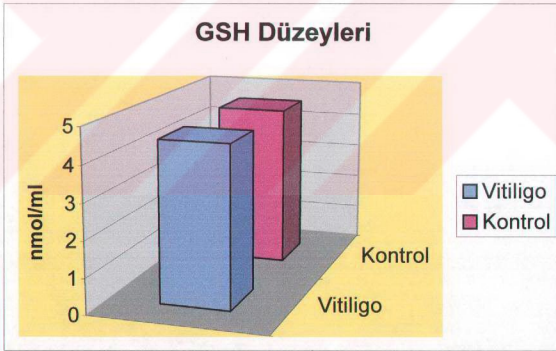
Vitiligolu hastaların plazma GSH düzeyleri kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmayıp sonuçların Aritmetik Ortalama \pm Standart Sapma değerleri aşağıdaki tabloda sunulmuştur

Tablo VII: GSH düzeyleri

Gruplar(n=30)	Art. Ort. \pm Std. Sapma
Vitiligo	4,497 \pm 0,486 (nmol/ml)
Kontrol	4,567 \pm 0,497 (nmol/ml)

t = -0,554 ve p = 0,582'dir.

Redükte glutatyon düzeylerini grafikte ifade edecek olursak;



Şekil XIX: GSH düzeyleri

4.3. GSSG Düzeyleri

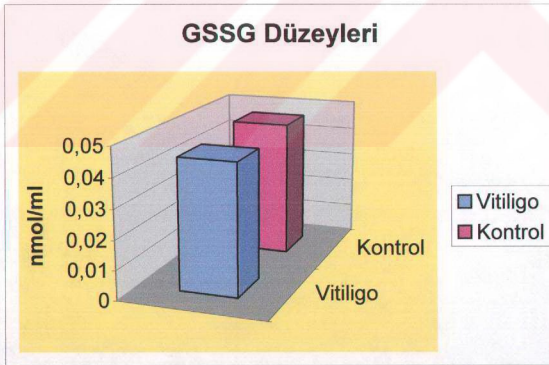
Vitiligolu hastaların plasma GSSG düzeyleri kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmayıp sonuçların Aritmetik Ortalama \pm Standart Sapma değerleri aşağıdaki tabloda sunulmuştur,

Tablo VIII: GSSG düzeyleri

Gruplar(n=30)	Art. Ort. \pm Std. Sapma
Vitiligo	$4,45 \times 10^{-2} \pm 0,6 \times 10^{-2}$ (nmol/ml)
Kontrol	$4,66 \times 10^{-2} \pm 0,55 \times 10^{-2}$ (nmol/ml)

$t = -1,403$ ve $p = 0,166$ 'dır.

Okside glutatyon düzeylerini grafikte ifade edecek olursak;



Şekil XX: GSSG düzeyleri

4.4. GSSG/GSH Oranı

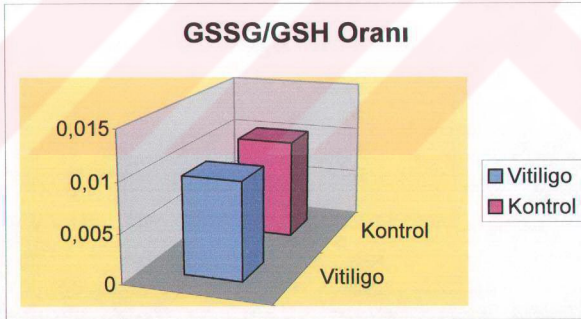
Okside glutatyonun, redükte glutatyonu oranı glutatyon siklüsü için önemli bir göstergedir. Sonuçlarımıza göre vitiligolu hastaların GSSG/GSH oranı ile kontrol grubunun GSSG/GSH oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır. Aritmetik Ortalama \pm Standart Sapma değerleri aşağıdaki tabloda sunulmuştur

Tablo IX: GSSG/GSH oranları

Gruplar(n=30)	Art. Ort. \pm Std. Sapma
Vitiligo	$9,901 \times 10^{-3} \pm 9,162 \times 10^{-4}$
Kontrol	$1,021 \times 10^{-2} \pm 6,317 \times 10^{-4}$

$t = -1,505$ ve $p=0,138$ 'dir.

Okside glutatyon/redükte glutatyon oranı düzeylerini grafikte ifade edecek olursak;



Şekil XXI: GSSG/GSH oranları

4.5. MDA Düzeyleri

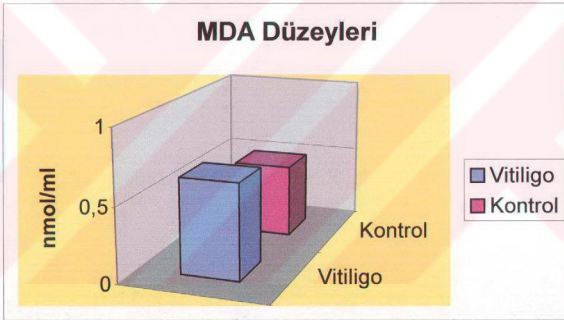
Vitiligolu hastaların plasma MDA düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı olup sonuçların Aritmetik Ortalama \pm Standart Sapma değerleri aşağıdaki tabloda sunulmuştur,

Tablo X: MDA düzeyleri

Gruplar(n=30)	Art. Ort. \pm Std. Sapma
Vitiligo	0,6423 \pm 0,110(nmol/ml)
Kontrol	0,4943 \pm 0,085(nmol/ml)

t = 5,805 ve p=0,000'dır.

MDA düzeylerini grafikte ifade edecek olursak;



Şekil XXII: MDA düzeyleri

4.6. Selenyum Düzeyleri

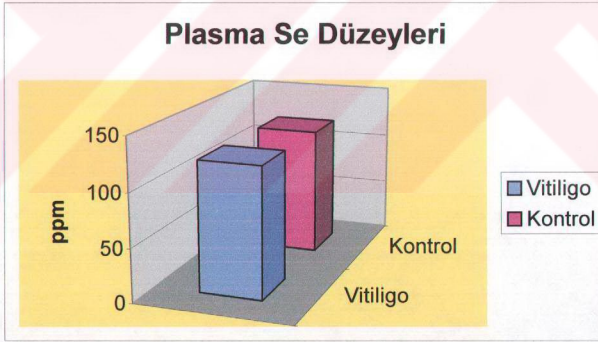
Vitiligolu hastaların plasma Selenyum düzeyleri kontrol grubuna göre çok hafif düzeyde yüksek bulunmuştur. Ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmayıp sonuçların Aritmetik Ortalama \pm Standart Sapma değerleri aşağıdaki tabloda sunulmuştur,

Tablo XI: Selenyum düzeyleri

Gruplar(n=30)	Art. Ort. \pm Std. Sapma
Vitiligo	122,333 \pm 30,173(ppm)
Kontrol	120,766 \pm 21,802(ppm)

t= 0,231 ve p=0,819'dur.

Se düzeylerini grafikte ifade edecek olursak;



Şekil XXIII: Se düzeyleri

4.7. Hidroksi Prolin Düzeyleri

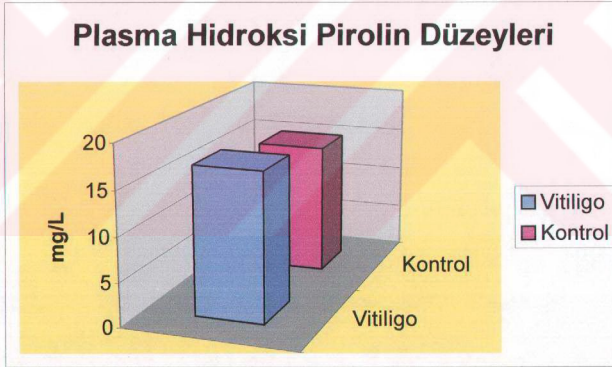
Vitiligolu hastaların plasma Hidroksi Prolin düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı olup sonuçların Aritmetik Ortalama \pm Standart Sapma değerleri aşağıdaki tabloda sunulmuştur,

Tablo XII: Hidroksi Prolin düzeyleri

Gruplar(n=30)	Art. Ort. \pm Std. Sapma
Vitiligo	16,841 \pm 1,856(mg/L)
Kontrol	15,013 \pm 2,231(mg/L)

t=3,455 ve p=0,001'dir.

Hidroksi Prolin düzeylerini grafikte ifade edecek olursak;



Şekil XXIV: Hidroksiprolin düzeyleri

5. TARTIŞMA

Vitiligo melanosit kaybı ile karakterize, oluşum mekanizması henüz tüm ayrıntıları ile aydınlatılamamış bir deri hastalığıdır. Şu ana kadar yapılan çalışmalarda hastalığın; genetik faktörlerin, değişime uğramış olan melanositlere karşı gelişmiş olan otoimmün reaksiyonların, katekolamin sentez siklusundeki aksaklıklar sonucu derişimi artan nörokimyasal mediatörlerin ve bozulmuş melanin sentezine bağlı biriken sitotoksik ara ürünlerin, zayıflamış antioksidan savunma sistemi sonucu bu moleküllerin yeterince detoksifiye edilememesinin ve henüz belirlenememiş ancak etkili olduğu varsayılan birtakım faktörlerin de etkisiyle gelişen progresif irreversible melanosit kaybının sonucunda ortaya çıktığı ileri sürülmüştür.(1,2,3,4,5,6,91). Ancak elde edilen veriler, bu metabolik aksaklıklar zincirinde tetikleyici basamağın hangisi olduğu, düzensizliğin hangi adımda ve neden başladığı yönünde net bir sonuç elde etmeye yeterli olamamıştır.

Melanositlerin bilinen temel fizyolojik fonksiyonları arasında hücrelerin güneş ışınlarının zararlı etkilerinden korunması, ısı kontrolünün sağlanması, toksik ve karsinojen maddelerin metabolize edilmesi ile normal metabolizma reaksiyonları sırasında oluşan reaktif oksijen moleküllerinin detoksifikasyonu sayılabilir (92). Ancak melanositlerin major fonksiyonu melanin sentezidir ve vitiligo görüntüsünün ortaya çıkmasındaki primer faktör, melanositlerin melanin sentez yeteneklerini yitirmesi ve derinin rengini belirleyen bu pigmentlerden yoksun kalmasıdır ki bu da derinin süt beyazı görüntüsüne bürünmesi ile sonuçlanmaktadır. Melanositlerin melanin sentez yeteneklerini yitirmesini epidermal melanosit kaybı izlemektedir. Yapılan çalışmalar vitiligoda lezyonel bölgelerde melanositlere ya hiç rastlanmadığı ya da çok az sayıda ama melanin sentez yeteneğinden yoksun melanositlerin saptandığını ortaya koymuşlardır (93,94,95). Son yıllarda yapılan çalışmalar melanositlerdeki fonksiyon kaybı ve melanosit yıkımının kaynağını araştırmaya yönelik olup ortaya atılan görüşler henüz hipotetiktir ve şu ana kadar patogenezi tüm ayrıntıları ile aydınlatılabilecek bulgular elde edilememiştir.

Başlangıçta hastalığa ait metabolik bozuklukların sadece lezyonlu bölgeye özgü olduğu sanılmakta idi ancak ilerleyen dönemlerde gerçekleştirilen çalışmalar göstermiştir ki; vitiligo oluşumu ile ilgili olduğu düşünülen metabolik yollardaki

aksaklıklar nonlezyonel bölgelerde de ortaya çıkmaktadır, ancak pathogenez lezyonel bölgede daha hızlı ilerlemekte, lezyonun hemen yakınındaki deride daha yavaş, uzak bölgelerde ise çok daha yavaş ilerlemekle beraber tüm deride aynı aksaklıklar değişen hızlarda ve devamlı olarak cereyan etmektedir (96). Hastalıkla ilgili moleküler bulguların tüm deride gözlenmesi araştırmacıları hastalığın etkilediği sistemleri kanda da araştırmaya itmiş ve katekolaminler, oksidan/antioksidan sistem bileşenleri, eser elementler gibi pek çok önemli parametrenin kandaki düzeylerinin de etkilendiğini saptamışlardır (97,98,99).

Vitiligoda lezyonlu derinin fenilalanin düzeyleri normal deriden daha yüksek, hastaların her iki derilerindeki fenilalanin düzeyinin de vitiligolu olmayan sağlıklı bireylerin derilerindeki fenilalanin düzeylerinden yüksek olduğu, tirozin düzeylerinin ise tam aksi yönde vitiligoda düşük bulunduğu saptanmış ve elde edilen bulgular ışığında vitiligo patogenezinin sadece lezyonel alanla ilgili değil tüm deri ile ilgili olduğu bir kez daha kanıtlanmıştır. Bununla birlikte şu ana kadar vitiligoda periferik fenilalanin birikimine ilişkin kesin bir bulguya rastlanmamıştır (14).

Epidermiste konsantrasyonu artan tetrahidrobiopterinlerin zamanla UV-ışınları etkisiyle ve moleküler oksijen varlığında okside biopterinlere dönüştüğünü söylemiştik, daha ileri oksidasyon sonucu ise biopterin karboksilik asitler oluşur. Biopterinlerin redoks siklüsü tetrahidrobiopterinlere bağımlı fonksiyon gören enzimlerin rol aldığı metabolik yolların kontrolü açısından oldukça önemlidir. Okside biopterinler kofaktör olarak işlev göremezler ve okside biopterinlerin belli bir konsantrasyonun üzerindeki düzeyleri melanositler için toksiktir. Organizmada tüm hücrelerde işlev gören ve bir antioksidan sistem bileşeni olan tioredoksin/tioredoksin redüktaz sistemi okside biopterinleri, kinonoid dihidrobiopterinlere dönüştürerek siklüse tekrar katılmalarını sağlar (100). Tioredoksin/tioredoksin redüktaz enzim sistemine ait bileşenlere özgü mRNA'lar melanosit ve keratinositlerde tanımlanmıştır ve bu sistemin epidermal fonksiyonları tüm ayrıntılarıyla ortaya konmuştur. Diğer bir yandan Tioredoksin Redüktaz aktivitesi Ca^{++} iyonları tarafından regüle edilir, dolayısıyla biopterinlerin redoks siklüsünün düzenlenmesinde kalsiyum iyonu önemli bir faktördür (101).

Schallreuter ve arkadaşları, yapmış oldukları çalışmaları sonucunda vitiligolu

keratinosit ve melanositlerde kalsiyum transportunun defektli olduğunu rapor etmişlerdir(21,26). Normal insan keratinositlerinde β_2 -adrenoceptor'lerinin stimülasyonu adenilat siklaz/cAMP kaskatı ile gerçekleştirilir ve bu sistemin regülasyonunda hücre içi kalsiyum konsantrasyonu kritik öneme sahiptir. Araştırmacıların bulgularına göre vitiligolu keratinositlerde kalsiyum alımını kontrol keratinositlerine göre 5 kat azalmış durumdadır (21). Kalsiyum homeostazisindeki bozukluk sonucunda β_2 -adrenoceptor ekspresyonu da kontrol edilememekte (102) ve aşırı ekspresyon nedeniyle keratinositlerde başkalaşım ortaya çıkmaktadır. Öte yandan aynı araştırmacılar vitiligoda keratinositlerde olduğu kadar melanositlerde de kalsiyum transport bozukluğunun söz konusu olduğunu saptamışlardır (26), ancak katekolamin sentezi keratinositlerde gerçekleştiği için bu bozukluğun keratinositlere olan etkisi daha dramatik bir biçimde kendini göstermektedir. Bu çalışmada ortaya konan bir diğer önemli bulgu ise vitiligolu hastaların epidermal kalsiyum transport ve homeostazisindeki bozukluğun tüm deride değişik oranlarda gözleniyor olması diğer bir ifadeyle aksaklığın sadece lezyonel bölgeyle sınırlı kalmayıp tüm deriyi kapsıyor olmasıdır.

Düşük intrasellüler kalsiyum düzeyleri tioredoksin/tioredoksin redüktaz sisteminin de daha yavaş işlemesine hatta zaman zaman bloke olmasına neden olur (101). Tioredoksin/tioredoksin redüktaz sistemi hem melanositler hem de keratinositler için sitotoksik olan okside biopterinlerin kinonoid dihidrobiopterinlere dönüştürülerek sıklüse tekrar girmesini sağlayarak bu hücreler için çok önemli bir antioksidan savunma gerçekleştirmiş olur. Bozulan kalsiyum transportu sonucu tioredoksin/tioredoksin redüktaz antioksidan savunma sisteminin yeterli çalışmaması nedeniyle hücreler bu savunmadan yoksun kalarak bahsedilen toksik metabolitlerin sitotoksik etkilerine maruz kalmaktadırlar.

Nöral yaklaşıma göre vitiligo başlangıcında emosyonel stresin tetikleyici rol oynadığı ileri sürülmektedir(1,2,3,4,5). Bilindiği üzere emosyonel stres durumunda pre-sinaptik hücrelerden katekolaminlerin salınımı artmaktadır, zaten yapılan çalışmalarda vitiligoda plasma ve idrarda norepinefrin ile bazı katekolamin yıkım ürünlerinin konsantrasyonları yüksek bulunmuştur. Yüksek konsantrasyondaki norepinefrin monoamin oksidaz (MAO) tarafından 3,4-dihidroksi mandelik aldehide (23) ve bir başka metabolik enzim olan katekol-o-metil transferaz (COMT)

tarafından 3,4-dihidroksi fenil asetaldehite dönüştürülür(22). Oluşan bu fenolik yapılar tirozinaz enziminde kompetitif inhibisyona neden olurlar. Ayrıca fenolik yapıdaki bu ara ürünler DNA sentezinden pek çok enzim fonksiyonuna kadar birçok hücrel prosesi etkiler, hücrenin hayati fonksiyonlarında kayba neden olurlar. Dahası ortaya çıkan bu sitotoksik yapılar, otooksidasyona müsait yapılar olup, otooksidasyonları sonucu hem kendileri reaktif kinonoid radikallere dönüşür hem de ortamdaki reaktif oksijen radikallerinin konsantrasyonlarının artmasına neden olurlar. Oluşan reaktif radikalik moleküller melanosit ve keratinositlerde ciddi yapısal ve fonksiyonel bozukluklar oluştururlar. Strese bağlı katekolamin salınımındaki artışın bir diğer sonucu da deri ve mukozal arterlerdeki α -reseptörlerinin aktivasyonu sonucu vazokonstrüksiyon meydana gelmesidir ve bu da epidermal ve dermal hipoksi ile sonuçlanır. Oluşan hipoksi sonucu serbest oksijen radikalleri üretimi önemli ölçüde artar ve meydana gelen radikallerden hücrelerin hasar görmesi kaçınılmazdır. Bu mekanizma, vitiligoda kan antioksidan düzeylerinin değişiminin açıklanabilmesine de katkıda bulunmaktadır. Schallreuter ve arkadaşları vitiligoda *pseudocatalase* uygulanması ile repigmentasyonun yeniden sağlanabildiğini ve vitiligoya ait bulguların azaldığını saptamışlardır (103).

Şu ana kadar ki tartıştığımız noktalar vitiligoya daha çok nöral ve sitotoksik yaklaşımlarla ilişkili olup epidermal melanin sentez ve dağılımı ile ilgili problemlerin olası kaynaklarını anlamaya yönelik idi. Ancak vitiligolu hastalarda özellikle lezyonel alanlarda major bulgulardan bir tanesi de melanosit sayısındaki azalma hatta alanın tamamen melanositlerden yoksun olmasıdır. Araştırmacılar nöral ve sitotoksik çalışmalarla vitiligoda melanosit ve keratinositlerdeki defektli metabolik yolları tespit etmiş, sonuçlarının epidermal hücrelerdeki fonksiyon kaybı ile olan bağlantılarını ortaya koymuş ancak melanosit yıkımı ve ilgili süreci aydınlatmaya çalıştıklarında, daha önceki bulgular ışığındaki yaklaşımlarını “otoimmün” mekanizma ile kombine etmek durumunda kalmışlardır. Şöyle ki; vitiligoda bozulan metabolik mekanizmalar sonrası konsantrasyonları artan sitotoksik metabolitlerin gerek hücre membran yapısında gerek fonksiyonel proteinler üzerinde oksidasyon ve benzer girişimler sonrası bir takım morfolojik değişiklikler oluşturmaktadır. Öte yandan epidermal hücrelerde yüzey antijenlerinde önemli yapısal değişimler histokimyasal çalışmalarla belirlenmiştir (104,105,106). Tüm bu değişiklikler bu hücrelere karşı immün reaksiyonları tetiklemektedir. Nitekim

vitiligoda tespit edilmiş olan epidermal lenfosit infiltrasyonundaki artış bu yaklaşımı desteklemektedir. Öte yandan Halder ve arkadaşları (99) vitiligolu hastalarda periferik kan NK (natural killer) hücre düzeylerini kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek bulmuşlardır. Harning ve arkadaşları (107) vitiligolu hastalarda yüksek düzeyde antimelanosit antikolar tanımlamışlardır. Araştırmacılar vitiligoda melanosit kaybının sitolitik antikolar tarafından gerçekleştirdiğini iddia etmişlerdir. Pek çok araştırmacı benzer bulgularla vitiligodaki melanosit harabiyetinin immün reaksiyonlar sonucu meydana geldiği noktasında birleşmişlerdir.

Literatürdeki rapor edilmiş ilgili çalışmalardan edindiğimiz bulgular doğrultusunda, serbest radikal oluşumu ile depigmentasyon arasındaki ilişki net bir şekilde ortaya konmuştur. Öte yandan deride oluşan radikalleri detoksifiye etmekle sorumlu enzimatik ve nonenzimatik antioksidan savunma elemanları mevcuttur ve bunların düzeylerindeki değişim de vitiligo patogenezinde oldukça önemlidir. Epidermal enzimatik antioksidan savunma sisteminin major bileşenleri *katalaz, glutatyon peroksidaz ve tioredoksin redüktaz* dır.

Katalaz hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlayarak organizmaya antioksidan savunma sağlar (50). Vitiligoda epidermal derişimi en yüksek düzeye ulaşan reaktif oksijen molekülü hidrojen peroksittir ve oluştuğu noktada derhal detoksifiye edilmesi gerekir. Kendisi bir radikal olmayan ancak özellikle membran lipitlerinde peroksidatif hasar meydana getiren hidrojen peroksitin major toksik etkisi metal iyonlarıyla etkilişimi sonucu oluşturduğu hidroksil radikalinden kaynaklanmaktadır. Schallreuter KU ve arkadaşları vitiligolu hastalarda epidermal katalaz aktivitesinin azalmış olduğunu saptamışlardır (32). Glutatyon peroksidaz da benzer şekilde hidrojen peroksit ve organik peroksitlere karşı detoksifikasyon yeteneğine sahiptir ve aynı araştırmacılar epidermal glutatyon peroksidaz aktivitesinde de azalma saptamışlardır. Bir diğer dikkate değer bulgu ise her iki enzimin de sentezinde rol alan mRNA düzeyleri normal ancak aktiviteleri düşüktür (96). Bu demektir ki enzim sentezinde bir sorun bulunmamaktadır ancak ya sentez sonrası gereken modifikasyonlarda bir aksaklık bulunmaktadır ya da enzim sonradan oksidan ajanlar etkisiyle inhibisyona uğramaktadır.

İlk zamanlar vitiligodaki metabolik defektlerin sadece lezyonun olduğu bölge ile

ilgili olduğu sanılmaktaydı. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar vitiligonun sadece lezyonel bölgeye özgü olmadığını tüm deriyi kapsadığını ortaya koymuştur. Daha sonraki çalışmalar biriken reaktif oksijen moleküllerinin diffüzyon yeteneklerinin ve radikalik zincir reaksiyonlarının sonucunda olduğu noktalardan daha uzak bölgelerde de etki gösterebileceğini göstermiştir. Herrling ve arkadaşları (108) elektron spin rezonans tekniği kullanarak yaptıkları çalışmalarında epidermal reaktif oksijen moleküllerinin deride çok hızlı diffüze olabildiğini göstermişlerdir. Öte yandan vitiligolu hastalarda epidermal iskeminin de gerçekleştiğinin bilinmesi araştırmacıları hastalığın kan düzeylerini de etkileyip etkileyemeyeceği noktasında yoğunlaştırmış, daha sonra vitiligo ile ilgili çalışmalar kanda da sürdürülmüş ve antioksidan parametrelerle birlikte özellikle katekolamin ve metabolitleri düzeylerinin de önemli ölçüde değişime uğradığı saptanmıştır(20,97,98,109).

Biz bu çalışmada benzer bir yaklaşımla yola çıkarak plazma antioksidan savunma sisteminin değerlendirilmesine yardımcı olabilecek parametrelerden glutatyon peroksidaz, okside glutatyon, redükte glutatyon, selenyum, malondialdehit ve hidroksiprolin düzeylerini ölçtük.

Sonuçlarımıza göre vitiligolu hastaların plazma glutatyon peroksidaz aktivitesi kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur ($p<0,01$). Primer olarak hidrojen peroksidin detoksifikasyonundan sorumlu olan enzimin vitiligo epidermisinde düşük düzeylere sahip olduğu bilinmektedir. Epidermisteki bu durum, muhtemelen epidermal hidrojen peroksid birikiminin aşırı olması ve bu arada konsantrasyonları fizyolojik sınırların çok üzerine çıkan serbest radikallerin enzim yapısında meydana getirdikleri oksidatif hasarlardan kaynaklanmaktadır. Çünkü enzimin ekspresyonunda bir problem olmadığı mRNA düzeyi ölçümleriyle kanıtlanmıştır (96). Epidermal glutatyon peroksidaz, katalaz ve tioredoksin redüktaz enzim aktivitelerinin azalmış olması ortamdan hidrojen peroksid ve diğer radikallerin temizlenememesine neden olur ve radikaller kolaylıkla yarı ömürleri ve konsantrasyonları ölçüsünde diffüzyonla epidermis içerisinde yayılabilirler. Bu arada bir kısım radikalın başlatmış olduğu radikalik zincir reaksiyonlar epidermal bileşenleri oluşturan moleküller arasında koordine elektron aktarımıyla devam eder ve bu reaksiyonların periferal damarları etkileme olasılığı oldukça yüksektir. Bu durum vitiligolu hastalarda dolaşımda oluşabilecek oksidatif hasarın muhtemel

kaynaklarından bir tanesidir. Öte yandan bir diğer kaynak ise vitiligoda epidermal arterlerde oluşan iskemidir. Angel ve arkadaşları (110) rodentlerde yapmış oldukları bir çalışma sonucunda, derideki yaygın iskemi sonucu kan süperoksit dismutaz enzim aktivite düzeylerinde azalma, ksantin oksidaz ve malondialdehit düzeylerinde artış saptamışlardır. Her iki şekilde de meydana gelebilecek oksidatif stresin ortadan kaldırılabilmesi amacıyla organizma glutatyon peroksidaz enzim ekspresyonunu artırarak yanıt oluşturmuş olabilir. Literatürde artan radikal konsantrasyonlarının ilgili enzim ekspresyonunu indüklediği yönünde bulgular mevcuttur (109). Bununla birlikte Beazley ve arkadaşları (98) çalışmalarında vitiligoda kırmızı kan hücrelerinde glutatyon peroksidaz aktivitesini sağlıklı bireylerle karşılaştırmışlar ve anlamlı bir fark bulamadıklarını belirtmişlerdir, ancak kırmızı kan hücrelerinde glutatyon peroksidaz ile birlikte katalaz enzimi de peroksidatif ajanların detoksifikasyonunda görev alır ve ortamdaki peroksitlerin temizlenmesi gen düzeyinde bir düzenlenmeye gerek kalmaksızın katalazın katkısıyla giderilmiş olabilir. Öte yandan plazmada dikkate değer düzeyde katalaz aktivitesi bulunmamaktadır ve peroksitlerin detoksifikasyonundan sorumlu major enzim glutatyon peroksidazdır.

Aynı çalışmada araştırmacılar vitiligolu hastaların plazma selenyum konsantrasyonlarını ise kontrole göre yüksek bulmuşlardır ancak araştırmacılar bu yüksekliğin nedenini açıklayan bir olası mekanizma öne sürmemişler selenyum sonuçlarını net bir şekilde yorumlamamışlardır. Bizim bulgularımızda ise selenyum düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Selenyum organizmada primer olarak glutatyon peroksidazın kofaktörü olarak görev yapmakta ve kanda çoğunlukla organoselenür bileşikleri halinde bulunup gerekliliği halinde selenür iyonu halinde serbest kalmaktadır (79,81,83) . Vitamin E'nin dolaşımdaki taşınımı da organoselenür bileşikleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Kandaki serbest selenyum ile organoselenür bünyesindeki selenyum içeriği arasında dinamik bir denge olup total selenyum düzeylerinin kanser gibi hastalıklarda azaldığı rapor edilmiştir(81,82). Selenyum glutatyon peroksidaz bünyesinde yer almasının dışında serbest selenyum halindeyken de önemli düzeyde redoks potansiyeline sahiptir ve elementel formda da antioksidan etki gösterebildiği iddia edilmektedir. Maruyama ve arkadaşları (111) toksik kimyasal maddelere maruz kalındığında kandaki toksik maddelerin düzeyi ile total selenyum düzeyi arasında negatif bir korelasyon olduğunu rapor etmişlerdir.

Selenyumun epidermal pigmentasyonda herhangi bir rolü olup olmadığı net bir şekilde aydınlatılabilmemiş değildir. Melanin sentezi sırasında selenyuma bağımlı fonksiyon gören bir enzim bulunmamaktadır ancak vitiligoda azalan epidermal glutatyon peroksidaz aktivitesi ile selenyum düzeyleri arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılabilir. Vinton ve arkadaşları 2 yıl süreyle selenyum içermeyen total parenteral besin alan dört çocuğun üçünde saç ve deride depigmentasyon olduğunu saptamışlardır (112). Aynı çocukların serum selenyum düzeyleri de düşük bulunmuştur. Araştırmacılar çocuklara selenyum takviye ederek pigmentasyonun yeniden kazanılabildiğini rapor etmişlerdir. Passi ve arkadaşları (33) aktif vitiligolu hastaların epidermisinde vitamin E ve redükte glutatyon düzeylerinin kontrol grubuna göre önemli düzeyde düşük olduğunu ve bunun sonucunda da artmış lipoperoksidatif süreç tespit etmişlerdir. Sonuç olarak vitiligolu hastalarda vitamin E ve selenyum desteğinin tedavi edici rolü olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Bulgularımıza göre, vitiligolu olgularda plazma redükte glutatyon (GSH), okside glutatyon (GSSG) ve GSH/GSSG oranları istatistiksel olarak anlamlı bir fark içermemektedir. Glutatyon hem kendisi moleküler yapı özellikleri (bünyesinde taşıdığı sülfhidril grubu) nedeniyle antioksidan yeteneğe sahip bir tripeptiddir, hem de hidrojen peroksidin detoksifikasyonunda glutatyon peroksidazın temel substratı olarak rol oynar(74,75,76). Yüksek glutatyon peroksidaz aktivitesinin beraberinde GSH tüketiminde de bir artışa neden olması beklenir ancak verilerimiz vitiligo plazma redükte glutatyon düzeylerinin kontrol grubu değerlerine yakın olduğunu göstermektedir. Artmış glutatyon peroksidaz aktivitesinin redükte glutatyon tüketiminde bir artış ile paralel olmaması teorik olarak çok zordur ancak bu her zaman ortamdaki redükte glutatyon düzeyinin azalmasıyla korele bir biçimde seyretmeyebilir çünkü redükte glutatyon tüketiminin artması ortamdaki azalan redükte glutatyon düzeyini kompanse etmek üzere glutatyon siklüsünün hızlanması ile sonuçlanır, şöyle ki, redükte glutatyon tüketim hızının artması ile birlikte okside glutatyonun, NADP/NADPH siklüsü tarafından tekrar redüksiyonu ile rejenerasyonu da daha hızlı bir şekilde sağlanacaktır. Zaten bulgularımızda vitiligoda okside glutatyon düzeyinde bir yükselme eğilimi göze çarpmaktadır ancak fark anlamlı olmadığı için bu yükselme ayrıca değerlendirilmeyecektir. Bu bağlamda yapılacak sonraki çalışmalarda glutatyon redüktaz aktivitesinin ya da

NADP/NADPH oranlarının saptanmasının vitiligoda glutasyon siklüsünün değerlendirilmesinde daha aydınlatıcı bilgiler verebileceğini düşünmekteyiz.

Malondialdehit bir lipit peroksidasyon ürünü olup proteinlerin amino gruplarına, fosfolipitlere ve nükleik asitlere bağlanarak toksik etki gösterir. Biyolojik örneklerdeki MDA düzeyi oksidatif stres parametrelerinden biri olarak kabul görmekte hatta peroksidatif hasarın spesifik göstergesi olarak değerlendirilmektedir (113). Glutasyon peroksidaz hidrojen peroksitin yanısıra lipit peroksitlerinin de detoksifikasyonundan sorumludur. Artmış oksidatif stresle beraber artan lipit peroksidasyonuna organizmanın ilk refleksi glutasyon peroksidaz aktivitesinde bir üst düzenlemeye gitmektir ve bu düzenlemenin gen düzeyinde enzim ekspresyonunun artması yönünde olduğuna ilişkin bulgular rapor edilmiştir. Verilerimiz vitiligo plazmasında yüksek MDA düzeyleri içermektedir ($p<0,01$) ve bu yükseklik vitiligo oluşum sürecinde hidrojen peroksit üretiminin artmasıyla ilişkili olup glutasyon peroksidaz aktivitesindeki yükselmenin nedenlerinden biridir. Picardo ve arkadaşları (97) vitiligolu hasta plazmalarında bazı okside lipid düzeyleri ile MDA düzeylerini araştırmışlar ve bizim sonuçlarımızla paralel şekilde yüksek MDA konsantrasyonları tespit etmişlerdir.

Şu ana kadar yapılmış olan çalışmalar arasında vitiligoda kollajen degradasyonu ya da protein oksidasyonu ile ilgili bir veri içeren araştırma bulunmamaktadır. Sonuçlarımız vitiligoda plazma hidroksiprolin düzeylerinin arttığını göstermektedir ($p<0,01$). Oksidatif stresin artmasıyla birlikte kollajen degradasyonu ve protein oksidasyonunun gerçekleşebileceğine yönelik bulgular vitiligo dışındaki bir takım patolojilerde ve oksidatif stresle ilişkilendirilebilecek şekilde dizayn edilmiş hayvan deneyleriyle kanıtlanmıştır (114). Prolin endojen bir aminoasit olup prolin hidroksilaz tarafından kollajen yapısının kritik bileşenlerinden biri olan hidroksiproline dönüştürülür. Öte yandan özellikle yüksek oksijen radikallerinin mevcudiyetinde prolin nonenzimatik yolla da hidroksiproline dönüşebilir (115). Bulgularımız vitiligoda yüksek plazma hidroksiprolin düzeylerini içermektedir. Ölçmüş olduğumuz yüksek hidroksiprolin düzeylerinin muhtemel iki kaynağı öngörülebilir; bir tanesi kollajen yıkımı sonucu serbest hale geçen hidroksiprolinin plazma hidroksiprolin düzeyini etkilemesi bir diğeri ise artmış serbest oksijen radikallerinin prolin aminoasitini nonenzimatik olarak radikalik

oksidasyon/hidroksilasyon ile hidroksiprolin'e dönüştürmek suretiyle plazma hidroksiprolin düzeylerini yükseltmesidir.

Sonuç olarak vitiligoda henüz tetikleyici faktörün tanımlanamamış olmasıyla birlikte tetrahidrobiopterin denovo sentezi ve ilişkili epidermal metabolik yolların bozulması sonucu vitiligolu hastaların lezyonlu alanlarında daha dramatik olmasının yanısıra tüm derilerinde ve daha sonraki çalışmalarda işaret edilip bizim çalışmamızla da desteklendiği üzere dolaşımında da oksidan/antioksidan denge bozulmakta, artan oksidan ajan düzeyleri epidermal metabolik yolların inhibisyonuna ve hücrelerde fonksiyonel ve morfolojik değişikliklere neden olmaktadır. Sonuçta bir yandan hücrelerin melanin sentez yetenekleri kaybolurken diğer yandan aktive olan immün mekanizmalar nedeniyle melanosit yıkımı meydana gelmekte ve vitiligo görüntüsü ortaya çıkmaktadır.

Son dönemde yapılan çalışmalarda, olumlu sonuçlar alındığı rapor edilen antioksidan terapinin, vitiligo tedavisinde alternatif bir yaklaşım olabileceğini ancak bu konuda araştırmalara devam edilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışma bulgularımız vitiligoda hastalığın etiopatogenezini aydınlatmaya yönelik daha önceki yapılmış çalışma bulgularını destekler niteliktedir. Araştırmacıların bulguları ve elde ettiğimiz veriler göstermektedir ki vitiligoda oksidan/antioksidan denge bozulmakta ve tanımlanmış olan metabolik düzensizlikler sadece lezyonel bölgede değil tüm deride hatta kanda da etkili olmaktadır.

Vitiligoda epidermal birikimi en yüksek olan reaktif oksijen molekülü hidrojen peroksittir ve artan hidrojen peroksit derişimi sonucu oksidan/antioksidan denge de zaman içerisinde bozulmaktadır. Araştırmacılar epidermal hidrojen peroksit birikiminin major kaynağının tetrahidrobiopterin sentezindeki bozukluğun ve aşırı üretilen kofaktörün UV etkisiyle oksidasyonunun sonucu olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu alanda yapılabilecek bundan sonraki çalışmalar tetrahidrobiopterin de novo sentezinin bozulmasındaki ilk basamak olan GTP- siklohidrolaz I enziminin nasıl indüklendiğini araştırmaya yönelik olmalıdır. Çünkü şu ana kadar ki bilgiler metabolik aksaklıklar zincirinin ilk halkasını bu enzimin çalışmasındaki nedeni belirsiz düzensizliğin oluşturduğunu göstermektedir.

Üzerinde yoğunlaşılması gereken bir diğer nokta ise fenilalanin hidroksilaz enziminin inhibisyon nedeninin araştırılması olmalıdır. Çünkü bu konudaki çalışmalarda enzimin esansiyel kofaktörü olan 6BH₄'e yapısal olarak çok benzeyen 7BH₄'ün enzimi kompetitif inhibisyonla inhibe ettiği yönünde bulgular ortaya konulmuştur. Oysa ortamdaki 6BH₄ derişimi, 7BH₄ derişiminden çok daha yüksektir ve böyle bir durumda kompetitif inhibisyon olasılığı düşüktür.

Ayrıca vitiligoda deride oluşabilecek muhtemel kollajen degradasyonu ve protein oksidasyonu ile ilgili detaylı araştırmalara ihtiyaç vardır. Özellikle sülfhidril gibi oksidasyona açık gruplar içeren aminoasitlerin oksidasyon ürünlerinin tespiti bu konuda fikir verebilir.

Öte yandan araştırmacılar vitiligo tedavisinde antioksidan moleküllerin kullanılabilirliğine yönelik çalışmalarla hastalar için yeni bir tedavi yaklaşımı geliştirmeye odaklanmalıdırlar.

**“VİTİLİGOLU HASTALARIN PLAZMA GSHPX, GLUTATYON
PEROKSİDAZ, GLUTATYON, SE, MALONDİALDEHİT VE
HİDROKSİPROLİN DÜZEYLERİNİN SAĞLIKLI BİREYLERLE
KARŞILAŞTIRILMASI”**

ÖZET

Vitiligo dünyada ve ülkemizde yaygın olarak görülen melanosit kaybı ile gelişen, depigmente makuler lezyonlarla karakterize, spesifik bir deri hastalığıdır. Halen etiopatogenezi tam olarak açıklanamamıştır. Vitiligonun oluşum mekanizmasını aydınlatılmaya yönelik çalışmalar sonucunda üç temel teori öne sürülmüştür; otoimmün teori, nöral teori ve otositotoksik teori. Pek çok araştırmacı vitiligoda epidermal dokuda hidrojenperoksit birikimi olduğunu ve bu reaktif oksijen molekülünün epidermal oksidatif strese neden olduğunu saptamışlardır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar vitiligoda meydana gelen mekanizma bozukluklarının sadece lezyonlu bölge ile sınırlı olmayıp tüm deri ile ilişkili olduğunu ortaya koydu. Hatta araştırmacılar hastalıkla ilişkili pek çok parametrenin epidermal doku düzeylerinin yanısıra kandaki düzeylerinin de değiştiğini gösterdiler. Antioksidan sistem elemanları bu parametrelerden sadece bir kısmını oluşturmaktadır. Pek çok hormon, enzim, aminoasit hatta eser element düzeyleri hastalığın ortaya çıkışı ile eşzamanlı olarak değişmektedir. Vitiligoda birçok metabolik yolun derinin tümünde aksıyor olması bu hastaların kandaki çoğu parametre düzeylerinin de etkilenme olasılığını artırmaktadır. Nitekim yapılan çalışmalar çoğu parametrenin kan düzeylerinin de hastalık süresince değiştiğini ortaya koymuştur.

Biz bu çalışmada benzer bir yaklaşımla yola çıkarak vitiligolu hastaların plazma antioksidan sisteminin göstergelerinden GSHPx, GSH, GSSG, MDA, Se ve Hidroksiprolin düzeylerini ölçtük. Çalışma, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Turgut Özal Tıp Merkezi'nin, Dermatoloji Polikliniği'ne başvurmuş olan vitiligo vulgaris'li ve yaş ortalaması $23,66 \pm 7,49$ olan 30 hasta ile herhangi bir dermatolojik problemi olmayıp yaş ortalaması $27,93 \pm 7,14$ olan 30

sağlıklı bireyden oluşturulan kontrol grubu üyeleri üzerinde yapıldı. Hasta ve kontrol grubu üyelerinden alınan numunelerin protein içerikleri Lowry yöntemi uyarınca yapıldı. Protein içerikleri saptanan numunelerde GSHPx aktivitesi için Lawrance yöntemi, GSH ve GSSG düzeyleri ölçümü için Owens yöntemi, MDA tayini için Okhawa yöntemi, Se için Arain yöntemi ve hidroksiprolin için Bergman yöntemi kullanıldı.

Elde ettiğimiz bulgular vitiligoda epidermal dokuda olduğu gibi plazmada da antioksidan sistemin meydana gelen mekanizmal aksaklıklardan etkilendiğini göstermektedir. Özellikle GSHPx, MDA ve hidroksiprolin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) artış saptanırken diğer parametrelerdeki değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$).

Sonuç olarak bulgularımız doğrultusunda vitiligolu hastaların epidermal dokularının yanısıra kanda da oksidatif stres parametrelerinin değişime uğradığını, vitiligo tedavisinde antioksidan sistemin desteklenmesinin de hastalıkla mücadelede yarar sağlayabileceğini ileri sürebiliriz.

SUMMARY

“THE COMPARISON OF THE GLUTATHIONE PEROXIDASE, GLUTATHIONE, SELENIUM, MALONDIALDEHIDE, AND HYDROXYPROLINE LEVELS IN THE PLASMA OF THE VITILIGO PATIENTS AND HEALTHY INDIVIDUALS”

Vitiligo; which is characterized with the loss of melanocyte and depigmented macular lesions, is a specific skin disease widely seen in the world and in our country. Its' etiopathogenesis hasn't been explained exactly yet. Three basic theories have been suggested at the result of the studies whose purpose was to clarify its formation mechanism; autoimmune theory, neural theory and autocytotoxic theory. Many researchers have determined that, in vitiligo, hydrogen peroxide accumulates in epidermal tissue and this reactive oxygen molecule causes epidermal oxidative stress.

Studies published recently have shown that, corruption in the mechanism which occur in the vitiligo are not limited just with the area of lesion but with the whole skin. The researchers have even showed that levels of many parameters related to the disease have changed in the blood as well as in the tissue. Antioxidant system compounds are only a part of those parameters. Levels of many hormones, enzymes, aminoacides and even trace elements change at the same time of the occurrence of the disease. As many metabolic paths of the whole skin is disrupted in vitiligo, levels of many parameters in the blood of those patients will probably be affected too. On the other hand, studies have indicated that blood levels of many parameters change during the disease .

In this study, using a similar approach we measured the indicators of plasma antioxidant systems such as GSHPx, GSH, GSSG, MDA Se, and Hydroxyproline of the patients with vitiligo. The study was performed both on 30 healthy individuals (mean age $27,93 \pm 7,14$) having no dermatologic problems and 30 patients (mean age $23,66 \pm 7,49$) having vitiligo vulgaris who applied Dermatology Policlinic in İnönü University Turgut Ozal Medical Center. The protein contents of samples taken

from the patients and control individuals were determined according to Lowry method. In the samples whose protein contents were determined, Lawrence method was used to measure GSHPx activity, Owens method was used to measure the levels of GSH and GSSG, Okhawa method was used to identify MDA level, Arian method was used to measure Se level and Bergman method was used to measure the hydroxyproline level.

In the vitiligo, our results show that, antioxidant system is affected by the mechanismlal corruptions in the plasma, as in the epidermal tissue as well. In the vitiligo patients, GSHPx, MDA and hydroxyproline levels are higher than those of control group ($p < 0,05$); the differences in the other parameters are not statistically significant ($p > 0,05$).

Finally, according to our results we suggest that, supporting antioxidant system contributes a lot to fighting with the disease, and oxidative stress parameters change in the blood of the patients with vitiligo as well as their epidermal tissues.

KAYNAKLAR

1) Mosher, D.B., Fitzpatrick, T.B., Hori, Y., Ortonne, J.P.: Disorders of Melanocytes. In : Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen AF, editors. *Dermatology in General Medicine*. 4th ed. United States of America:McGraw-Hill, 903-996, 1993.

2) Barnes, L., Nordlund, J.J.: Vitiligo. Abnormalities of Pigmentation. In: Demis DJ editor. *Clinical Dermatology*. 19th ed. Philadelphia: JB Lippincott Company, (11),25-33, 1992.

3) Kovacs, O.S.: Vitiligo. *J Am Acad Dermatol*, (38), 647-66, 1998.

4) Lerner, A.B.: Vitiligo. *J Invest Dermatol*, (32),285-310, 1959.

5) Bologna, J.L., Pawelek, J.M.: *Biology of hypopigmentation*. *J Am Acad Dermatol*, (19),217-255, 1988.

6) Ortonne, J.P., Bose, S.K.: Vitiligo:Where Do We stand?. *Pigment Cell Res*; (6), 61-72, 1993.

7) Akkuş, İ.: Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri., 2. baskı, Konya, Mimoza Yayınları, 1995.

8) Jaisankar, T.J., Baruah, M.C., Garg, B.R.: Vitiligo in children. *Int J Dermatol*, (31), 621-3, 1992.

9) Jimbow, K., Quevedo, W.C., Fitzpatrick, T.B., Szaobo, G.: Biology of Melanocytes. In : Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen AF, editors. *Dermatology in General Medicine*., 4th ed., United States of America, McGraw-Hill, 261-289, 1993.

10) Majumder PP, Das SK, Li CC. A genetical model for vitiligo. *Am J Hum Genet* 1988;43:119-125.

11) Majumder PP, Nordlund JJ, Nath SK. Pattern of familial aggregation of vitiligo. *Arch Dermatol* 1993;129:994-998.

12) Searle EA, Austin LM, Boissy YL, Zhao H, Nordlund JJ, Boissy RE. Smyth Chicken Melanocyte Autoantibodies: Cross-Species Recognition, in vivo binding and plasma membrane reactivity of the antiserum. *Pigment Cell Res* 1993;6:145-157.

13) Al'Abadie MSK, Senior HJ, Warren MA, Blehen SS, Gawkrödger DJ. Neuropeptide and neuronal marker studies in vitiligo. *Br J Dermatol* 1994;131:160-5.

14) Schallreuter, K.U., Wood, J.W., Ziegler, I.: Defective tetrahydrobiopterin and catecholamine biosynthesis in the depigmentation disorder vitiligo. *Biochim & Biophys Acta*, 181-192, 1994.

15) Le Poole, I.C., Das, P.K., Bos, J.D.: Review of the etiopathomechanism of vitiligo: A convergence theory. *Exp Dermatol*, (2), 145-153, 1993.

16) Naughton, G.K., Mahaffey, M., Bystryn, J.C.: Antibodies to surface antigens of pigment cells in vitiligo. *Proc Soc Exp Biol Med*, (181), 423-426, 1986.

17) Cui J, Arita Y, Bystryn JC. Cytolytic Antibodies to Melanocytes in Vitiligo. *J Invest Dermatol* 1993;100:812-815.

18) Yu HS, Kao CH, Yu CL. Coexistence and Relationship of antikeratinocyte and antimelanocyte antibodies in patients with non-segmental type vitiligo. *J Invest Dermatol* 1993;100:823-828

19) Al Badri AMT, Todd PM, Garyoch JJ, Gudgeon JE, Stewart DG, Goudie RB. An immunohistological study of cutaneous lymphocytes in vitiligo. *Journal of Pathology* 1993;170:149-155.

20) Morrone, A., Picardo, M., De Luca, C., Passi, S.: Catecholamines and vitiligo. *Pigment Cell Res.*, (5), 65-69, 1992.

- 21) Schallreuter, K.U., Pittelkow, M.P.: Defective calcium uptake in keratinocyte cell cultures from vitiliginous skin. *Arch Dermatol Res* (280), 137-140, 1988
- 22) Le Poole, I.C., Van den Wijngaard, R., Smith, N.P.M. : Catechol-o-methyl transferase in vitiligo. *Arch Dermatol Res*, (286), 81-86, 1994.
- 23) Schallreuter, K.U., Wood, J.M., Pittelkow, R.M., Buttner, G. : Increased monoamine oxidase A activity in the epidermis of patients with vitiligo. *Arch Dermatol*, (288), 14-18, 1996.
- 24) Köck, A., Schwartz, T., Kirnbauer, R. : Human keratinocytes as a source of TNF- α . *Skin Pharmacol* (3), 186-8, 1990.
- 25) Schallreuter, K.U., Wood, J.M. : Thioredoxin Reductase- its role in epidermal redox status. *J Photoch Photobio B*, 64(2), 179-84, 2001
- 26) Schallreuter, K.U., Pittelkow, M.P., Swanson, N.N. : Defective calcium transport in vitiliginous melanocytes. *Arch Dermatol Res.*, (288), 11-14, 1996.
- 27) Schallreuter, K.U., Moore, J., Wood, J.M.: Epidermal H₂O₂ accumulation alters tetrahydrobiopterin recycling in vitiligo: Identification of a general mechanism in regulation of all 6BH₄ dependent processes., *J Invest Dermatol*, 116 (1): 167-174, 2001.
- 28) Cheeseman, K.H., Slater, T.F.: An introduction to free radical biochemistry. *British Med Bull.*, (49), 479-490, 1993.
- 29) Slominski, A., Paus, R., Bomirski, A.: Hypothesis; possible role for melatonin receptor in vitiligo: discussion paper. *J Royal Soc Med.*, (82), 538-41, 1989.
- 30) Picardi, A., Abeni, D.: Stressful life events and skin diseases: Disentangling

evidence from myth. *Pschother Psychosom*, (3), 118-136, 2001.

31) Seyle, H. : Ischemic hypopigmentation. *Experienta*, (23), 524-28, 1967.

32) Schallreuter, K.U., Wood, J.M., Berger, J. : Low catalase levels in epidermis of patients with vitiligo. *J Invest Dermatol.*, (97), 1081-85, 1991.

33) Passi, S., Grandinetti, M., Maggio, M. : Epidermal oxidative stress in vitiligo. *Pigment Cell Res*, (11), 81-85, 1998.

34) Ziegler, I., Hültner, L. : Tetrahydro-6-biopterin is associated with tetrahydro-7-biopterin in primary murine mast cells. *FEEBS Lett.* (307), 147-150, 1992.

35) Vivar, V.J., Hoggs, N., Martasek, P. : Tetrahydrobiopterin-dependent inhibition os superoxide generation form neuronal nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 274(38), 26736-40, 2000.

36) Schallreuter, K.U., Wood, J.M., Pittelkow, M.R. : Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin. *Science*, (263), 1444-46, 1994.

37) Schallreuter, K.U. : GTP cyclohydrolase I and vitiligo. *Clin Exp Dermatol*, 25(8), 655-56, 2000.

38) Schallreuter, K.U., Zschesche, M., Moore, J. : In vivo evidence for compromised phenylalanine metabolism in vitiligo. *Biochem Bioph Res Com* 243(2), 395-399, 1998.

39) Jennings, I.G., Teh, T., Kobe, B. : Essential role of the N-terminal autoregulatory sequence in the regulation of phenylalanine hydroxylase. *FEBS Lett*, 488(3), 196-200, 2001

40) Moore, J., Wood, J.M., Schallreuter, K.U. : H₂O₂ mediated oxidation of

tetrahydrobiopterin: Fourier transform Raman investigations provide mechanistic implications for the enzymatic utilization and recycling of this essential cofactor.

J Raman Spectrosc, 33 (8),610-617, 2002.

41) Rokos, H., Beazley, W.D., Schallreuter, K.U. : Oxidative stress in vitiligo : Photo-oxidation of pterins produces H₂O₂ and pterin-6-carboxylic acid. *Biochem Bioph Res Com* 292(4), 805-811, 2002.

42) Raper, H.S.: The aerobic oxidases. *Physiol Rev.*, (8), 245-9, 1928.

43) Eisinger, M., Marko, O. : Proliferation of normal human melanocytes . *Proc Natl Acad Sci*, (79), 2018-29, 1982.

44) Hunn, K.S., Nordlund, J.J. : Vitiligo. 1 ed. London, Oxford Press, pp: 7-25.

45) Schallreuter, K.U., Wood, J.M. : Downregulation of tyrosinase activity in human melanocyte cell cultures by yohimbine. *J Invest Dermatol*, (115), 130-32, 2000.

46) Devi, G.S., Prasad, H.M., saraswathi, I. : Free radicals, antioxidant enzymes and lipid peroxidation. *Clin Chim Acta*, (293), 53-62, 2000.

47) Slater, T.F. : Free radical mechanism in tissue injury. *Biochem J.*, (222),1-15, 1984.

48) Tanugan, G., Koldaş, M., Uras, F. : Serbest radikaller. *Haseki Tıp Bülteni*, 32(4), 5-33, 1994.

49) Sies, H. : Role of reactive oxygen species in biological processes. *Clin Wochenschr.* (69), 965-68, 1994.

50) Barber, D.A., Harris, S.R. : Oxygen free radicals and antioxidants: A review. *J Am Pharm.* 34(9), 26-35, 1994.

51) Halliwell, B., Gutteridge, J.M.: Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Meth Enzymol.* (186), 1-85, 1990.

52) Moncada, S., Palmer, M.J., Higgs, A.E.: Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Am Sos Pharm Exp Ther*, 43(2), 109-139, 1991.

53) Southorn, A.P., Powis, G.: Free radicals in medicine. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc*, (63),381-89, 1988.

54) McCann, S.M. : The nitric oxide hypothesis of brain aging. *J Exp Gerantol*, (32),431-37, 1991.

55) Sentürker, S., Karahalil, B., Inal, M. : Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme level in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Febs Lett*, 416 (3), 286-290, 1997.

56) Dizdaroglu, M., Jaruga, P.: Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic Acids Res* 24 (8), 1389-94, 1996.

57) Sohal, S.R. : Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Rad Biol&Med*, (11), 37-43, 2002.

58) Högstrom, H. : Mechanism and prevention of decrease in wound margin strength. *Acta Chir Scand.*, (539), 50-63, 1987.

59) Değim, Z., Çelebi, N., Sayan,H. : An investigation on skin wound healing in mice with a taurine chitosan jel formulation. *Amino Acids*, (22),187-198,2002.

60) Yenson, M.: Prolin ve hidroksiprolin. İnsan Biyokimyası, İstanbul Üniv. Yayınları, İstanbul, pp: 400-02, 1973.

61) Murray, K., Mayes, P.A. : Kollajen sentez ve yapısı. Harper'ın Biyokimyası, 2 Ed., Barış yayınevi, İstanbul, pp: 805-809, 1993.

62) Voet, D., Voet, J.G. : Kollagen Synthesis. Biochemistry, 2Ed, John Wiley, New York, pp: 156-68, 1994.

63) Halliwell, B., Gutteridge, J.M. : Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant theory. *The Cancet*, (23), 1396-98, 1984.

64) Lee, S.C., Lee, J.W., Jung, J.E. : Protective role of nitric oxide mediated inflammatory response against lipid peroxidation in UV-B irradiated skin. *Brit J Dermatol*, 142 (4), 653-659, 2000.

65) Smith, E.L., Hill, R.R., Lehmann, I.R. : Principles of Biochemistry General Aspects. 7 Ed. Singapore, pp:323-26, 1985.

66) Dianzoni, M.V.: Lipid peroxidation and cancer. *Crit Rev Oncol Hepatol*, (15), 125-47, 1993.

67) Plactha, H., Bartnikowska, E., Obara, A. : Lipid reroxides in blood from patients with atherosclerosis of coronary and peripheral artheries. *Clin Chem Acta*, (211), 101-12, 1992.

68) Thornally, P.J.: Monosaccharide autooxidation in health and disease. *Environ Health Perspect*, (64), 297-307, 1995.

69) Lunec, J. : Free radicals. Their involvement in disease processes. Review. *Ann Clin Biochem*. (27), 173-82, 1990.

70) Van, L.F. : Free radicals , *Anal Biochem*. (65), 115-24,1993.

71) Vani, M., Panduranga, G. : Superoxide dismutase, catalase ,glutathione peroxidase and lipid peroxidation .*Biochem Int*, (21),17-26, 1990

72) Ames, B.N.: Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, (221),1256-64, 1983.

- 73) Yalçın, S.A. : Antioksidanlar. *Klinik Gelişim*, (11), 342-46, 1998.
- 74) Brittain, T., Tottle, B. : Glutathione in the red blood cells of embryonic mice. *Comp Biochem Physiol*, (83), 843-46, 1986.
- 75) Franson, J.C., Hoffman, D.J., Schmutz, J.A. : Blood Se Concentrations and enzyme activities related to glutathione metabolism. *JA Environ Toxicol Chem* 21(10),2179-84, 2002.
- 76) Mathy, M.J., Ronald, A. : Oxygen free radicals and glutathione in hepaticischemia reperfusion injury. *J Surg Res.* (50), 398-402, 1991.
- 77) İnal, M.E., Sunal, E., Kanbak, G. : Age related changes in the glutathione redox system. *Cell Biochem Func*, (20),61-66, 2002.
- 78) Harris, E.D.: Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J*, (6),2675-83, 1992.
- 79) Ozturk, I.C., Batcioglu, K., Karagozler A, Genc, M. Comparison of the selenium level with GSHPx activity in the liver of mice treated with 7,12 DMBA. *Cell Biochem Func* (209),115-18, 2002.
- 80) Chu, F., Esworthy, S.R., Doroshov, H.J. : Expression of plasma glutathione peroxidase in human liver in addition to kidney, heart, lung and breast in humans and rodents. *Blood*, (79), 3233-38, 1992.
- 81) Combs, G.F., Gray W.P.: Chemopreventive agents: Selenium. *Pharmacol Ther.*, 79(3), 179-92, 1999.
- 82) Mary, R., Peter W., Trick K.D.: Effect of dietary Se and tumor status on the retention of ⁷⁵Se by tissues and mammary tumors of DMBA treated rats. *Biol.Trace Elements Res.*, (20),179-183, 1988.
- 83) Diplock, A.T. : Metabolic and Functional defects in selenium deficiency.

3Ed Phil Trans R Soc, London, pp:105-7, 1981.

84) Lowry, O., Rosebrough, N.J. : Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem*, (193), 265-275.

85) Lawrance, R.A., Burk, R.F.: Glutathione Peroxidase activity in rat liver. *Biochem Biophys Res Com*, (71), 952-58, 1976.

86) Owens, C.W., Belcher, R.V. : Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *J Biochem*, (94),705-8, 1965.

87) Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, (95), 351-58, 1979.

88) Bergman, I., Loxley, R. : Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal Chem*, 35(12), 78-80, 1961.

89) Arain, M.A., Khuhawar, M.Y., Bhangar, M.I., Liquid Chromatographic Determination of Selenium in Vegetables and Tea Leaves as 2,1,3-Benzoselenadiazole, *J. Chem. Soc. Pak.*, 21 (2), 137-140, 1999.

90) Breyer, P.H. and Gilbert, B.P.: Determination of Selenium (IV) Differential Pulse Voltametry of The 3,3-Diaminobenzidine Piazselenol, *Anal Chim Acta*, (201), 23-32, 1987.

91) Liu, P.Y., Bondesson, L., Löntz, W. : The occurrence of cutaneous nerve ending and neuropeptides in vitiligo vulgaris. *Arch Dermatol Res*, (288), 670-75, 1996.

92) Tsatmali, M., Ancans, J., Thody, A.J. : Melanocyte functions and its control by melanocortin peptides. *J Histochem Cytochem*, 50(2), 125-133, 2002.

- 93) Le Poole, I.C., Van den Wijngaard, R.M., Westerhof, W. : Presence or absence of melanocytes in vitiligo lesions: An immunohistochemical investigation. *J Invest Dermatol*, (100), 816-22, 1993.
- 94) Zehtab, T., Yazdanparast, R., Rafieii, S. : Inhibition of experimental autoimmune vitiligo by oral administration of mushroom tyrosinase. *Cytobios*, 105(408), 27-34, 2001.
- 95) Pitts, E.W., Grimes, P.E., Kelly, A. : The incidence and significance of melanocytes in patients with vitiligo as assessed by the split dopa technique. *J Am Acad Dermatol*, (24),113-14, 1991.
- 96) Rokos, H., Beazley, D.W., Schallreuter, K.U. : Oxidative stress in Vitiligo: Produces H₂O₂ and pterin – 6 -carboxylic acid. *Biochem Biophys Res Com*, (292), 805-811, 2002.
- 97) Picardo, M., Passi, S., Morrone, A. : Antioxidant status in the blood of patients with active vitiligo. *Pigment Cell Res*, (7),113-18, 1994.
- 98) Beazley, D.W., Panske, A., Schallreuter, K.U. : Serum selenium levels and blood glutathione peroxidase activities in vitiligo. *Brith J Dermatol*, (141),301-303, 1999.
- 99) Durham-Pierre D.G., Walters, C.S., Halder, R.M. : Natural killer cell and lymphokine activated killer cell activity against melanocytes in vitiligo. *J Am Acad Dermatol*, 33(1), 26-34, 1995.
- 100) Mustacich, D., Powis, G. : Thioredoxin reductase. *J Biochem*, (346), 1-8, 2000.
- 101) Schallreuter, K.U., Pittelkow, M.R., Wood, J.M. : EF-hands calcium binding regulates the thioredoxin reductase/thioredoxin electron transfer in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Com*, (162), 1311-16,1989.

102) Schallreuter, K.U., Wood, J.M., Lemke, R. : Production of catecholamines in the human epidermis. *Biochem Biophys Res Commun*, (189), 72-78, 1992.

103) Schallreuter, K.U., Moore, J., Behrens-Williams, S. : Rapid initiation of repigmentation in vitiligo with Dead Sea climatotherapy in combination with pseudocatalase. *Int J Dermatol*, 41(8), 482-487, 2002.

104) Engelhard VH, Bullock TNJ, Colella TA.: Antigen derived from melanocytes differentiation proteins: self tolerance, autoimmunity. *Immunol Rev*, (188), 136-146, 2002.

105) Tackey R, Walters CS, Halder RM J. : Activated T cells and their soluble products from vitiligo patients influence melanocyte destruction. *Invest Dermatol*, 119(1), 2002.

106) Waterman, E.A., Kemp, E.H., Gawkrödger, D.J. : Autoantibodies in vitiligo patients are not directed to the melanocyte differentiation antigen MelanA. *Clin Exp Immunol*, 129(3), 527-532, 2002.

107) Harning, R.F., Cui, J., Bystryń, J.C. : Relation between the incidence and level of pigment cell antibodies and disease activity in vitiligo. *J Invest Dermatol*, (97), 1078-80, 1991.

108) Herrling, T., Zastrow, L., Fuchs, J.: Electron spin resonance detection of UVA-induced free radicals. *Skin Pharmacol Appl*, 15(5), 381-383, 2002.

109) Lejoly-Garsaund, A.M., Garsaund, P. : Increase in total blood antioxidant status and selenium levels in black patients with active vitiligo. *Int J Dermatol*, 41(10), 640-43, 2002.

110) Angel MF, Mellow CG, Knight KR, Coe SA, O'Brien BM. A biochemical study of acute ischemia in rodent skin free flaps with and without prior elevation. *Ann Plast Surg*, 26(5), 419-241, 1991

111) Maruyama, H., Watanabe, K., Yamamoto, I. : Effect of dietary kelp on lipid peroxidation and GSH-Px activity in livers of rats given breast carcinogen DMBA. *Nurt Cancer*, (15), 221-36, 1991.

112) Vinton, N.E., Dahistrom, A., Strobel, C. : Macrocytosis and pseudoalbinism: Manifestations of selenium deficiency. *J Pediatr* (111), 711-17, 1987.

113) Devi, S.G., Prasad, M.H., Saraswathi, I.: Free radicals, antioxidant enzymes and lipid peroxidations in different types of leukemias. *Clin Chim Acta*, (293), 53-63, 2000.

114) Valentine, S.J. : Do oxidatively modified proteins cause ALS? *Free Rad Biol&Med*, (33),7-12, 2002.

115) Squire, T.C. : Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp Gerantol*, (36), 1539-50, 2002.

ÖZGEÇMİŞ

15-11-1972 tarihinde Malatya’da dünyaya geldim, ilk ve orta öğrenimimi bu şehirde tamamladım. Daha sonra Cumhuriyet Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’ne girmeye hak kazandım. 1995 yılında bu fakülteden “Kimyager” ünvanı ile mezun oldum. Mezuniyetimin ardından İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Turgut Özal Tıp Merkezi’nde Biyokimya Laboratuvarı’nda sözleşmeli kimyager olarak bir yıl görev yaptım. 1996 yılında Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı’nda master yapmaya başladım. Aynı yıl İnönü Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Eğitimi Bölümü’nde araştırma görevlisi olarak göreve başladım. 1998 yılında Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi’nden master derecesi olarak mezun oldum. 1999 yılında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı’nda doktora sınavını kazandım. Bir dönem bu fakültede doktora öğrenimi gördükten sonra İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı’na Sağlık Bilimleri Enstitüsü Öğrencisi olarak yatay geçiş yaptım. Bu bölümde Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. İ. Çetin Öztürk danışmanlığında doktora öğrenimimi ve tez çalışmamı tamamladım.

Master tezimde potent bir karsinojen olan 7,12-DMBA’nın farelerde karaciğer antioksidan enzim sistemi üzerine olan etkilerini ve Vitamin E ile Selenyumun koruyucu özelliklerini inceledim. Doktora tez çalışmamda ise vitiligolu hasta plazmalarında antioksidan parametrelerdeki değişiklikleri araştırdım.

Bunların dışında birtakım toksik maddelerin canlı sistemlerde antioksidan sisteme olan etkileri, manyetik ve elektriksel alanların antioksidan sistemle ilişkileri, doğal antioksidanların kullanılabilirliği ve antioksidan kapasiteleri ile ilgili çalışmalarım bulunmaktadır.

Evli ve iki çocuk babası olup halen Malatya’da ikamet etmekteyim.