

**ASPIRİNİN VASKÜLER ENDOTEL
HÜCRE KÜLTÜRÜNDE OKSİDATİF
VE NİTROZATİF STRES ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**GÜNNUR DEMİRCAN
DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Bu Doktora Tez Çalışması Ondokuz Mayıs Üniversitesi 1904.09.10 nolu
Proje ile Desteklenmiştir.**

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ASPIRİNİN VASKÜLER ENDOTEL HÜCRE KÜLTÜRÜNDE
OKSİDATİF VE NİTROZATİF STRES ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

GÜNNUR DEMİRCAN

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AKADEMİK DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. EMİNE DIRAMAN**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. TUBA YILDIRIM**

SAMSUN - 2011

ÖZET

Aspirinin bilinen pıhtı önleyici etkilerine ek olarak vasküler endotelyumun korunmasını sağladığı gösterilmiştir. Aspirinin endotel fonksiyonlarında düzeltme sağladığını gösteren klinik verilerin, hücre düzeyinde hangi mekanizmalarca sağlandığını göstermek amacıyla çalışmamızı planladık. Bu çalışmada, endotel hücrelerine farklı dozlarda aspirin verilerek, CAT, SOD, GSH-Px, lipid peroksidaz ve NO aktivitesinde zamanla değişikliğe yol açıp açmadığının, farklı dozlar arasında farklılık olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada kullanılan 24 kuyucuklu mikropatelelerdeki endotel hücrelerinden (HUVEC) her sıradaki 4 kuyucuktan 2'sine 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 ve 1500 μ M dozlarında aspirin verilirken, diğer 2 kuyucuk kontrol olarak alındı. Buna göre hücre lizatlarından bazal şartlarda (0. saat), 24. saatte, 48. saatte ve 72. saatte katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve lipid peroksidasyonu ölçümleri yapılırken hücre medyumlarından ise NO salınımına bakıldı. MTT ölçümü için, 96 kuyucuklu mikropate'lerdeki hücrelere 3 kontrollü 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 ve 1500 μ M dozlarında aspirin verilirken 3 kuyucuk kontrol kuyucuğu olarak kullanıldı. 0, 24, 48 ve 72. saatlerdeki absorbans ölçümleri yapıldı.

MTT analizlerine göre, kontrol grubuna göre %50 absorbans azalması ile belirlenen toksik doz düzeyi 0, 24 ve 72. saatte ölçülen analizlerde 1500 μ M olarak belirlenirken, 48. saatteki ölçümlerde 1000 μ M olarak saptanmıştır. Farklı ilaç dozları verilen ve kontrol olarak belirlenen hücrelerden elde edilen lizatlardan bazal şartlarda (0. saat) ölçülen CAT, SOD, GSH-Px ve lipid peroksidaz değerleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). Yine 24. Saat ($p=0.696$), 48. Saat ve 72. saatte ölçülen CAT, SOD, GSH-Px ve lipid peroksidaz değerleri farklı ilaç dozları ve kontrol arasında farklılık göstermemiştir ($p>0.05$). 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 ve 1500 μ M ilaç verilen hücrelerden elde edilen lizatların her birinden 0., 24., 48. ve 72. saatte ölçülen CAT, SOD, GSH-Px ve lipid peroksidaz değerleri karşılaştırıldığında, zamana göre farklılık göstermediği saptanmıştır ($p>0.05$). Aspirin verilmeyen kontrol grubunda ise 0., 24., 48. ve 72. saatte ölçülen CAT, SOD ve GSH-Px değerleri arasında anlamlı fark saptanırken (sırasıyla $p < 0,0001$, $p < 0,003$ ve $p < 0,02$) lipid peroksidaz aktivitesinde değişiklik olmamıştır. 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 ve 1500 μ M ilaç verilen ve kontrol olarak belirlenen hücrelerin medyumları kullanılarak yapılan analizlerde bazal şartlarda (0. saat), 24., 48. ve 72. saatte ölçülen nitrik oksit değerleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$).

Aspirin verilmeyen hücrelerde zamanla hücre sayısının fazlalaşmasından dolayı ortamdaki serbest radikal oluşumunun artmasından kaynaklı antioksidan enzim aktivitesinde artış görülmüştür. Aspirin verilmesi zamanla artan reaktif antioksidan enzim aktivitesindeki artışı engellemiştir. Ancak aspirin belli dozların üzerinde verildiğinde MTT ile belirlenen hücre sayısında azalmaya sebep olacak düzeyde toksik etki yapmıştır. Bu sonuç, toksik olamayan dozlarda aspirin verilmesinin hücre koruyucu etkisi olabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar kelimeler: Endotel, hücre kültürü, aspirin, oksidatif stres, nitrozatif stres

INVESTIGATION OF EFFECTS OF ASPIRIN ON OXIDATIVE AND NITROSATIVE STRESS IN VASCULAR ENDOTHELIAL CELL CULTURE

SUMMARY

In addition to thrombus prevention effects, it was shown that Aspirin also provided protection of vascular endothelium. We planned our study to demonstrate the mechanisms at cellular level in order to explain clinical data showed that aspirin provided improvement of endothelial function. In this study, it was aimed to investigate that whether any change in activity of CAT, SOD, GSH-Px, lipid peroxidase and NO over time, and whether any difference between the different doses by giving different doses of aspirin to endothelial cells.

Endothelial cells (HUVEC) in 24 wells microplates used in this study and 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 and 1500 μ M Aspirin to 2 of 4 wells at each row were given, the other 2 wells were included as controls. Accordingly, while catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase levels and lipid peroxidation were being measured, NO release from cell media was observed. For the measurement of MTT, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 and 1500 μ M Aspirin were given to cells in 96 wells microplates, 3 wells were used as control. Absorbance measurements were performed at 0, 24, 48 and 72 hours.

According to MTT analysis, toxic dose level that defined as 50% decrease in absorbance compared to control group were determined as 1500 μ M at 0, 24 and 72 hours analysis and 1000 μ M at 48 hours analysis. The significant differences were not found between the baseline (0 hour) CAT, SOD, GSH-Px and lipid peroxidase levels measured from lisates that obtained from the cells that different drug doses given and controls ($P>0,05$). Also, CAT, SOD, GSH-Px and lipid peroxidase levels at 24 ($p=0.696$), 48 and 72 hours did not show any difference between different drug doses and control ($p>0.05$). When the CAT, SOD, GSH-Px and lipid peroxidase levels at 0, 24, 48, and 72 hours measured from each lisates obtained from cells that 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, and 1500 μ M drugs given compared, there were no differences between them according to time ($p>0.05$). In the control group that Aspirin was not given, significant differences were found between CAT, SOD and GSH-Px levels measured at 0, 24, 48, 72 hours ($p<0.0001$, $p<0.003$ and $p<0.02$ respectively) but lipid peroxidase activity showed no difference. In the analysis that performed by using the cell media that defined as control and 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, and 1500 μ M drugs

given, no significant difference was found between the nitric oxide levels at baseline (0 hour), 24, 48 and 72 hours ($p>0.05$).

Increase in antioxidant enzyme activity in the cells that Aspirin were not given, caused by raised free radical formation due to increase in number of cells by time was observed. Aspirin prevented the increase in reactive enzyme activity which increases by time. However, aspirin when given above the proper doses caused toxic effect that resulted decrease in cell number that determined by MTT. This result made us to think that possibility of nontoxic doses of Aspirin might protect the cells.

Keywords: Endothelial cell culture, Aspirin, Oxidative Stress, Nitrosative Stress.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca emeğini desteğini ve güvenini benden esirgemeyen sevgili danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Emine DIRAMAN'a her zaman bilgi birikimiyle yanımda hissettiğim değerli hocalarım Prof. Dr. Zafer EREN ve Yrd. Doç. Dr. Banu EREN'e tüm destek, yardım ve bilimsel katkıları için sayın hocalarım İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ayhan BİLİR, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Zafer YAZICI ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN'a analizlerin tamamlanmasındaki katkılarından dolayı Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Belma DURUPINAR'a ve Amasya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Tuba YILDIRIM'a ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Abdulkerim BEDİR'e, tez çalışmalarımın her aşamasında tüm zorlu yolları beraber aştığımız her zaman yanımda olan sevgili arkadaşım Arş. Gör. Yeliz YILMAZ MİROĞLU'na ve tüm Biyoloji Bölümü elemanlarına çok teşekkür ederim.

Bütün öğrenim hayatım boyunca bana sonsuz özveriyle destek olup bu günlerde olmamı sağlayan canım annem ve babama her zorlukta yanımda olan sevgili ablam ve enişteme ayrıca yanımda olamasa da varlığını ve sevgisini hep hissettiğim abime minnettarlığımı söylemeyi bir borç bilirim.

Sevgimin, gücümün ve sabrımın kaynağı canım eşim Dr. Sabri DEMİRCAN'a ve hayattaki en değerli varlıklarım olan hayatımın anlamları dünya güzeli kızım Gülce DEMİRCAN ve dünya tatlısı oğlum Uras DEMİRCAN'a bu uzun yolculukta kalben benim yanımda olup bu süreci birlikte tamamlama mutluluğunu yaşattıkları için sonsuz kere teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER	SAYFA NO
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. OKSİDATİF VE NİTROZATİF STRES	3
2.1.1. RADİKAL NEDİR?	3
2.2.2. RADİKALLER NASIL OLUŞUR?	3
2.1.3. OKSİJEN RADİKALLERİ NELERDİR?	4
2.1.4. SERBEST RADİKAL KAYNAKLARI	7
2.2. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ VE REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ	10
2.2.1. SÜPEROKSİT RADİKALI	10
2.2.2. HİDROJEN PEROKSİT	12
2.2.3. HİDROKSİL RADİKALI	14
2.2.4. SİNGLET OKSİJEN	16
2.2.5. NİTRİK OKSİT	17
2.3. SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ	23
2.3.1. PROTEİNLER	25
2.3.2. NÜKLEİK ASİTLER VE DNA	25
2.3.3. ZAR YAPISINDAKİ LİPİDLER	26
2.3.4. SİTOZOLİK MOLEKÜLLER	30
2.3.5. KARBONHİDRATLAR	30
2.3.6. HÜCRE DIŞI ETKİLER	31
2.4. ANTİOKSİDAN SAVUNMA MEKANİZMALARI	31
2.5. ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR	35
2.5.1. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ	35
2.5.2. KATALAZ	38
2.5.3. GLUTATYON PEROKSİDAZ	39
2.6. NON-ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR	41
2.6.1. VİTAMİNLER	41
2.6.2. GLUTATYON	42
2.6.3. UBİKİNON (KOENZİM Q)	42
2.7. OKSİDATİF STRES VE HASTALIKLAR	43
2.8. KAN DAMARLARI VE ENDOTEL HÜCRELERİ	48
2.8.1. ENDOTEL HÜCRELERİNİN YAPISI	48
2.8.2. ENDOTEL HÜCRELERİNİN FONKSİYONLARI	49
2.8.3. ENDOTELDEN SALINAN MEDİYATÖRLER	52
2.8.4. VASKÜLER DUVARDA OKSİDATİS STRES KAYNAKLARI	58
2.9. ENDOTEL DİSFONKSİYONU	62
2.10. ENDOTEL DİSFONKSİYONUNUN YOL AÇTIĞI HASTALIKLAR	64
2.11. ASPİRİN	70
3. MATERYAL VE METOD	77
3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN LABORATUVAR GEREÇLERİ	77
3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	77

3.3. ÇALIŞMADA KULLANILAN KİTLER	78
3.4. ÇALIŞMADA KULLANILAN ORTAMIN VE MALZEMENİN TEMİZLİĞİ	78
3.5. HÜCRE KÜLTÜRÜ AŞAMASI	79
3.5.1. HÜCRE KÜLTÜRÜNDE KULLANILACAK MALZEMELERİN HAZIRLIĞI	79
3.5.1.1. FCS'İN KULLANIMA HAZIRLANMASI	79
3.5.1.2. DENEYLERDE KULLANILAN ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI	79
3.5.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİ	80
3.5.2.1. HÜCRE SOYUNUN AÇILMASI	80
3.5.2.2. HÜCRELERİN ÇOĞALTILMASI	80
3.5.2.3. HÜCRELERİN PASAJLANMASI	80
3.5.2.4. HÜCRE SAYIMI	80
3.5.2.5. HÜCRELERİN DONDURULMASI VE SAKLANMASI	81
3.5.3. ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTE DENEYLERİ	81
3.5.3.1. HÜCRELERİN HAZIRLANMASI	81
3.5.3.2. ASPİRİNİN DOZLARININ AYARLANMASI	81
3.5.3.3. TEK SIRALI MONOLAYER HÜCRE KÜLTÜRÜ DENEYLERİ	82
3.5.3.4. SİTOTOKSİK DOZLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ	82
3.5.3.5. MTT ÖLÇÜMÜ	82
3.5.3.6. ENZİM AKTİVİTE DENEYLERİ İÇİN SÜPERNATANT ELDESİ	83
3.6. NO ÖLÇÜMÜ	83
3.7. GLUTATYON PEROKSİDAZ AKTİVİTE TAYİNİ	83
3.8. KATALAZ AKTİVİTE TAYİNİ	84
3.9. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ AKTİVİTE TAYİNİ	86
3.10. LİPİD PEROKSİDAZ TAYİNİ	87
3.11. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	87
4. BULGULAR	88
4.1. MTT ÖLÇÜMLERİ	88
4.2. KATALAZ AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	94
4.3. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	95
4.4. GLUTATYON PEROKSİDAZ AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	97
4.5. NİTRİK OKSİT AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	98
4.6. LİPİD PEROKSİDAZ AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	99
5. TARTIŞMA	101
6. SONUÇLAR	107
7. KAYNAKLAR	108

ŞEKİLLER LİSTESİ

SAYFA NO

Şekil 1: Oksijen molekülü ile oksijen radikallerinin elektron dağılımı	5
Şekil 2: Serbest radikallerin hücresel kaynakları	9
Şekil 3: Reaktif oksijen türlerinin oluşumu	10
Şekil 4: Nitrik oksit oluşumundaki kimyasal reaksiyon	17
Şekil 5: NO sentezi ve damar düz kası hücresindeki etkisi	19
Şekil 6: Vasküler sistemde nitrik oksitin biyolojik etkileri	22
Şekil 7: Serbest oksijen radikallerinin oluşumu	23
Şekil 8: Lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonları	27
Şekil 9: Lipid peroksidasyonunun kimyasal yolu	28
Şekil 10: Reaktif Oksijen Türleri oluşum yolu, lipid peroksidasyonu yöntemi ve glutatyon ve diğer antioksidanların oksidatif stresdeki görevleri	29
Şekil 11: Vücutta serbest radikallerin temel kaynakları ve serbest radikal hasarının sonuçları	30
Şekil 12: İnsan dokularındaki major antioksidan enzimler ve bağlı yollar	35
Şekil 13: Oksidatif stres ve hastalıklarla ilişkisi	44
Şekil 14: Kardiyovasküler sistemde reaktif oksijen türleri temel oluşum yolları	45
Şekil 15: Ateroskleroz ve oksidatif stres arasındaki ilişki	47
Şekil 16: Kronik kalp yetmezliğinde kardiyomyosit hasarıyla sonuçlanan reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin oluşumu	48
Şekil 17: Endotelyumdan salınan vazoaktif medyatörler	57
Şekil 18: Kardiyovasküler hastalıklarda endotel disfonksiyonuyla oluşan oksidatif stres mekanizması	58
Şekil 19: Oksidaz aktivasyon modeli ve kardiyovasküler hücrelerde fonksiyonel sonuçları	59
Şekil 20: Vasküler hücrelerde ROS kaynakları	61
Şekil 21: Reaktif oksijen türlerinin oluşumu	61
Şekil 22: Vasküler sistemde oksidatif stres ve nitrik oksit hareketi arasındaki denge	64
Şekil 23: Temel Ateroskleroz Süreci	67
Şekil 24: Ateroskleroz gelişiminde oksidatif stresin rolü	68
Şekil 25: Aspirinin kimyasal formülü	71
Şekil 26: Araşidonik asit metabolizmasının aspirin tarafından inhibisyonu	72

Şekil 27: Aspirinin etki mekanizması	73
Şekil 28: Trombosit agregasyonu	74
Şekil 29: Kontrollerde ölçülen absorbans değerlerinin farklı ilaç dozlarına göre değişimi	89
Şekil 30: (0. Saat) 1000 μ M Aspirin verilmiş endotel hücresi (üstteki resim) ve Aspirin verilmemiş kontrol endotel hücresi (alttaki resim)	90
Şekil 31: (24. Saat) 500 μ M Aspirin verilmiş endotel hücresi (üstteki resim) ve 1500 μ M Aspirin verilmiş endotel hücresi (alttaki resim)	91
Şekil 32: (48. Saat) 500 μ M Aspirin verilmiş endotel hücresi (üstteki resim) ve 1500 μ M Aspirin verilmiş endotel hücresi (alttaki resim)	92
Şekil 33: (72. Saat) 500 μ M Aspirin verilmiş endotel hücresi (üstteki resim) ve 1500 μ M Aspirin verilmiş endotel hücresi (alttaki resim)	93
Şekil 34: Farklı ilaç dozları ve kontrollerde ölçülen katalaz aktivitesinin zamanla değişimi	95
Şekil 35: Farklı ilaç dozları ve kontrollerde ölçülen SOD aktivitesinin zamanla değişimi	96
Şekil 36: Farklı ilaç dozları ve kontrollerde ölçülen GSH-Px aktivitesinin zamanla değişimi	98
Şekil 37: Farklı ilaç dozları ve kontrollerde ölçülen lipid peroksidaz aktivitesinin zamanla değişimi	100

ÇİZELGELER LİSTESİ

SAYFA NO

Çizelge 1: Biyolojik sistemlerde majör reaktif oksijen ve nitrojen türleri	7
Çizelge 2: Bazı endojen reaktif oksijen türleri kaynakları	8
Çizelge 3: Serbest radikallerin hücredeki başlıca etkileri	24
Çizelge 4: Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma sistemi	32
Çizelge 5: Hücre içi antioksidanlar	32
Çizelge 6: Membran antioksidanları	33
Çizelge 7: Hücre dışı antioksidanlar	33
Çizelge 8: Reaktif oksijen türleri, antioksidanları ve ilave antioksidanları	43
Çizelge 9: Farklı ilaç dozları ve kontrollerdeki zaman göre belirlenen absorbands değerleri	88
Çizelge 10: 0, 24, 48 ve 72 saatte farklı ilaç dozları ve kontrollerde ölçülen katalaz aktivitesi	94
Çizelge 11: 0, 24, 48 ve 72 saatte farklı ilaç dozları ve kontrollerde ölçülen SOD aktivitesi	96
Çizelge 12: 0, 24, 48 ve 72 saatte farklı ilaç dozları ve kontrollerde ölçülen GSH-Px aktivitesi	96
Çizelge 13: 0, 24, 48 ve 72 saatte farklı ilaç dozları ve kontrollerde ölçülen NO aktivitesi	96
Çizelge 14: 0, 24, 48 ve 72 saatte farklı ilaç dozları ve kontrollerde ölçülen lipid peroksidaz aktivitesi	100

1. GİRİŞ

Serbest radikaller atomik veya moleküler orbitallerinde bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektron bulunduran molekül veya molekül kısımlarıdır. Bu çiftleşmemiş elektron serbest radikallere dikkate değer derecede reaktivite verir (Valko ve ark., 2006). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikalidir (Akkuş, 1995).

Reaktif oksijen türlerinin düşük seviyeleri birçok kimyasal süreçte (hücre farklılaşmasında, hücreler arası mesajlaşmada, hücre devamlılığında, büyümede, apoptozisde, bağışıklıkta, mikroorganizmalara karşı savunmada) olmak zorundadır. Yüksek dozda veya gereğinden fazla bulunan reaktif oksijen türleri, biyolojik makromoleküllerin hasarı ve metabolik fonksiyon bozukluğuna neden olan oksidatif strese neden olur. Yüksek konsantrasyonlardaki reaktif oksijen türlerinin, hücre yapısının nükleik asitlerin, lipidlerin ve proteinlerin uğradığı hasarda önemli bir payı vardır. Sağlıklı kişilerde bu metabolitlerin zararlı etkileri antioksidanlarla sınırlanmaktadır, böylece oksidatif hasara bağlı olarak ortaya çıkan doku hasarı en aza indirilmektedir (Singal ve ark., 1998).

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Savunma mekanizması, serbest radikallerin sebep olduğu oksidatif stres hasarlarına karşıdır: koruyucu mekanizma, tamir mekanizması, fiziksel savunma ve antioksidan savunmalar. Antioksidan mekanizmalar, pratikte süperoksit oksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksitaz (GSH-Px) gibi enzimlerin aktivitesinin ölçümüyle değerlendirilebilmektedir. Bu antioksidanların hem aktiviteleri hem de hücreler arası seviyeleri arasında bir denge vardır ki organizmaların sağlığı ve canlılığı için gereklidirler (Tekkes, 2006, Yanbeyi, 1999, Mates ve ark.,1999, Valko ve ark., 2006). Lipid peroksitaz aktivitesi ise serbest radikallerin yol açtığı membran hasarının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır.

Endotelyum vasküler tonus, platelet adezyonu, inflamasyon, fibrinoliz ve vasküler proliferasyonu düzenleyen lokal medyatörler sağlayarak vasküler homeostazı korur. Bu medyatörlerden bazıları prostasiklin, nitrik oksit (NO), endotel kaynaklı gevşetici faktör

(EDRF), endotelinler, endotel hücre büyüme faktörleri, interlökinler, plazminojen inhibitörleri ve von Willebrand faktör gibi maddelerdir.

Oksidatif stres durumunda endotel hücreleri koruyucu fenotiplerini kaybederler ve proinflamatuvar moleküller sentezlerler (Kunsch ve Medford, 1999). Bunlar arasında vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1), hücrelerarası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve monosit kemotaktik protein-1 yer almaktadır. Hiperlipidemi, diyabet, hipertansiyon, sigara ve yaşlanma gibi ateroskleroz için risk faktörleri endotel, vasküler düz kas hücresi ve adventisyal hücrelerden reaktif oksijen türlerini (ROT) oluşumuna yol açar (Harrison ve ark., 2003). Reaktif oksijen türleri NO inaktivasyonunu hızlandırarak vazomotor fonksiyonu bozar. Endotel hücrelerinden büyüme faktörlerinin sekresyonunu hızlandırarak endotel hücre proliferasyonuna yol açar. Ayrıca apoptotik sinyal aktivasyonu ile endotel hücre kaybına yol açar (Irani, 2000). Endotel fonksiyonunun bozulması (disfonksiyon) tüm bu olayları olumsuz etkileyerek kardiyovasküler risk oluşturur (Nedeljkovic ve ark., 2003). Erken dönemde endotel disfonksiyonuyla başlayan süreç, oksidan uyarının devamı ve antioksidan enzim aktivitesindeki yetersizlik devam ederse hızla ilerler ve aterosklerotik plaktan aşırı koroner arter hastalığına kadar devam edebilir (Heinecke, 2003). İnsan koroner arterlerinden elde edilen örneklerde SOD gibi antioksidan enzim aktivitesinde azalmanın gösterilmiş olması oksidatif stres ve ateroskleroz ilişkisinin güçlü bir kanıtıdır (West ve ark., 2001).

Özellikle ateroskleroz gibi vasküler sorunların yol açtığı kalp hastalıklarında aspirin tedavisi önemlidir. Hem hiperlipidemi, hipertansiyon, diyabet ve sigara içiciliğinden bir veya birkaçına sahip risk faktörü olan kişilerde hem de koroner veya diğer vasküler olay (inme, periferik damar hastalığı gibi) geçiren kişilerde aspirin tedavisi tekrarlayan olayları azaltmada etkilidir. Aspirinin bilinen pıhtı önleyici etkilerine ek olarak, vasküler endotelyumun korunmasını sağladığı, bu nedenle de; oklüzif kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıkların önlenmesinde ve aterosklerozun başlangıcında oluşan zararlar üzerinde oldukça etkili olduğu gösterilmiştir (Watala ve Gwozdinski, 1993). Aspirin endotel fonksiyonlarında düzeltme sağladığını gösteren bu klinik verilerin, hücre düzeyinde hangi mekanizmalarca sağlandığını göstermek amacıyla çalışmamızı planladık.

Bu çalışmada, endotel hücre kültürüne farklı dozlarda aspirin verilerek, CAT, SOD, GSH-Px, lipid peroksidaz ve NO aktivitesinde zamanla değişikliğe yol açıp açmadığının, farklı dozlar arasında farklılık olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. OKSİDATİF VE NİTROZATİF STRES

2.1.1. Radikal nedir?

Atomlar bir çekirdek ve çekirdek etrafında hareket eden ve genellikle çift halde bulunan elektronlardan meydana gelmiştir. Radikaller de dış orbitallerinde bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektron içeren atom veya moleküllerdir (Halliwell,1994). Her türden kimyasal ve biyokimyasal tepkime daima atomların dış orbitallerindeki elektronlar seviyesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması söz konusu kimyasal türün reaktivitesini olağanüstü arttırdığı için, radikaller reaktivitesi çok yüksek olan kimyasal türlerdir (Yurdakul,2003).

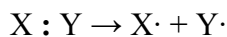
Daha ayrıntılı açıklayacak olursak; serbest radikal maddeler, reaktif oksijen metabolitleri (ROM) ve thiobarbitürik asit reaktifleri (TBARS) olarak bilinen reaksiyon ürünlerinden lipid hidroperoksidazlar, malondialdehit ve diğer bazı aldehitler, konjuge dienleri hidrokarbonlar, enzimatik olmayan prostanoidler ve epoksitler ile hidrojen, F2-isoprostan, triklorometil, Thiyl, peroksil, alkoksil nitrik oksit (NO) ve azot dioksit (NO₂) bilinen ve oksidatif stres göstergesi olarak kullanılan moleküllerdir (Dündar,2000).

2.1.2. Radikaller nasıl oluşur?

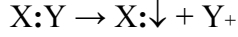
İçinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle devamlı bir radikal yapımı vardır. Hücrel koşullarda da ciddi bir miktar ve çeşitlilikte radikal üretilmektedir.

Bir serbest radikal 3 yolla ortaya çıkabilir

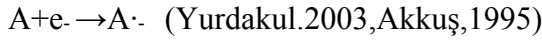
- 1.Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar (Bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır).



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır.

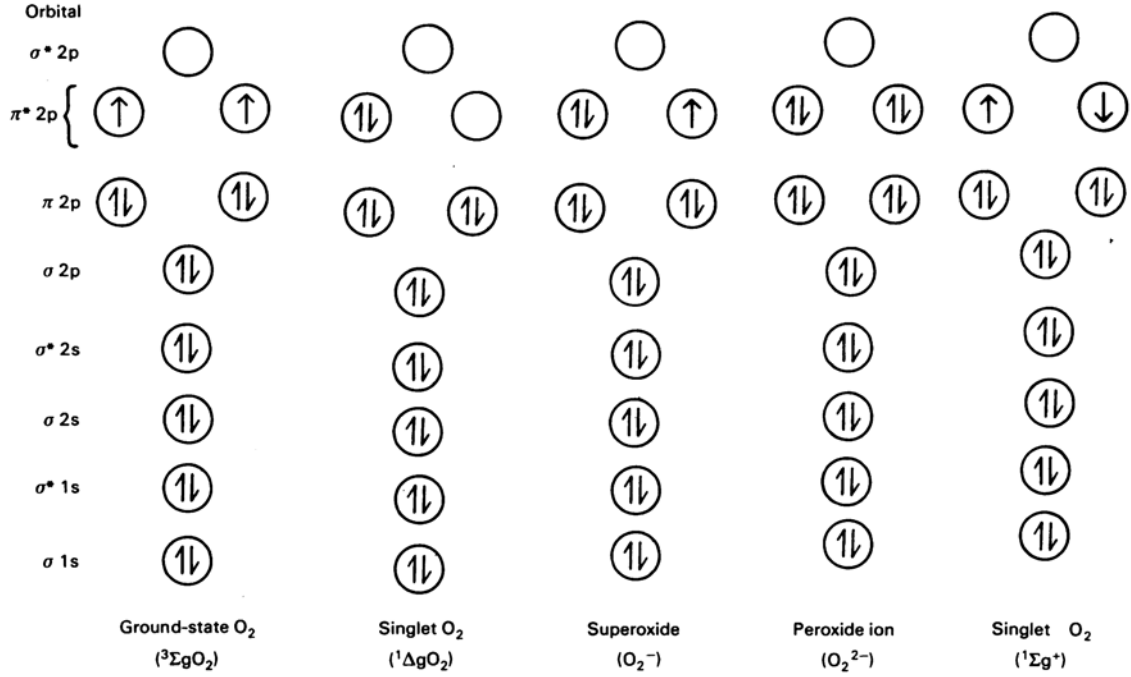


3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar.



2.1.3. Oksijen radikalleri nelerdir?

1954’de Rebecca Gershman ve Daniel L. Gilbert oksijenden kaynaklanan hasarların oksijen radikallerinin oluşumundan dolayı olduğunu düşünmüşlerdir. Bu hipotez in vivo’da oksijenin toksik etkisinde temel rol oynayan süperoksit radikalının oluşumundaki oksijen toksisitesindeki süperoksit teorisi ile Fridovich (1975, 1978, 1983) tarafından geliştirilmiştir (Halliwell ve Gutteridge,1984). Moleküler oksijen dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron içerir. Bu elektronlar, spinleri aynı yönde ve farklı orbitallerde iken minimum enerji seviyesindedirler. Radikal tanımına göre oksijen “diradikal” yapıya sahip bir moleküldür. Oysa oksijenin reaktivitesi beklenenin aksine çok düşüktür. Diradikal bir yapıya sahip olan oksijenin herhangi bir molekül ile tepkimeye girebilmesi için, tepkimeye gireceği molekülün de benzer yapıya (farklı orbitallerde spinlerin aynı yönde elektron içermesi) sahip olması gerekir. Oysa başta organik moleküller olmak üzere atom ve moleküller orbitallerinde elektronları antiparalel ve eşleşmiş olarak içerirler veya paylaşılmamış elektronlar kovalent bağlara katılmışlardır. Bunun sonucu olarak oksijenin diğer moleküllere olan reaktivitesi son derece kısıtlanmıştır. Bu kısıtlama “**spin kısıtlaması**” olarak adlandırılır. Canlıların oksijeni kullanabilmesi için, oksijene elektron transferi yaparak spin kısıtlamasını aşmaları gerekir. Bu işlem için canlılar bazı metal iyonlarından (Fe, Cu, Mn, Zn) yararlanırlar (Yurdakul,2003).



Şekil 1. Oksijen molekülü ile oksijen radikallerinin elektron dağılımı (Halliwell ve Gutteridge,1984).

Oksijen bulunan bir ortamda çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenlerle oksijen radikalleri yapılabilir. Vücudumuzda oluşabilen radikallerin sayısı “yüzlerce farklı tür” şeklinde ifade edilebilirse de, bu radikaller arasında süperoksit, hidrojen peroksit, nitrik oksit ve hidroksil radikalının özel yerleri vardır. Hatta bu radikaller içinde süperoksit ve nitrik oksit temel radikaller sayılabilir. Çünkü süperoksit ve nitrik oksit enzimatik mekanizmalarla, devamlı olarak ve önemli derişimde üretilen radikallerdir. Ayrıca bu iki radikal, biyolojik sistemlerde tanıdığımız diğer bütün önemli radikaller ile radikal yapıda olmayan reaktif türlerin oluşumunu başlatabilecek özelliktedirler.

Normal biyokimyasal tepkimeler sırasında oluşan oksijen radikalleri ile çeşitli biyolojik fonksiyonları yerine getirmek üzere üretilen nitrik oksit’in derişimleri genellikle çok düşüktür. Düşük derişimdeki reaktif türler, hücrelerin antioksidan sistemleri tarafından inaktive edildiklerinden önemli toksik etkilere neden olmazlar. Ancak bu radikallerin yapımları çeşitli patolojik durumlarda artabilir, çoğunlukla da her iki radikal bileşik grubunun oluşumu birbiri ile paralel seyreder. Örneğin inflamasyon durumlarında aktive olan lökositler

aynı anda hem oksijen radikallerini hem de nitrik oksidi yüksek derişimlerde sentezlerler. Nitrik oksit, oksijen radikalleri ile tepkimeye girerek veya oksijenli ortamlarda oksitlenerek, kendisinden çok daha reaktif türlerin oluşumuna neden olur. Oksijen radikallerinin fazla yapımının neden olduğu etkilerin toplamı “oksidatif stres“ diye adlandırılır. Oksidatif stresi, nitrik oksit’in reaktif türlerinden kaynaklanan toksik etkilerden ayırmak mümkün olmadığından, “**nitrozatif stres**” den ayırmak imkansızdır. Bu bakımdan, **oksidatif hasar**, superoksitten kaynaklanan radikaller ile NO’in reaktif türlerinin neden olduğu hasarların bir toplamıdır (Yurdakul,2003). Daha ayrıntılı yazacak olursak;

OKSİDATİF STRES: Oksijenin reaktif türleri olan oksijen radikallerinin biyomoleküllerle (proteinler, nükleik asitler, lipidler, karbonhidratlar)tepkimesi sonucu gözlenen toksik etkiler nedeniyle gelişen patolojik durum (Kılınç ve Kılınç,2003).

NİTROZATİF STRES: Nitrozatif stres, biyomoleküllerin uğradığı nitrozasyon tepkimeleridir. Nitrozasyon, reaktif nitrojen oksit türleri tarafından nükleofil bir gruba nitrozonyum (NO^+) grubunun aktarılması nitrozil türevinin oluşturulmasıdır. Proteinler, nükleik asitler ve glutatyon gibi antioksidanların oluşan reaktif türlerle modifikasyonu nitrozatif stresin temelini oluşturur (Kılınç ve Kılınç,2003).

Terim olarak oksidatif stres ilk anda oksijen radikallerinin üretimindeki artıştan kaynaklanan etkileri hatırlatır. Ancak nitrik oksitten kaynaklanan reaktif türler de oksijen radikallerine benzer şekilde biyolojik moleküllerle tepkimeye girerler. Örneğin reaktif nitrojen oksit türleride oksijen radikalleri gibi lipid peroksidasyonunu başlatabilir, DNA’da zincir kırılmaları ve baz modifikasyonlarına neden olabilir, metal iyonlarının oksidasyon durumlarını değiştirebilir, proteinleri oksitleyebilir ve antioksidanların tüketimine neden olabilirler. Vücutta oksijen radikallerinin sentezinin artmadığı durumlarda, indüksiyonlar sonucu artmış nitrik oksit sentezi kendi başına oksidatif strese neden olabilir. Bu nedenle in vivo koşullarda gelişen oksidatif stresi sadece oksijen radikallerinin yapımındaki artışa bağlamak doğru değildir. Genel bir kural olarak, patolojik durumlarda nitrik oksit ve oksijen radikallerinin yapımı eş zamanlı olarak gerçekleşir; ya da bir radikal türünün neden olduğu etkiler diğer radikal türün yapımını da hızlandırır (Kılınç ve Kılınç,2003).

Çizelge 1. Biyolojik sistemlerde majör reaktif oksijen ve nitrojen türleri.

Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	Formül
Süperoksit anyonu	$\bullet\text{O}_2^-$
Hidroperoksil radikali	$\text{HO}\bullet$
Peroksil radikali	$\text{RO}\bullet$
Alkoksil radikali	$\text{RO}\bullet$
Hidroksil radikali	$\bullet\text{OH}$
Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hipoklorit	HOCl^-
Hipoklorit asit	HOCl
Ozon	O_3
Singlet oksijen	$^1\Delta_g\text{O}_2$

Reaktif Nitrojen Türleri (RNS)	Formül
Nitrik oksit (nitrojen monooksit)	$\bullet\text{NO}$
Nitrojen dioksit	$\bullet\text{NO}_2$
Peroksinitrit	ONOO^-
Peroksinitrik asit	ONOOH
Dinitrojen trioksit	N_2O_3
Nitril klorid	NO_2Cl
Nitronium ion	NO^+
Alkilperoksinitrit	ROONO
Nitrozotiol	RSNO

(Yücel ve ark.,2006)

2.1.4. Serbest radikal kaynakları

Biyolojik sistemlerde serbest radikal oluşumu, normal metabolik olayların seyri sırasında meydana gelebildiği gibi, organizmada bazı yabancı maddelerin (ksenobiyotikler) metabolize edilmesi sırasında ve organizmanın radyasyon gibi dış etkenlere maruz bırakılmasıyla da meydana gelebilir (Yanbeyi,1999).

Bu nedenle serbest radikaller hücrelerin fonksiyonları esnasında endojen kaynaklı olarak oluşabildikleri gibi eksojen kaynaklı olarak da meydana gelebilirler.

Hücredeki serbest oksijen radikali kaynakları:

Endojen Kaynaklar: Serbest radikallerin endojen kaynakları hücre içinde oluşur ve tüm alanı sarar. Hücre içi serbest radikaller otooksidasyonla oluşur. İndirgenmiş flavin ve thiol gibi küçük moleküllerin inaktivasyonu ve oksidaz, siklooksijenaz, lipooksijenaz, dehidrogenaz ve peroksidazların aktivitesi ile oluşur. Oksidazlar ve elektron transport sistemi ilk kaynaktır. Hücrelerdeki serbest radikal oluşum bölgeleri mitekondri, lizozom, peroksizom, çekirdek, endoplazmik retikulum ve plazma membranıdır. Moleküler türler hidroksil, peroksi, hipoklorit, süperoksit ve alkoksi radikalleri iken reaktif moleküller hidrojen peroksit, singlet oksijendir. Bunlar serbest radikal değildirler ama hasara neden olduklarından oldukça reaktiftirler (Machlin ve Bendich,1987).

Çizelge 2. Bazı endojen reaktif oksijen türleri kaynakları:

Mitokondriyal elektron transport zinciri

Kloroplast elektron transport zinciri

Oksidan enzimler:

Ksantin oksidaz

İndolamin dioksijenaz

Triptofan dioksijenaz

Galaktoz oksidaz

Siklooksijenaz

Lipooksijenaz

Mono aminooksidaz

Fagositik hücreler:

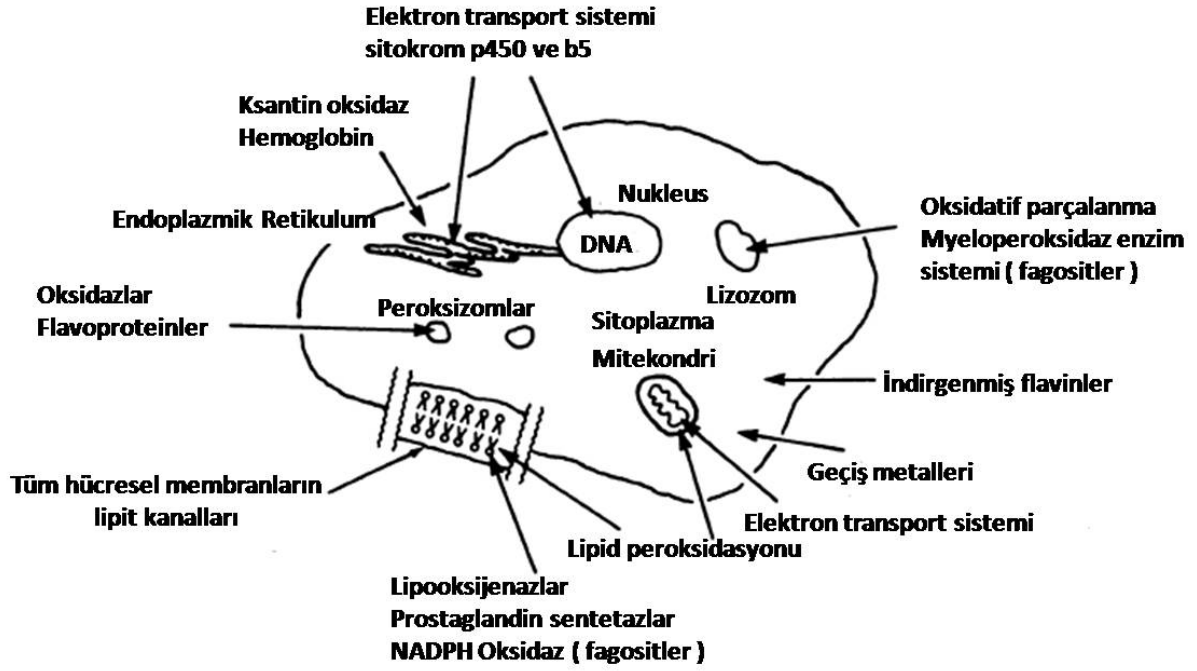
Nötrofiller

Monosit ve makrofajlar

Eozinofiller

Endotelyal hücreler

Oto-oksidasyon reaksiyonları (Fe⁺², epinefrin) (Tekkes,2006)



Şekil 2. Serbest radikallerin hücrel kaynakları (Machlin ve Bendich,1987).

Eksojen Kaynaklar: Serbest radikallerin eksojen kaynakları sigara, kirleticiler, organik solventler, anestezi, hiperoksik çevre ve pestisitlerdir. Bu oluşumlardan bazıları kesin tedavilerde serbest radikal ara ürünlerine dönüşür ki bu da hedef dokularda oksidatif hasarın sebebi olarak gösterilir (Machlin ve Bendich,1987).

Bazı eksojen reaktif oksijen türleri kaynakları:

İlaç oksidasyonları (Ör. Parasetamol, CCl₄)

İyonize radyasyon

Güneş ışığı

X- ışınları

UV- ışınları

Isı şoku

Glutasyonu okside eden maddeler

Ortam havası

Sigara dumanı

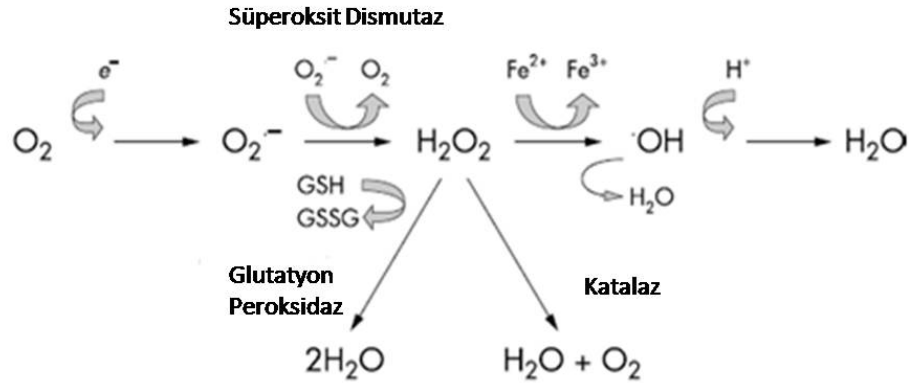
Ozon

Kükürtdioksit

Egzos gazları (Tekkes,2006)

2.2. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ VE REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ

Serbest radikaller atomik veya moleküler orbitallerinde bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektron bulunduran molekül veya molekül kısımlarıdır. Bu çiftleşmemiş elektron serbest radikallere dikkate değer derecede reaktivite verir. Radikaller canlı sistemlerde radikal türlerin oluşumunda çok önemli bir sınıfta bulunan oksijenden köken alır. Moleküler oksijen (dioksijen) tek elektronik konfigürasyona sahiptir ve kendisi radikaldır (Valko ve ark.,2006). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikali. Bunlardan ilk dördünün çeşitli reaksiyonları ile sonuncusu meydana gelir (Akkuş,1995).

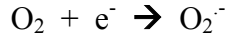


Şekil 3. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu (Calver ve ark.,1993)

2.2.1. SÜPEROKSİT RADİKALİ ($O_2^{\cdot -}$)

Önceleri reaktif süperoksit radikalini sadece radyasyon kimyacıları ve radyobiyologlar biliyordu ama şimdi reaktif süperoksit radikalinin moleküler oksijenin biyolojik redüksiyonunun normal bir ürünü olduğu anlaşıldı (Fridovich,1978).

Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot -}$) meydana gelir (Akkuş,1995,Halliwell,1994).



Canlılarda oluştuğu ilk gösterilen radikal olan süperoksit, başlıca şu mekanizmalarla üretilmektedir:

1-İndirgeyici özellikteki biyomoleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksit radikali oluşur. Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler, indirgenmiş nükleotidler gibi yüzlerce biyolojik molekül aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit yapımına neden olurlar.

2-Başta çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere, yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında süperoksit radikali bir ürün olarak oluşabilir.

3-Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin %1-5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni NADH-dehidrogenaz ve koenzim-Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olmasıdır.

4-Aktive edilen fagositik lökositler bol miktarda süperoksit üreterek fagozom içine ve bulundukları ortama verirler. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal yapımı, daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatır. Yani radikal yapımı bazı hücresel fonksiyonlar için de gerekli olabilir (Yurdakul,2003).

Süperoksit oluşumu hücrede genellikle mitokondride gerçekleşir. Memeli hücrelerinde ATP'nin temel kaynağı mitokondrideki elektron transport sistemidir. Enerji aktarımı sırasında elektronların çok az bir kısmı oksijene akar ve çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde tanımlanmış süperoksit radikali oluşur (Selçuk ve ark.,1996).

Hücresel koşullarda üretilen süperoksit, oksitleyici veya indirgeyici olarak davranabilir. Aldığı elektronu metal iyonuna, sitokrom c'ye veya bir radikale verirse tekrar oksijene oksitlenir. Oksijenden daha oksitleyici olan süperoksit bir elektron daha alırsa peroksi anyonuna indirgenir.



Bu tepkime biyolojik moleküllerin oksidasyonuna neden olduğundan tercih edilmez. Aerobik canlılarda süperoksitlerin hidrojen peroksit (H₂O₂) çevrilmesi katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenir.



SOD tarafından katalizlenen bu tepkime “dismutasyon tepkimesi” diye adlandırılır. Süperoksit, özellikle hafif asidik koşullarda SOD olmadan kendiliğinden dismutasyonla da hidrojen peroksit çevrilebilir (Yurdakul,2003).

2.2.2. HİDROJEN PEROKSİT (H₂O₂)

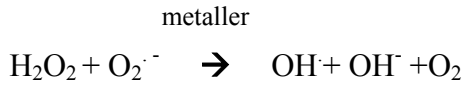
Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit meydana gelir. Peroksit molekülü de iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksiti oluşturur (Akkuş,1995). Çiftleşmemiş elektron içermediği için radikal değildir (Halliwell ve Gutteridge,1984). Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Hidrojen peroksit, süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil (OH[·]) radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir (Yanbeyi,1999). SOD tarafından katalizlenen dismutasyon reaksiyonu sonucu ortaya çıkar. İki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir (Yurdakul,2003). Dismutasyon reaksiyonu hızlı ve asidik pH da gerçekleşir (Halliwell ve Gutteridge,1984).



Süperoksitin hidrojen peroksitle dönüşmesi 7.2'lik pH da yaklaşık 3.8×10^5 M/s sabitesinde gerçekleşir (Dündar ve Aslan,2000).

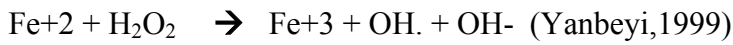
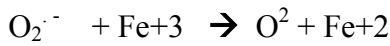
Hidrojen peroksit, membranlardan kolayca geçebilir ve bileşikleri yavaşça okside edebilir. Hidrojen peroksitin düşük seviyeleri fazla reaktif değilken yüksek seviyeleri de hücrel enerji sistemleri için oldukça tehlikelidir. Örneğin glikolitik enzim olan gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenazı inaktive edebilir.

Hidrojen peroksit aynı zamanda geçiş metal iyonları varlığında hidroksil radikali oluşumunu sağlar (Aruoma,1998).



Bu reaksiyona Haber- Weiss reaksiyonu adı verilir. “Haber- Weiss” reaksiyonu katalizörlü veya katalizörsüz oluşabilir. Fakat, katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Katalizör olmayınca ortamdaki hidrojen peroksit ve süperoksit radikali antioksidanlar tarafından kolayca kaldırılır. Demir gibi geçiş metalleri ile katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır.

Bu reaksiyonda önce ferri demir (Fe^{+3}), süperoksit tarafından ferro demire (Fe^{+2}) indirgenir. Sonra bu ferro demir kullanılarak “Fenton Reaksiyonu” ile hidrojen peroksitten $\text{OH}^{\cdot}$ ve OH^- üretilir. Reaksiyon mekanizması aşağıdaki gibidir.



Demir iyonları katalizörlüğünde gerçekleşmesi reaksiyonu 4000 kez hızlandırır (Dündar ve Aslan,2000).

Tiroid hücrelerinin apikal plazma membranları üzerinde bulunan NADPH-oksidaz tarafından direkt olarak hidrojen peroksit üretilir. Hidrojen peroksit üretimi, birçok bakteri türünde, fagositik hücrelerde, spermatozoda olduğu gibi hücrelerde de mitokondride, mikrozomlarda ve kloroplastlarda olur. Hidrojen peroksitin reaktivitesi sınırlıdır, ancak diğer oksijen ürünlerinin, geçebilecekleri bir anyon kanalı olmadıkça çok yavaş geçebildiği

biyolojik membranlardan geçebilir. Eritrosit membranı, vasküler endotel hücre membranı böyle bir kanala sahiptir.

Peroksizomlar çok önemli hücre içi hidrojen peroksit kaynağıdır. Bu organeldeki D-amino asid oksidaz, urat oksidaz, L-hidroksil asid oksidaz ve yağ asidi açıl- CoA oksidaz gibi oksidazlar süperoksit üretmeden, bol miktarda hidrojen peroksit üretimine sebep olurlar. Fakat, peroksizomlarda katalaz aktivitesi çok yüksektir. Bu sebeple bu organelden sitozole ne kadar hidrojen peroksit geçtiği bilinmemektedir.

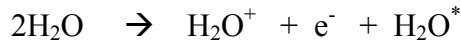
Oksitleyici özelliği nedeniyle, biyolojik sistemlerde oluşan hidrojen peroksitin derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri yerine getirir (Yurdakul,2003,Tekkes,2006).

2.2.3. HİDROKSİL RADİKALİ ($\cdot\text{OH}$)

Bilinen en güçlü oksidan radikaldır, küçük miktarlarda bile bulunduğu yerde aşırı hasar yapabilir (Balcı,2007).

Biyolojik ve kimyasal sistemlerde üretilen hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) canlılarda iki mekanizma ile oluşabilir.

1.) İyonlaştırıcı radyasyonun etkisi ile sulu ortamda su moleküllerinin iyonlaşması gerçekleşir.



Uyarılmış su molekülü (H_2O^*) homolitik yıkım ile; H_2O^+ ise bir su molekülü ile tepkimeye girerek hidroksil radikali oluştururlar. Bu tepkimeler çok kısa sürede gerçekleşir ve üretilen hidroksil radikali, radyasyonun canlılardaki toksik etkisinden sorumlu başlıca kimyasal türdür.

2.) Hidrojen peroksitin eksik indirgenmesi ile hidroksil radikali yapımı, vücutta bu radikalin en önemli kaynağıdır. Hidrojen peroksitin iki elektron ile indirgenmesi sonucunda su oluşurken, tek elektron ile indirgenmesi hidroksil radikali yapımına neden olur (Yurdakul,2003). 1890'larda Cambridge üniversitesinden kimyacı H.J.H. fenton tartarik asit

gibi organik molekülleri oksidatif hasara uğratan hidrojen peroksit ve demir tuzları arasındaki reaksiyonu tanımlamıştır (Gutteridge,1995).

Hidroksil radikali, hidrojen peroksitin geçiş metalleri varlığında indirgenmesi ile (Fenton reaksiyonu) oluşan son derece reaktif bir radikaldir. Ayrıca hidrojen peroksitin hidroksil radikali ile reaksiyonu sonucunda da (Haber-Weiss reaksiyonu) meydana gelir.

Bu reaksiyon katalizör varlığında veya katalizörsüz olabilir. Bu reaksiyon katalizörsüz çok yavaş olduğu halde demir katalizörlüğünde çok hızlı oluşur. Bu reaksiyonda önce ferri demir (Fe^{+3}), hidroksil radikali tarafından ferro demire (Fe^{+2}) indirgenir. Sonra bu ferro Fe^{+2} kullanılarak hidrojen peroksitten hidroksil ve hidroksil radikali üretir (I ve II Fenton Reaksiyonu, III Haber- Weiss Reaksiyonu) Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. Hücre zarı su içermediğinden hidroksil radikalının başlıca hedefi yağ asididir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilir (Yurdakul,2003,Balcı2007).

Fe, Cu



Son derece reaktif bir oksidan radikaldir. Yarılanma ömrü çok kısadır. Oluştugu yerde büyük hasara sebep olur (Akkuş,1995). Hidroksil radikali ile oluşan en iyi tanımlanmış biyolojik hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur.

Her tür biyolojik molekül hidroksil radikalının bir hedefi ise de özellikle elektronca zengin bileşikler tercihlili hedeflerdir. Nükleik asitler, proteinler ve lipidlerde başlatılan radikalik tepkimelerde binlerce farklı ara ürünler oluşabilir.

- DNA ile tepkimesi sonucu baz modifikasyonları, baz delesyonları, zincir kırılmaları gerçekleşebilir. İleri derecedeki DNA hasarları tamir edilemediğinden hücre ölümüne neden olur.
- Proteinler üzerinde oluşan oksidasyonlar yapı değişimine neden olacağından proteinleri proteolitik yıkıma götürür.

- Hücre zarı su içermediğinden hidroksil radikalının başlıca hedefi yağ asididir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp yine hücre ölümüne neden olabilir. Özellikle hidroksil radikali yapımını katalizlemelerindeki etkileri nedeniyle, canlılarda metal iyonların radikal hasarlarından birinci derecede sorumludurlar ve bu etkiye sahip olamadıkları formda (proteine bağlı) tutulmalıdır (Yurdakul,2003).

2.2.4. SİNGLET OKSİJEN ($^1O_2$)

Singlet oksijen biyolojik sistemlerde oldukça önemlidir, çiftleşmemiş elektronu yoktur ve radikal değildir (Halliwell ve Gutteridge,1984). Oksijenin yüksek enerjili ve mutajenik formudur (Tekkes,2006). Oksijenin enerjetik olarak uyarılan bu formunda reaktivite çok yüksektir. Aldığı enerjiyi çevreye dalga enerjisi şeklinde verip yeniden oksijene dönebilir. Başlıca şu mekanizmalarla vücutta oluşabilir:

- a) Pigmentlerin (örneğin flavin içeren nükleotidler, retinal, bilirubin) oksijenli ortamda ışığı absorblamasıyla
- b) Hidroperoksitlerin metaller varlığındaki yıkım tepkimelerinde
- c) Kendiliğinden dismutasyon tepkimeleri sırasında
- d) Prostaglandin endoperoksit sentaz, sitokrom p450 tepkimeleri, myelo/kloro/laktoperoksidaz enzimlerinin etkileri sırasında

Oksijenin bu enerjetik reaksiyonu sonucunda iki tip singlet oksijen üretilir.

Sigma singlet oksijen: Enerjisi daha fazladır ve çok kısa ömürlüdür.

Delta singlet oksijen: Daha uzun ömürlüdür ve gözlenen kimyasal reaksiyonlardan esas sorumlu form olduğu kabul edilmektedir (Yurdakul,2003).

Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enerjiyi transfer eder, ya da kovalent tepkimelere girer. Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. Doymamış yağ asitleri ile de doğrudan

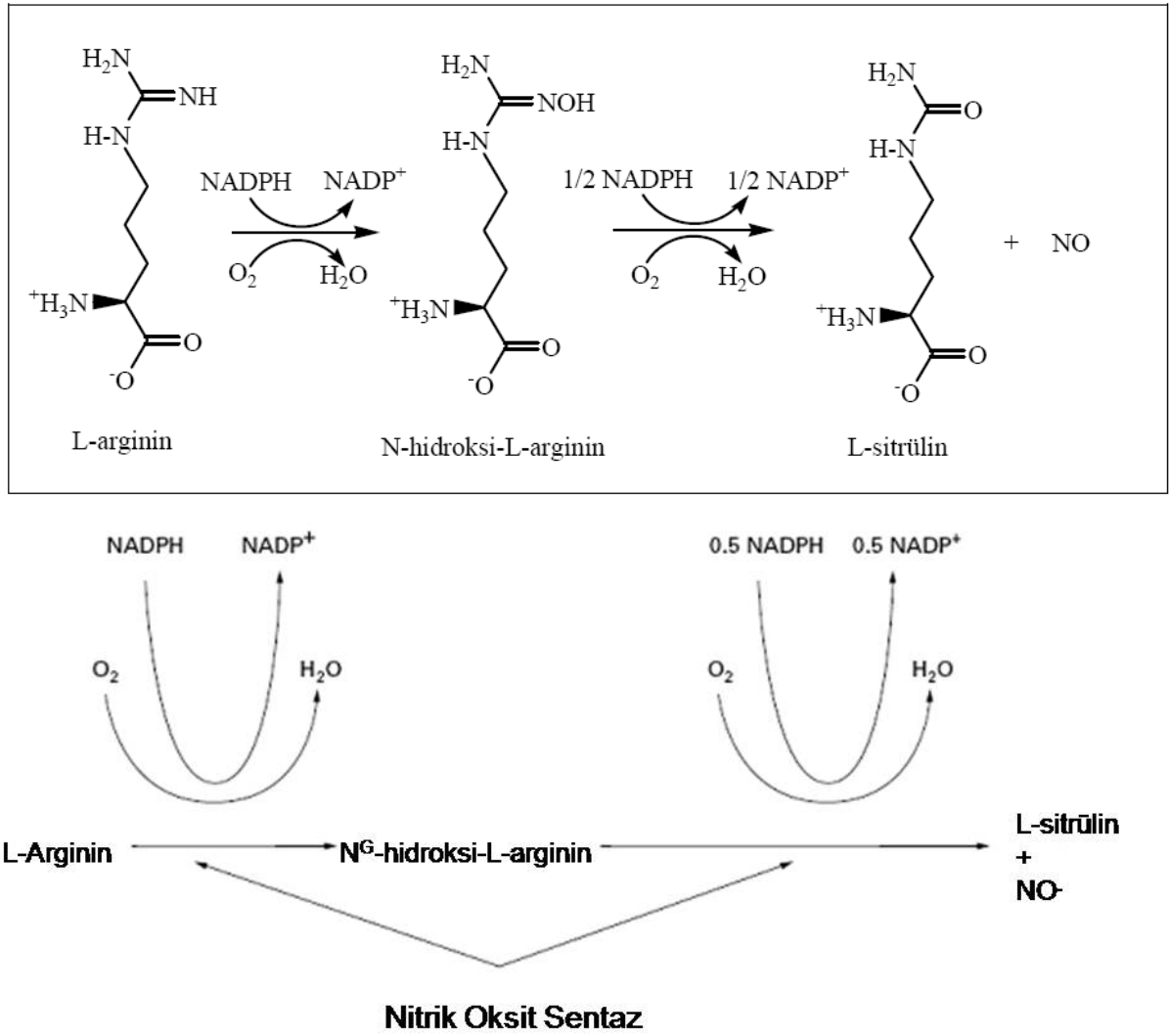
tepkimeye girerek peroksi radikalin, oluşturur ve hidroksil radikali kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir(Yurdakul,2003).

Singlet oksijenin oluşumu fotokimyasal reaksiyonlarda oldukça önemlidir (Gutteridge,1995)

2.2.5. NİTRİK OKSİT (NO·)

Nitrik oksit (NO·) steriospesifik bir yöntemle nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından katalizlenen tepkimeye yarı esansiyel bir aminoasit olan L-argininin terminel guanido nitrojen atomundan sentez edilir (Calver ve ark.,1993).

Şekil 4. Nitrik oksit oluşumundaki kimyasal reaksiyon (Burgner ve ark.,1999)



Nitrik oksit renksiz bir gaz olup, serbest radikal özelliğine sahip basit bir moleküldür. π^*2p dış orbitalindeki paylaşılmamış tek elektron, bu moleküle radikal özelliği kazandırır. Diğer radikal türlerin aksine (örneğin oksijen ve karbon merkezli radikaller), nitrik oksit radikalinde paylaşılmamış elektron nitrojen atomu üzerinde yerleşik değil; fakat nitrojen ve oksijen atomları üzerinde delokalize bir şekilde bulunur. Nitrik oksit radikalinin bu özelliği kendi reaktivitesini baskılar, stabilitesini arttırır ve biyolojik koşullarda sentezlendiği yerden daha uzak mesafelere difüzyonunu kolaylaştırır (Kılınç ve Kılınç,2003).

Radikalik tepkimeler yönünden reaktivitesi az da olsa, NO büyük bir afinite ile organik yapılardaki metal merkezlere bağlanır. NO, organik radikallerle difüzyon limitine yakın bir hızla tepkimeye girerek nitrojen içeren organik bileşiklerin oluşumuna neden olur. Nitrik oksitin biyolojik moleküllerle başlıca önemli tepkimeleri ise kendiliğinden oksidasyonu sonucunda oluşan *reaktif nitrojen oksit türleri* aracılığı ile gerçekleşir (Kılınç ve Kılınç,2003).

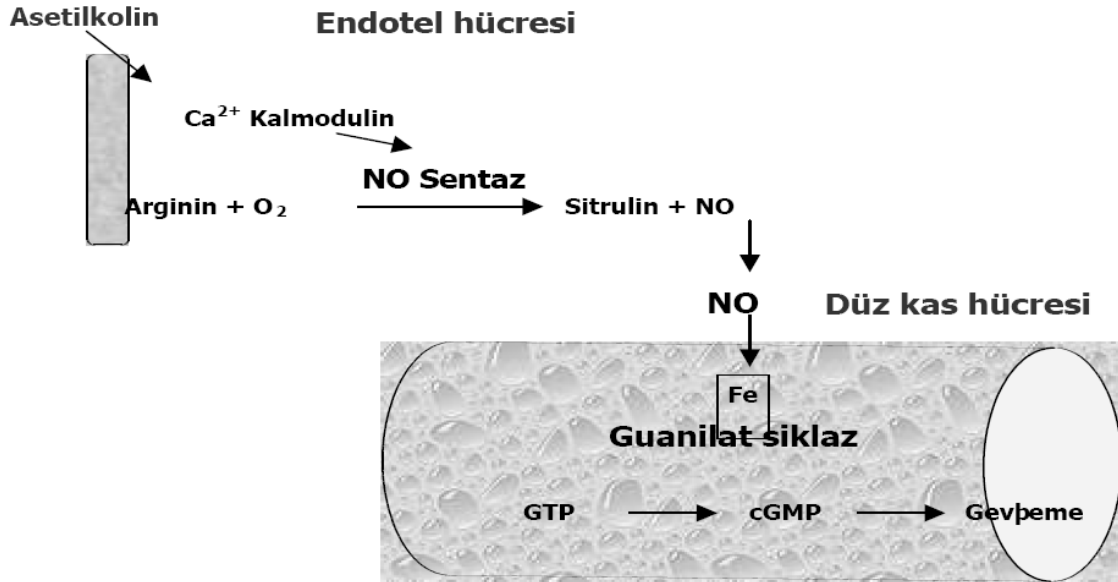
Nitrik oksitin çözünür (sitoplazmik) guanilat siklaz enzimini aktive ettiği ve damar düz kaslarında gevşemeye neden olduğu 1970'li yılların sonlarından beri biliniyordu (Kılınç ve Kılınç,2003). 1986 yılında Furchgott ve Ignarro Enotel kaynaklı gevşeme faktörünün (EDRF) NO olabileceğini öne sürmüşlerdir. Bir yıl sonra da Moncado ve arkadaşları NO'nin EDRF'nin biyolojik aktivitesini açıkladığını belirtmişlerdir (Calver ve ark.,1993).

Arjininden NO sentezi sadece insanlara özgül bir olay değildir. İnsan dışında, bütün memeliler de dahil olmak üzere çok çeşitli canlı türleri NO sentezlemekte çeşitli biyolojik etkileri için kullanmaktadırlar (Kılınç ve Kılınç,2003).

NO sentezini katalizleyen NOS enzimlerinin iki temel izoformu bulunur.

1) Konstitütif NOS (cNOS) (Ca^{+2} bağımlı enzim) (Calver ve ark.,1993)

a) Endotelial Nitrik Oksit Sentaz (eNOS) Endotelial nitrik oksit sentaz konstitütif olarak endotel hücreleri tarafından exprese olurlar (Burgner ve ark.,1999). Endotelial nitrik oksit sentaz kofaktör olarak NADPH ve Ca^{+2} /kalmoduline ihtiyaç duyar N^G -Metil-L-arginin (L-NMA) ve N^G -nitro-L-arginin (L-NNA) gibi arginin analogları tarafından kompetitif olarak inhibe edilir. Bu inhibitörler kardiyovasküler sistemin fizyolojik ve patofizyolojik kontrolünde in vitro ve invivo çalışmalarda NO 'in oynadığı rolü açıklamada kullanılır (Calver ve ark.,1993). Endotel hücreleri tarafından sentezlenen NO, difüzyonla düz kas hücrelerine geçerek guanilat siklazı aktive edip, cGMP seviyesini artırır ve düz kaslarda gevşemeyi temin eder. Kalsiyum pompalarının sitoplazmik kalsiyum derişimini düşürmesi ile eNOS aktivasyonu sona ereceğinden; eNOS tarafından kısa süre ile ve düşük derişimde NO sentezi sağlanır (Kılınç ve Kılınç,2003).



Şekil 5. NO sentezi ve damar düz kası hücresindeki etkisi (Kırkpantur ve Altun,2006)

b) Nöronal Nitrik Oksit Sentaz (nNOS) Nöronal nitrik oksit sentaz, cerebral cotex, hipocampus ve corpus striatum'da ve cerebellumdaki bütün basket hücreleri granüllerinde bulunur (Kılınç ve Kılınç,2003).

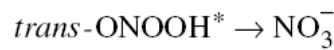
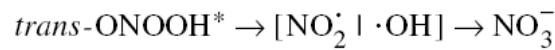
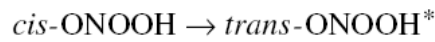
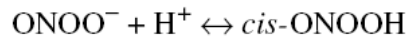
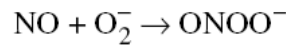
2) İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS) (Ca^{+2} bağımsız enzim) (Calver ve ark.,1993) Konstitütif enzimlerin aksine, fagositik lökositler ve diğer hücre türlerinde bulunur (Kılınç ve Kılınç,2003).

ENDOTELLERDEN NİTRİK OKSİT SALINIMI: Kan damarlarında kanın akış hızının artması endotel hücreler üzerinde mekanik bir kuvvet (Shear stres) oluşturarak NO sentez ve salınımını artırır. Shear stres potasyum kanallarının aktivasyonuna neden olarak hiperpolarizasyona; hiperpolarizasyon ise daha fazla Ca^{+2} girişine neden olarak NO sentezini artırır. Endotellerdeki Ca^{+2} bağımlı NO salınım fazı geçici bir süre için olup, bunu Ca^{+2} bağımsız faz izler. Ca^{+2} bağımlı olmayan NO salınımı mekanik uyarı olduğu sürece devam eder ve bu tür salınımdan eNOS enziminin tirozin fosforilasyonu ile aktivasyonu sorumludur.

Kan akış hızının yarattığı kuvvetin yanı sıra çok sayıda biyomolekül endotel hücredeki NO sentez ve salınım hızını artırır (Kılınç ve Kılınç,1993).

Kültürdeki endotel hücreleri bir fiziksel ve kimyasal stimulasyondan sorumlu NO'ı spontan olarak salarlar. Bununla birlikte NO salınımı asetilkoline karşı değildir, bununda sebebinin asetilkolin reseptörlerinin kaybı veya hücre kültüründe reseptör-efektör etkisinin kaybı olduğu sanılmaktadır (Calver ve ark.,1993).

NİTRİK OKSİTİN VASKÜLER ETKİSİNİN SÜPEROKSİT İLE KONTROLÜ: Nitrik oksit ve süperoksit radikali arasındaki reaksiyon oksidatif stresin temel aracısı $ONNO^{\cdot -}$ 'nun oluşmasıyla sonuçlanır. $ONNO^{\cdot -}$ 'in parçalanması peroksinitröz asiti oluşturur ($ONOOH$, pKa 6.8) ki bu da $trans-ONOOH^*$, $\cdot NO_2$, ve $\cdot OH$ gibi hedef moleküle ya bir ya da iki elektron kazandırmasıyla sonuçlanır (Espey ve ark.,2002).



Tepkime ürünü olan peroksinitritin NO benzeri aktivitesi çok düşüktür, (NO 'in %1'i kadar) ancak güçlü bir oksidandır. Kan damarlarında süperoksit konstitütif olarak devamlı sentezlenir. Böylece süperoksit kan damarlarında NO derişimini kontrol ederek onun vazodilatör etkisini düzenler. Kan damarlarında süperoksit dismutaz enziminin dietilditiyokarbamat ile inhibe edilmesi durumunda süperoksit derişimi on katına çıkar ve NO

bağımlı relaksasyon inhibe olur. Aort ve koroner arterlerde süperoksit sentezini sağlayan enzim nötrofillerdeki NAD(P)H oksidaz enzimine benzer. Farklı olarak bu enzim devamlı aktif formda olup, nötrofillerdeki gibi aktivasyona gerek duymaz. Kan damarlarında süperoksit sentezini sağlayan bu enzimin aktivitesi hipertansiyonlu kişilerde yüksektir ve aktivitesi anjiyotensin II tarafından artırılır. Çeşitli vasküler hastalıklarda süperoksit yapımının artması ile süperoksit dismutazın kapasitesi aşılabildiğinden; NO süperoksit tarafından inaktive edilir. Böylece normal seviyelerde üretilen süperoksit NO derişimini, dolayısıyla etkisini kontrol ederken; patolojik durumlardaki yüksek derişimi hem NO'nin fonksiyonlarını önler, hem de oluşan oksidan tür (peroksinitrit) nedeniyle oksidatif hasarlara neden olur (Kılınç ve Kılınç,2003).

NİTRİK OKSİTİN BİYOLOJİK SİSTEMLERDEKİ ETKİLERİ: Nitrik oksit ve süperoksit serbest radikaldirler (en dış yörüngede eşleşmemiş elektron taşırlar). Süperoksit radikali NO ile karşılaştığında hızla reaksiyona girer ve nitrojen oksit (NOO-) oluşur. Reaktif oksijen türlerinin insanda NO düzeyini azalttığına dair kanıtlar vardır (Akçakoyun,2004).

NO, biyolojik aktivitesini temel olarak 2 mekanizma ile gösterir. Yapılan çalışmalar NO'nin birçok biyolojik aktivitesinde her iki mekanizmayı da kullandığını göstermektedir (Balcı,2007).

Bu mekanizmalar:

- 1- NO aracılı siklik guanozin monofosfat (cGMP) bağımlı,
- 2- cGMP bağımsız mekanizmadır.

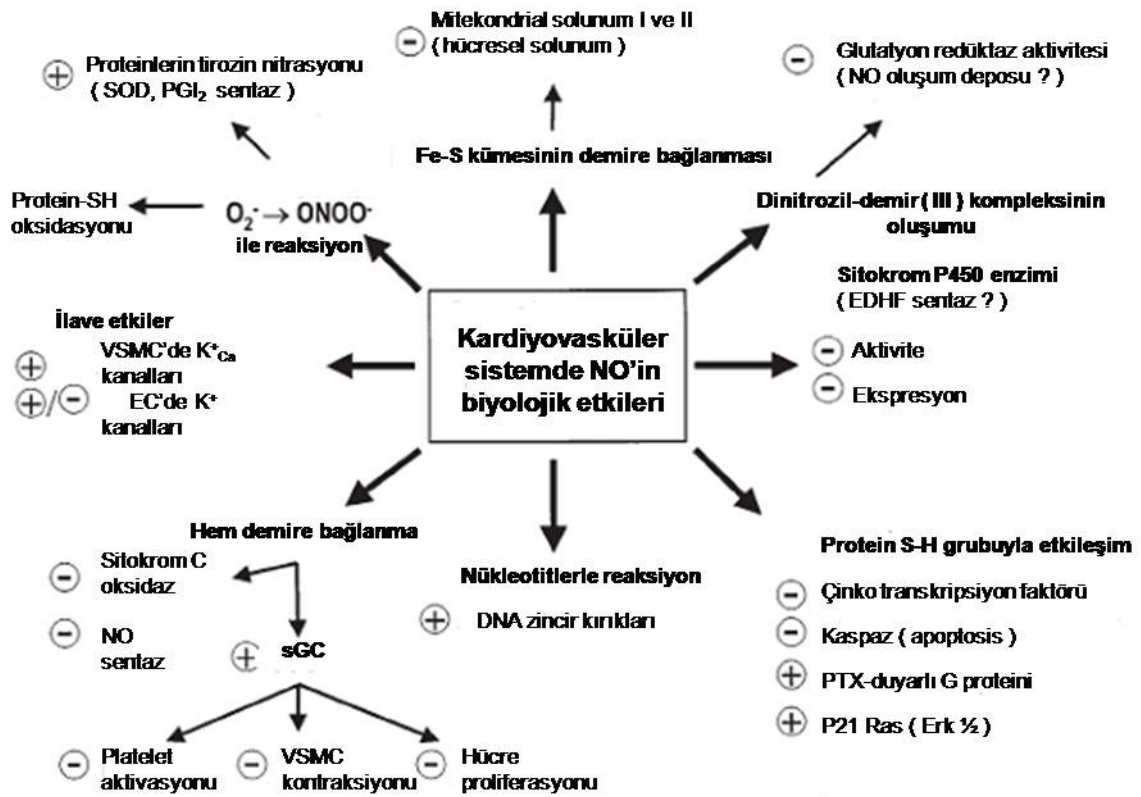
Bunlara ek olarak NO, guanilat siklaz ve cGMP'den bağımsız olarak da bazı etkilere aracılık eder. iNOS ile salıverilen yüksek konsantrasyondaki NO tümör hücreleri üzerinde immün efektör molekül olarak bir etkiye sahiptir (Balcı,2007).

NO molekülü pikomolar düzeylerde cNSO ile fizyolojik ve koruyucu etki gösterir. NO, fizyolojik şartlarda mukus salgısını ve epitel hücrelerde sıvı sekresyonunu artırarak mikropalara, toksinlere ve safra tuzları gibi iritan maddelere karşı koruyucu etki gösterir. Endotel kaynaklı NO farklı organlarda kan basıncı, kan akımı ve vasküler tonusun fizyolojik olarak düzenlenmesinde rol oynar. NO salınımı farklı reseptör bağımlı (asetilkolin, bradikinin, histamin, adenin nükleotidler ve serotonin) ve bağımsız (serbest yağ asitleri) agonistlerce uyarılabilir. Endotel hücreleri dolaşımdaki kan tarafından endotele oluşturulan fiziksel bası kuvvetini biyokimyasal sinyallere dönüştürür (Gross,1995).

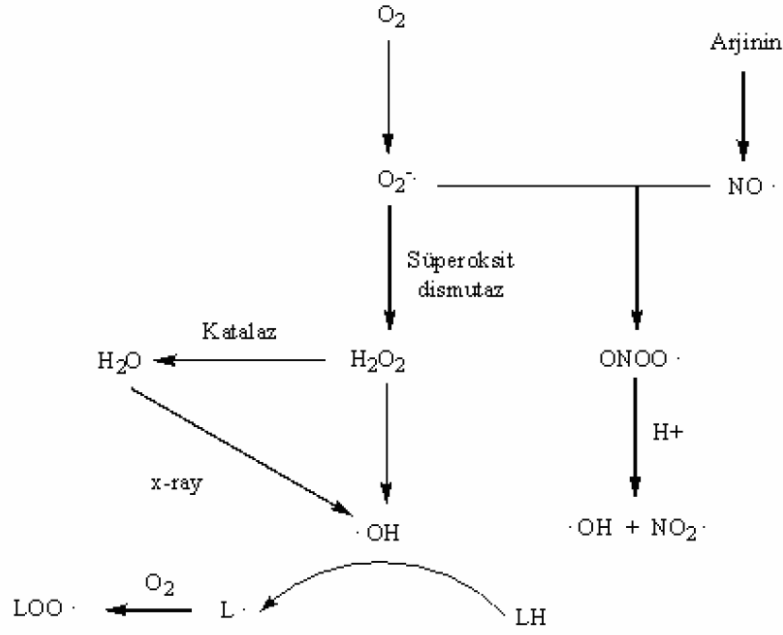
NO'nin DNA hasarını artırıcı etkisi vardır. Ayrıca NO demirsulfür içeren enzimlerin

fonksiyonunu değiştirir, mitokondrial solunumu bozucu zararlı etkiler gösterir (Gross,1995).

Regülatör ve koruyucu etkilerinin yanı sıra, NO sitotoksik etkilere de sahiptir. Artrit, ateroskleroz, doku enfeksiyonları, dejeneratif nöronal hastalıklar, diyabet ve pek çok hastalıklarda NO sentezi artar ve üretilen NO doku hasarlarına doğrudan katkıda bulunur. Nitrik oksitin sitotoksik etkilerinin moleküler düzeydeki nedeni, NO'ten kaynaklanan reaktif türlerin enzim inhibisyonlarına, DNA parçalanmalarına, zar lipidlerinin oksidatif yıkımına ve hücrel antioksidanların tüketimine neden olmalarıdır (Kılınç ve kılınç,2003).



Şekil 6. Vasküler sistemde nitrik oksitin biyolojik etkileri (Fleming ve Busse,1999)



Şekil 7. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu.

2.3. SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ

Hidroksil radikali, süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin küçük miktarları aerobik organizmalarda hem iç hem de dış stimülasyonun sağlanmasından sorumludur. Reaktif oksijen türlerinin düşük seviyeleri bir çok kimyasal prosesinde (hücre farklılaşmasında, hücreler arası mesajlaşmada, hücre devamlılığında, büyümede, apoptozisde, bağışıklıkta, mikroorganizmalara karşı savunmada) olmak zorundadır.

Aksine yüksek dozda veya gereğinden fazla bulunan reaktif oksijen türleri, biyolojik makromoleküllerin hasarı ve metabolik fonksiyon bozukluğuna neden olan oksidatif strese neden olur. Yüksek konsantrasyonlardaki reaktif oksijen türlerinin, hücre yapısının nükleik asitlerin, lipidlerin ve proteinlerin uğradığı hasarda önemli bir payı vardır. Serbest radikaller vücutta antioksidan savunma mekanizmasının kapasitesini aştıkları zaman çeşitli bozukluklara yol açarlar. Karbonhidrat, lipid, protein ve DNA gibi biyomoleküllerin tüm sınıfları ve tüm hücre komponentleri ile etkileşme özelliği göstererek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olurlar. Serbest oksijen radikallerinin artması membran poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımına (lipid peroksidasyonuna) neden olabilmekle

birlikte protein, karbohidrat ve nükleik asitleri deoksidasyona uğratarak oksidatif strese yol açmakta ve çeşitli patolojilere neden olabilmektedir (Tekkes, 2006, Berköz ve ark., 2008, Valko ve ark., 2006, Mates ve ark., 1999).

Çizelge 3. Serbest radikallerin hücredeki başlıca etkileri: (Yanbeyi, 1999)

Doymamış yağlar	Kolesterol ve yağ asitlerinde oksidasyon Lipidlerde çapraz bağlanmalar Organel ve hücrelerde çapraz bağlanmalar
Karbonhidratlar	Polisakkaritlerin depolimerizasyonu
Nükleik asit bazları	Hidroksilasyonlar Mutasyonlar, kimyasal modifikasyonlar Şekerlerde benzer reaksiyonlar
Kükürtlü amino asitler	Protein denatürasyonu ve çaprazlanma Enzimlerde inhibisyon
Proteinler	Peptid zincirlerinde kopma Denatürasyon
Nükleik asitler	Tek ve çift iplikçik kırılmaları Proteinlerde çapraz bağlar Baz içermeyen bölgeler
Hiyaluronik asit	Sinovyal sıvı akışkanlığında değişme

DNA:
Nokta mutasyon
DNA-DNA ve DNA-protein çapraz bağı
Kardeş kromatid değişimi
Tek veya çift zincir kırılması
G-T değişimiyle artan 8-OH-dG seviyesi
5-hidroksi-dC, 5-hidroksi-dU ve üridin gibi diğer oksidasyon kaynaklı ürünler
C-T değişimiyle glikol

Protein:
Amino asit oksidasyonu
Post-translasyonel modifikasyonlar
S-nitrozilasyonu ile eNOS aracılı RAS aktivasyonu

Lipit:
Lipitlerde bulunan çokludoymamış yağ asitlerinin oksidasyonu
Dolaylı olarak lipit sentez inhibisyonu ya da yağ asiti desaturasyonu veya lipaz aktivasyonu
Lipit hidroperoksitlerin demir aracılı dağılması konjuge dienler, hidrokarbon gazları,
MDA gibi karbonil bileşikler, aklenler, alkadienler, α,β unsatüre aldehitler gibi ardı sıra gelen ürünlerin artmasını sağlar

(Angel ve ark.,2010)

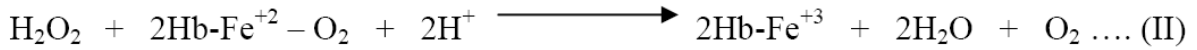
2.3.1. PROTEİNLER

Hücrenin protein yapıları, serbest radikallerin özellikle duyarlı amino asitler ile direkt/doğrudan etkileşimi sonucunda hasara uğramaktadır.

Kükürt içeren aminoasitler ve doymamış aminoasitlerin (triptofan, tyrozin, fenilalanin, metiyonin, sistein, histidin) serbest radikallerle reaksiyonları sonucu kimyasal değişiklikler ortaya çıkar. Aktifliği, yukarıdaki aminoasitlere bağlı olan papain ve gliseralehit- 3-fosfat dehidrogenaz gibi enzimler, serbest radikallere maruz kaldıkları zaman inhibe olurlar. Sitoplazmik ve membran proteinleri, çapraz bağlanma sonucu dimerleşirler. Çok aktif olan hidroksil radikalleri, peptit ve aminoasitlerde hidroksilasyona neden olarak onların yapı ve fonksiyonlarını bozarlar.

Oksidasyon sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında oluşan değişiklikler fonksiyonlarını etkilemektedir. Enzim veya reseptör fonksiyonuna sahip membran proteinleri, özellikle serbest radikallerin modifikasyonlarına duyarlı oldukları için protein oksidasyonu ile önemli hücresel ve membran fonksiyonları bozulmaktadır .

(Akpoyraz ve Durak,1995,Akkoç,2008,Tekkes,2006)



2.3.2. NÜKLEİK ASİTLER ve DNA

Her türlü radyasyon (u.v., görünür ışık, ısı ve X ışınları v.b.) hücrelerde iyonların, serbest radikallerin ve enerji kazanmış moleküllerin oluşmasına neden olur. Serbest radikaller DNA'yı etkileyerek nükleik asit modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine bağlı olarak hücrede mutasyona yol açarlar. Hidroksil radikalleri, DNA daki heterosiklik bazlarla ve deoksiriboz-fosfatlarla reaksiyon verirler. Reaksiyon sonucu, DNA bazlarını modifiye eder ve riboz-fosfat zincirinin kırılmasına yol açar. İnvitro olarak sulu çözeltilerde yapılan çalışmalarda, hidroksil radikalının, deoksiriboz ve tetrasiklik bazlarla kolaylıkla reaksiyon verdiği gözlenmiştir. Fakat, çift zincirli DNA molekülünde, heterosiklik bazlar hidroksil radikallerine karşı sterik olarak çok iyi korunmuşlardır. Ayrıca, enzimatik radikal yakalayıcılar, öncü hidroksil radikallerinin konsantrasyonunu düşürerek DNA'yı korurlar.

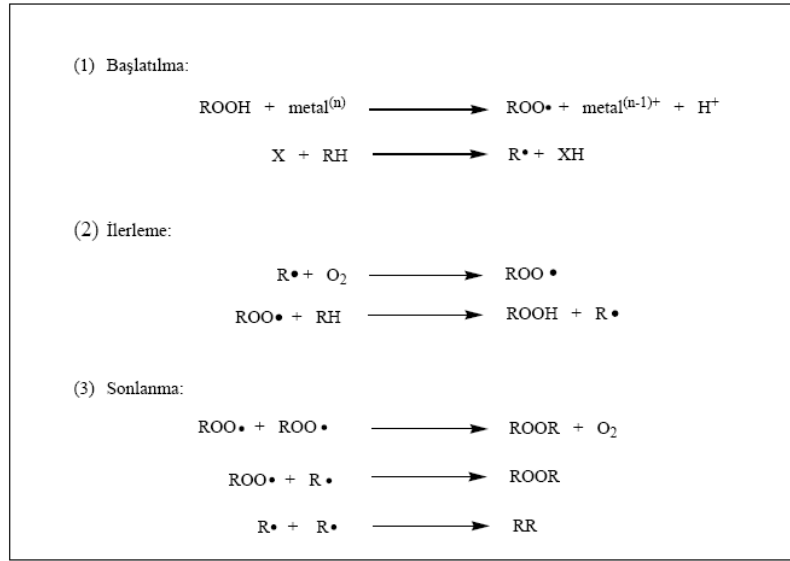
Vücudumuzdaki her bir hücrede DNA hergün 104 oksidatif hasara maruz kalarak 20'den fazla farklı oksidatif DNA lezyonlarının oluşumuna yol açar. Bu lezyonların çoğu mutajenik olarak bilinen bu lezyonları iyileştirebilen spesifik glikozilaz, endonukleaz ve egzonukleaz gibi DNA tamir enzimleri vardır. Bununla birlikte bu tamir mekanizmaları mükemmel değildir. Bu mekanizmalar lezyonların %992'ünü temizlemesine rağmen %1'i kalır ve bu da zamanla lezyonların birikmesine yol açar bu da oksidatif DNA hasarının sebep olduğu mutasyonları zamanla artırır (Akpoyraz,1995,Kargın ve Fidancı,1997).

2.3.3 ZAR YAPISINDAKİ LİPİDLER (LİPİD PEROKSİDASYONU)

Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştukları zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları serbest radikaller tarafından etkilenirler fakat lipidler en hassas olanlarıdır (Akkuş,1995). Membran kolesterolü ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle reaksiyona girerek, peroksidasyona uğrarlar. Radikallerin reaksiyonu sonucu, lipit peroksitler, lipit alkoller ve aldehit yapısında yan ürünler oluşur. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu, malondialdehit (MDA) meydana gelir. Bu tip reaksiyonlarda, polidoymamış yağ asitlerinden (PUFAH) radikal başlatıcıların yardımı ile hidroksil ve PUFA. radikalleri oluşur. Bunun, moleküler oksijenle (O_2) reaksiyona girmesi sonucunda lipit peroksit ara ürünleri (PUFA-O-O.) meydana gelir. Radikalik reaksiyonun bitiminde, aldehitler ve hidroksi – yağ asitleri ile membran yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu kısa zincirli ürünler oluşur. Bunlar, malondialdehit ($OHC-CH_2-CHO$), $ROOH$, $R\dot{C}OOH$, $R\dot{C}HO$ ve ROH yapısındaki bileşiklerdir. Bu bileşikler, membranın geçirgenliğini ve mikrovizkozitesini önemli derecede değiştirirler. Bunlardan, malondialdehit, membran komponentlerinin çapraz bağlanmasına yol açar. Bu durum, membran iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitelerinin değişmesine ve benzer daha birçok olumsuz durumun ortaya çıkmasına neden olur . Küçük bir molekül olan malondialdehit, kolay difüzlenebildiği için DNA bazları ile rahatlıkla reaksiyona girer. Bütün bu olumsuz etkiler, malondialdehite mutajenik genotoksik ve konserojenik bir özellik verir. Superoksid radikali ve onun yıkım ürünleri olan hidroksil radikali ile hidrojen peroksit mitokondrium, lizozom ve plazma membranları üzerinde lipid peroksidasyonu vasıtasıyla hücrel hasar meydana getirir . Hücre membranlarında lipid peroksidasyonu yoluyla meydana gelen hücre hasarı, membran permeabilite artışından hücre lizisine kadar değişebilir .

Kısaca, serbest oksijen radikallerinin membran lipidleriyle etkileşmesi zincirleme reaksiyonlarla devam eden lipid peroksidasyonunu başlatarak; membran yapısının bozulmasına, permeabilite artışına, hücrenin iyon gradientinin sürdürülememesine ve doku hasarına yol açabilir (Akpoyraz ve Durak,1995,L1 ve ark.,2002,Selçuk ve ark.,1996).

Lipid peroksidasyonu bir zincir tepkimesi şeklinde başlayıp, daha ileri peroksidasyonu başlatacak serbest radikaller için kesintisiz bir kaynak oluşturur. Kendi kendini devam ettiren bu zincir reaksiyonların hücre membranına hasarı geri dönüşümsüzdür. Zincir reaksiyonlarının tamamı aşağıdaki şekilde özetlenmiştir.

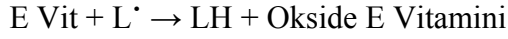
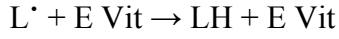


Şekil 8. Lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonları (Murray ve ark., 1996)

Hücre membranında meydana gelen lipid peroksidasyonu, membran lipoproteinlerinin oksidasyonu ve yapısal bütünlüğün bozulmasına yol açarak, anormal iyon girişiyle birlikte hücre ölümüne neden olur. Bu olayın kontrol edilememesi halinde oluşan zincir reaksiyon ile hücre ölümünün yayılması ortaya çıkar (Tekkes,2006).

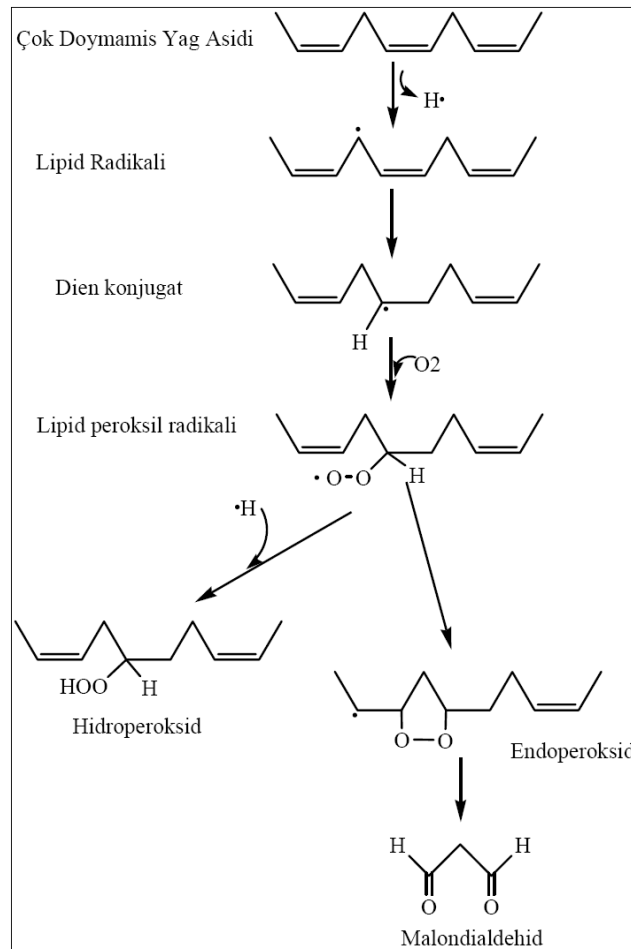
Lipid peroksidasyonu ya toplayıcı reaksiyonlarla sonlandırılır ya da otokatalitik yayılma reaksiyonlarıyla devam eder.

Oldukça kararlı olan lipit hidroperoksitleri lipit peroksidasyonunun ilk ürünüdür. Lipit peroksidasyonunun sürekli olarak devam ettiği durumlarda E vitamini gibi zincirleme tepkimeyi sonlandırıcı bir antioksidan ile lipit peroksidasyonu sonlanabilir.



Geçiş metalleri varlığında lipid hidroperoksitleri bu metallerin redoks döngüsüyle birlikte lipid peroksidasyonunu başlatabilecek radikallerin oluşumuna neden olabilirler. Lipitlerden araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine “enzimatik lipid peroksidasyonu”, diğer radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna ise “non-enzimatik lipid peroksidasyonu” denir .

Lipit proksidasyonunun son bileşeni olan malondialdehit peroksidasyona uğramış çoklu doymamış yağ asitlerinin bölünmesiyle oluşan üç karbonlu bir dialdehidtir ve oksidatif durumun göstergesi olarak yaygın kullanılır. Bu dialdehid biyolojik ortamda makromoleküllerin NH₂ ve/veya SH gruplarına bağlı veya serbest olarak bulunur. Oluşan malondialdehit; deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi zar özelliklerinin değişmesine yol açar (Antmen,2005).



Şekil 9. Lipid peroksidasyonunun kimyasal yolu (Murray ve ark., 1996)

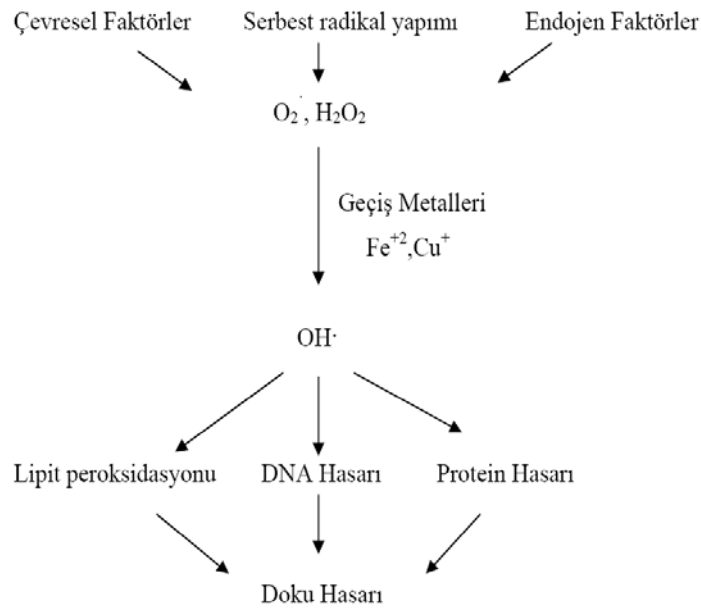
29

2.3.4 SİTOSOLİK MOLEKÜLLER

Çözünür karakterli birçok hücre bileşeni, serbest radikalleri yokedicı görev yaparlar. Örneğın, oksihemoglobin gibi hemoproteinleri, süperoksit, ve hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek methamoglobin oluşturlar. Bu reaksiyon, hemoproteinlerin, oksijen radikalleri tarafından kolaylıkla tahrip edilebileceğini göstermektedir. Diğer önemli bir sitoplazmik hemoprotein, katalaz (CAT) enzimidir. Katalaz süperoksit radikali tarafından aynı şekilde tahrip edilebilmektedir. Bu tür bir reaksiyon CAT aktivitesinin düşmesine ve hücrenin, daha çok radikal ve hidrojen peroksit tahribatına maruz kalmasına yol açmaktadır (Akpoyraz ve Durak,1995).

2.3.5 KARBONHİDRATLAR

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Glukoz, mannoz ve deoksi şekerler fizyolojik şartlarda otooksidasyona uğrayarak, süperoksit ve hidrojen peroksiti meydana getirirler. Monosakkaritlerin otooksidasyonunun, protein çapraz bağlanmalarına yol açarak agrega olmalarına sebep olduğu gibi bazal membran kalınlaşmasına ve sonuçta katarakt, mikroanjiopati gelişimine de sebep oldukları ileri sürülmektedir (Yanbeyi, 1999).



Şekil 11. Vücutta serbest radikallerin temel kaynakları ve serbest radikal hasarının sonuçları (Young ve Woodside, 2001)

2.3.6 HÜCRE DIŞI ETKİLER

Osteoartritlerde, serbest radikallerin, kollagen ve hyaluranik asit üzerine etkileri sonucu, dejenerasyon ve buna bağlı olarak iltihabi bir durum olduğu gözlenmiştir. Sinoviyal sıvıya vizkosite sağlayan hyaluranik asit, süperoksit radikal ile etkileşince depolimerizasyona uğrar. Süperoksit dismutaz ve katalaz, hücre dışı sıvılarda çok düşük aktiviteli olduklarından az miktardaki oksijen radikalleri bile büyük hasarlara yol açabilmektedir (Akpoyraz ve Durak,1995).

2.4 ANTİOKSİDAN SAVUNMA MEKANİZMALARI

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Savunma mekanizması serbest radikallerin sebep olduğu oksidatif stres hasarlarına karşıdır: koruyucu mekanizma, tamir mekanizması, fiziksel savunma ve antioksidan savunmalar.

Bu mekanizmalardan bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önler. Bu işlevleri yapan maddelerin tümüne birden genel olarak antioksidanlar denir

Antioksidanlar, sellüler lokalizasyonları yanında fonksiyonlarına göre de sınıflandırılmaktadır. Genelde, radikal oluşumunu önleyen (metal şelatörler, SOD, CAT, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve oluşan radikallerin dokudaki etkilerini önleyen (E vitamini, ubikinon, retinoik asit, betakaroten, glutatyon, ürat) antioksidanlar olarak iki kategoride incelenirler. Ayrıca enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılırlar. Hücrelerin hem sıvı hem de membran kısımlarında bulunabilirler. Enzimatik ve non-enzimatik antioksidan sistemler SOD, GSH-Px, CAT, askorbik asit (vitamin C), glutatyon, α -tokoferol (vitamin E), β -karoten ve vitamin A gibi kolay fotometrik ölçümlerle bulunabilen antioksidanlardır. Bu antioksidanların hem aktiviteleri hem de hücreler arası seviyeleri arasında bir denge vardır ki organizmaların sağlığı ve canlılığı için gereklidirler (Tekkes, 2006, Yanbeyi, 1999, Mates ve ark.,1999, Valko ve ark., 2006).

Çizelge 4. Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma sistemi (Yanbeyi,1999)

Enzimatik	Nonenzimatik	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon (GSH)	Albümin
Katalaz (KAT)	α -Tokoferol (vit E)	Seruloplazmin
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	Askorbat (vit C)	Transferrin
Fosfolipid hidroperoksit glutasyon	β -Karoten	Ferritin
Peroksidaz (PLGSH-Px)	Flavonoidler	Laktoferrin
Glutasyon S-transferaz (GST)	Ürat	Melatonin
Glutasyon redüktaz (GSSG-R)	Bilirubin	Sistein

Antioksidanlar lokalizasyonlarına göre hücre içi, membran ve hücre dışı antioksidanlar diye de sınıflandırılır (Gutteridge,1995).

HÜCRE İÇİ ANTIOKSIDANLAR: Reaktif Oksijen Metabolitleri, SOD, GSH-Px, CAT ve sitokrom oksidaz gibi selüler antioksidan enzimlerce indirgenir.

Aerobik canlılardaki süperoksit ve hidrojen peroksit gibi radikallerin varlığı radikallerin yüksek konsantrasyonlarının hücresel yaşam için risk olduğunu göstermesi açısından önemlidir. Antioksidan enzimlerin toksik karakterli redüksiyon ürünlerini elimine etmeleri, hücrelerin normal metabolizması sürdükçe gerçekleşen bir aktivitedir (Dündar ve Aslan,2000). Antioksidanlar hücrede birkaç farklı şekilde korumayı sağlarlar; (a) radikal oluşumunu önleme (b) radikaller oluştuğunda onları durdurmak (c) radikallerin neden olduğu oksidatif hasarı tamir etmek (d) molekül hasarını ortadan kaldırmak (e) mutasyon oluşumunu en aza indirmek için hasarlanmış molekülleri tamir etmemek (Gutteridge,1995).

Çizelge 5. Hücre içi antioksidanlar (Gutteridge,1995)

Süperoksit Dismutaz (Cu, Zn, Mn)	Katalitik olarak süperoksit radikalini yok eder.
Katalaz 4 NADPH molekülü içerir.(Fe)	H_2O_2 'nin yüksek konsantrasyonlarında onu yok eder.
Glutasyon Peroksidaz (Se)	Organik hidroperoksitler ve düşük konsantrasyonlardaki H_2O_2 'yi yok eder.
Sitokrom oksidazla(Cu) O_2^- , H_2O_2 , OH. oluşumunun önlenmesi	O_2 'nin H_2O_2 'ye indirgenmesi sırasında aktif oksijen salınımını engeller.

MEMBRAN ANTİOKSİDANLARI: Membren hidrofobik lipid yüzeyinde intraselüler ortamdan farklı olarak lipitlerde çözünen ve hücrel enzimlerle yok edilmeyen radikaller üretilir. Başlıca E vitamini olmak üzere , A vitamini ubiquinal bileşikleri ve koenzim Q temel membran antioksidanlarıdır (Dündar ve Aslan,2000).

Membran stabilitesi ve korunmasının en önemli kısmı lipid komponentlerinin bir arada tutulmasına bağlıdır. Bu yapısal organizasyon fosfolipitten kolesterole doğru oranda olmaya ihtiyaç duyar (Gutteridge,1995).

Çizelge 6. Membran antioksidanları (Gutteridge,1995).

Vitamin E	Yağda erir, zincir kırıcı antioksidandır.
β -Karoten	Yağda erir, radikal kovucudur, singlet oksijenin etkisini yok eder.
Koenzim-Q	Enerji metabolizmasındaki temel rolüne ek olarak antioksidan gibi davranır.
Yapısal membran organizasyonu	Kolesterol ve yağ asitleri geçişliliği için önemlidir.

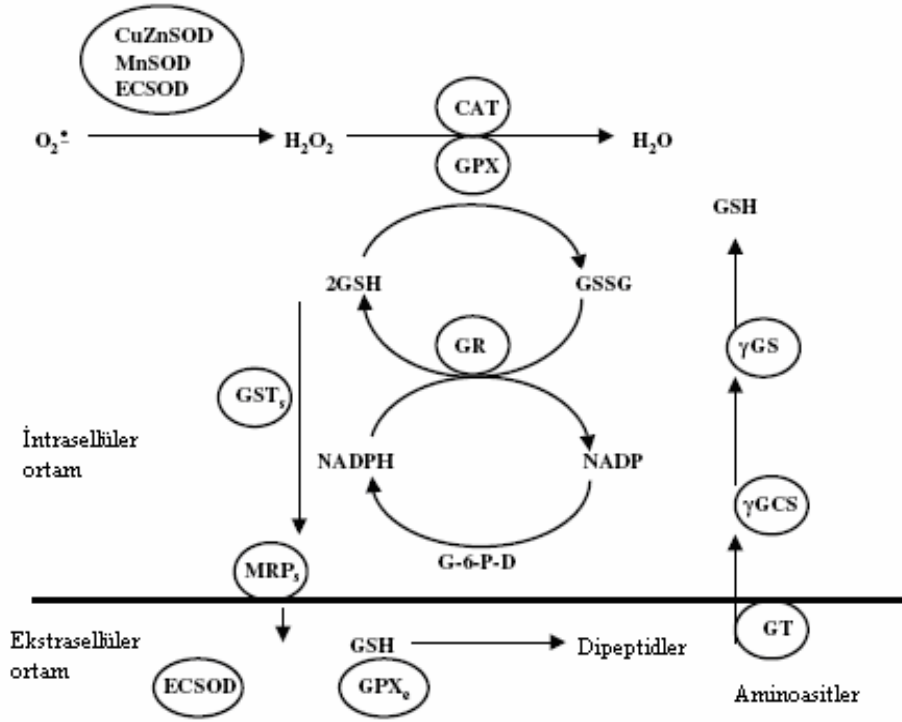
Çizelge 7. Hücre dışı antioksidanlar (Gutteridge,1995)

Transferin	Ferrik iyonla bağlanır
Laktoferin	Daha düşük pH'da ferik iyonla bağlanır
Haptogloblin	Hemoglobine bağlanır
Hemopeksin	Heme bağlanır
Askorbik asit	OH. kovucusu
Bilirubin	Peroksil radikali kovucusu
EC-SOD	Katalitik olarak $O_2^{\cdot -}$ 'i yok eder
EC-GSHPx	Katalitik olarak hidroperoksitleri ve H_2O_2 'i yok eder. Plazmada az miktarda glutatyon bulunur.
Mukus	OH. kovucusu
Glukoz	OH. kovucusu
Eritrosit	Hücre içine H_2O_2 'nin difüzyonunu, anyon kanallarına $O_2^{\cdot -}$ 'in geçişini sağlar. (Katalaz ve SOD içeren eritrositler)

Ekstraselüler antioksidanlar: Vücut hücre dışı sıvıları hücre içinde bulunan antioksidan enzimleri içermez (Gutteridge,1995).

Antioksidanlar etkilerini, şimdiye kadar tesbit edilebilen altı değişik mekanizma ile gösterirler. Bu mekanizmalar, birbirinden bağımsız veya bir arada işleyebilmektedirler.

1. Oksijen ile reaksiyona girerek ya da onun yerini alarak lokal oksijen konsantrasyonunu azaltabilirler.
 2. Hidroksil radikali yapısında yer alan hidrojen atomları bağ oluşturabilecek yapıdaki ürünleri temizleyerek peroksidasyonun başlamasını önleyebilirler.
 3. Membran lipidlerine direkt etkiyerek peroksit oluşturabilen singlet oksijeni baskılayabilir ya da temizleyebilirler
 4. Metal iyonlarını bağlamak yoluyla reaktif grupların (hidroksil radikali., ferril ya da $Fe^{+2}/Fe^{+3}/O_2$ kompleksleri gibi) ve /veya lipid peroksitlerden peroksil ve alkoksil radikallerinin oluşumunu önleyebilirler. Membranlarda lipid peroksidasyonunun başlamasına hangi reaktif ürünlerin neden olduğu tartışılmaktadır, ancak hem başlangıç için ve hem de oluşan lipid peroksitlerinin dekompozisyonu için transisyonel metal iyonlarına ihtiyaç olduğu konusunda genel bir kanı vardır.
 5. Peroksitleri, alkol gibi nonradikal ürünlere çevirebilirler. Örneğin; GSH-Px, peroksitleri bu yolla temizleyen bir antioksidandır.
 6. Zinciri kırabilirler yani; zincir oluşumuna neden olabilen serbest radikallerle reaksiyona girebilirler ve yağ asidi zincirlerinden sürekli hidrojen iyonu salınımını önleyebilirler. Zincir kırıcı antioksidanlar için de fenoller, aromatik aminler ve en yaygın olanı E-vitamini yer almakla birlikte başka lipid solubl zincir kırıcı antioksidanlar da vardır
- Bir oksidatif zincirde antioksidanlar, farklı basamaklarda etki gösterirler (Tekkes, 2006, Yanbeyi, 1999).



Şekil 12. İnsan dokularındaki major antioksidan enzimler ve bağlı yollar. CuZnSOD (bakır-çinko SOD), MnSOD (manganez SOD), ECSOD (ekstrasellüler SOD), CAT (katalaz), GSH-Px (glutatyon peroksidaz), GSH-Rd (glutatyon redüktaz), GSH (redükte glutatyon), GSSG (okside glutatyon), GST (glutatyon S transferaz), MRP (Multidrug resistans protein), G6PD (glukoz-6- fosfat dehidrogenaz), cGS (gama glutamil transpeptidaz), cGCS (gama glutamil sisteinil sentetaz),(glutamat sistein ligaz), GS (glutatyon sentaz), GPXe (ekstrasellüler glutatyon peroksidaz) (Kınnula ve ark.,2004)

2.5 ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR

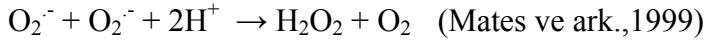
Canlı organizmalarda bulunan başlıca enzimatik antioksidanlar:

2.5.1. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD)

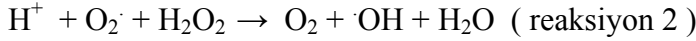
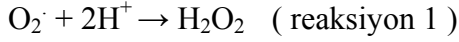
Süperoksit dismutaz (E.C. 1.15.1.1) oldukça reaktif olan süperoksit anyonunu $O_2^{\bullet-}$ 'ne ve daha az reaktif bir tür olan H_2O_2 'ye dismutasyonunu katalizleyen bir antioksidan enzimdir. Peroksit CAT ve GSH-Px enzimlerinin reaksiyonuyla etkisiz hale getirilmektedir (Mates ve

ark.,1999). Süperoksit dismutaz selüler bölmelerdeki süperoksit düzeylerini kontrol etmede önemli bir rol oynar. (Akkuş,1995)

SOD



İlk olarak 1968 yılında McCord ve Fridovich tarafından tanımlanmıştır. (Yanbeyi,1999)



Süperoksit dismutaz, reaksiyon 1'in hızını önemli ölçüde artırır. Böylelikle süperoksit radikalının hızlı bir şekilde eliminasyonunu sağlar ve reaksiyon 2'nin oluşumunu engeller. (Yanbeyi,1999)

Memeli dokularında subsellüler konumlarına ve farklı dokularda bulunmalarına göre 3 çeşit SOD vardır (Young ve Woodside,2001).

1- Bakır ve Çinko Süperoksit Dismutaz: (CuZn - SOD)

Bakır ve çinko süperoksit dismutaz tüm memeli hücrelerinin organelleri ve sitoplazmasında bulunur. Moleküler ağırlığı kabaca 32.000 kDa'dur ve her biri katalitik aktiviteye sahip bakır ve çinko atomlarını içeren iki tane protein alt ünitesi vardır (Young ve Woodside,2001). Her bir alt ünite bir histamin rezidüsü tarafından köprülenmiş bir çinko atomu ve bir bakır atomu tarafından meydana gelen bir metal grubu ve aktif bölge içerir (Mates ve ark.,1999). Dismutasyon bakır ile süperoksit radikali arasındaki etkileşimle başlar. Enzim de Zn ve Cu aynı histidin aminoasitine bağlı, siyanid Zn'ye bağlanarak enzimi tersinir olarak inhibe eder. Enzimin etkinliği için Cu mutlaka gerekli iken Zn; Co^{2+} , Hg^{2+} veya Cd^{2+} ile yer değiştirebilir (Yanbeyi,1999). CuZn-SOD antioksidan savunmanın ilk basamağında önemli bir role sahiptir (Mates ve ark.,1999).

2-Mangan Süperoksit Dismutaz: (Mn - SOD)

Mangan süperoksit dismutaz tüm hücrelerin mitokondrilerinde bulunur ve moleküler ağırlığı 40.000 kDa'dur. Dört tane protein alt ünitesinden (96 kda) oluşur ve her biri tek bir

mangan atomu içerir. Mangan süperoksit dismutazın amino asit dizisi CuZn-SOD'unkinden tamamen farklıdır ve siyanid ile inhibe edilemez bu da iki enzimin karışmamasını sağlar (Young ve Woodside,2001,Mates ve ark.,1999). Mitekondrideki solunum zinciri oksijen radikallerinin temel kaynağıdır.

Diğerleri arasında Mn- SOD'un biyolojik önemi kanıtlanmıştır.

*Aerobik koşullar altında yaşayan *Escherichia coli*'de Mn- SOD genlerinin inaktivasyonu mutasyonda artmaya sebep olmuştur.

**Saccharomyces cerevisiae*'daki genlerin eliminasyonu oksijene duyarlılığını arttırmıştır.

*Dilate kardiyomiyopati ve yenidoğan ölümleri görülen farelerde Mn- SOD'da tanımlanamamazlık mevcuttur.

*Tümör nekrosis Faktör (TNF) Mn- SOD'u seçici olarak bastırır ama kültüre edilmiş hücrelerde ve çeşitli fare dokularında CuZn-SOD, CAT, GSH-Px'i bastırmaz.

*Mangan süperoksit dismutaz DNA'sının kültüre edilmiş hücrelere transfeksiyonu hücreleri paraquata dayanıklı hale getirmiştir (Mates ve ark.,1999).

3-Demir Süperoksit Dismutaz: (Fe - SOD)

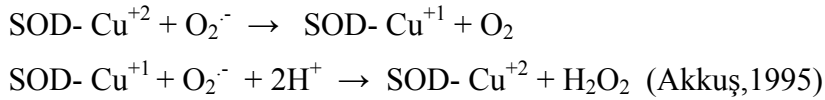
Demir içeren demir süperoksit dismutaz izoenzimi sadece prokaryotlarda izole edilmiştir, ökaryotlarda bulunmaz. Bu dismutaz kofaktörü dışında Mn- SOD' benzer. Oksijen derişiminin artması ile Mn- SOD indüklenir. Bu tip mikroorganizmalarda matriks enziminin (Mn- SOD) endojen süperoksit radikallerine karşı; demir içeren dismutazın ise çevreden gelen radikallere karşı koruyucu fonksiyon gördüğü kabul edilmektedir (Yanbeyi,1999).

4-Ekstrasellüler Süperoksit Dismutaz: (EC - SOD)

Ekstrasellüler süperoksit dismutaz 1982'de Marklund tarafından tanımlanmıştır. CuZn-SOD'dan salgısal bakır ve çinko içermesiyle ayrılır. EC-SOD fibroblast ve endotel hücrelerinin içinde bulunduğu birkaç hücre tarafından sentez edilir. EC-SOD hücre dışı sıvıdaki temel SOD'dur ve heparin enjeksiyonundan sonra vasküler endotel yüzeyinden dolaşıma salınır. Vasküler tonusun düzenlenmesinde EC-SOD büyük bir rol oynar çünkü endotel kaynaklı relaxing faktör süperoksit tarafından plazmada nötralize edilir (Young ve Woodside, 2001).

Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku pO₂ artışı ile artar. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit üretimi olmasına rağmen bu enzim sayesinde intraselüler süperoksid düzeyleri düşük tutulur. SOD'un ekstraselüler aktivitesi çok düşüktür (akkuş,1995).

Süperoksit dismutazın, süperoksit anyonuna olan etkisi şu şekildedir. Süperoksit anyonu Cu⁺² ve bir arginin rezidüsünün guanido grubuna bağlanır. Bu bağlanma sonucunda süperoksitten bir elektron Cu⁺²'ye transfer olurken Cu⁺¹'den bir elektron, bağlanma ortağından ise iki proton alarak hidrojen peroksiti oluştururken, enzim tekrar Cu⁺² formuna dönüşmüş olur (Akkuş,1995).



2.5.2. KATALAZ (CAT)

Katalaz (H₂O₂: H₂O₂ oksidoredüktaz, EC 1.11.1.6) 4 tane hem grubu ve bir molekül NADPH bulunan bir hemoproteindir. Görevi hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalamaktır. Peroksidaz aktivitesine sahip oluşuna ek olarak, bu enzim bir molekül hidrojen peroksiti elektron verici bir substrat olarak diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir. Peroksizomlarda lokalizedir (Akkuş,1995).

katalaz



Katalaz karakterize edilen ilk antioksidan enzimdir ve hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene iki safhada dönüştürür (Young ve Woodside,2001).

Katalaz-Fe(III) + H₂O₂ (1. Bileşik)

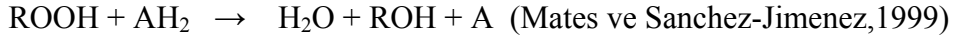


Sitoplazmada %20 ve peroksizomlarda %80 oranında lokalizedir. Peroksizomların içinde bulunan proteinlerin % 40'ını H₂O₂'yi yıkan katalaz enzimi oluşturmaktadır. Katalazın

indirgeyici aktivitesi H₂O₂ ve metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine ise etki etmez (Yanbeyi,1999).

Katalaz hidrojen peroksiti su ve oksijene parçaladığı gibi bir hidrojen vericisiyle metanol, etanol, formik asit ve fenolde oluşturabilir.

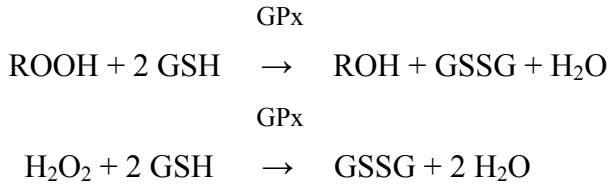
katalaz



Katalaz en fazla karaciğer ve eritrositlerde aktivite gösterir ama bazen tüm dokularda da bulunabilir (Young ve Woodside,2001).

2.5.3. GLUTATYON PEROKSİDAZ (GSH-PX)

Glutatyon peroksidaz (EC 1.11.1.19) glutatyonu kullanarak çeşitli hidroperoksitlerin (ROOH ve H₂O₂) indirgenmesini katalizler bu nedenle memeli hücrelerini oksidatif hasara karşı korur (Mates ve Sanchez-Jimenez,1999,Mates ve ark.,1999). Gerçekte glutatyon metabolizması en önemli antioksidatif savunma mekanizmasıdır (Mates ve ark.,1999).



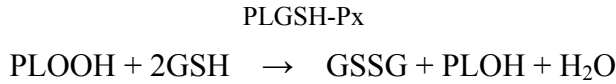
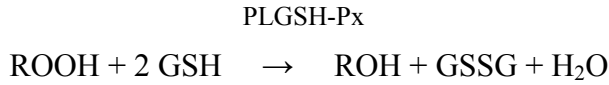
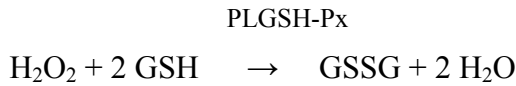
Glutatyon peroksidazın molekül ağırlığı yaklaşık 85.000 D'dur (Akkuş,1995). Selenyum içerikli glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi için gerekli tanımlanmış 4 tane subünitesinin her birinde tek bir selenosistein rezidüsü içeren sitozolik bir enzimdir (Mates ve ark.,1999).

Endotel hücrelerinde özellikle akciğerde en etkili bir enzimdir. Bu enzimin varlığı ilk defa Mills tarafından 1957 yılında memeli eritrositlerinde saptanmıştır. Enzim aktivitesinin % 60-75'i ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında bulunur. % 25-40'ı ise mitekondridedir. Enzim aktivitesinin en fazla olduğu dokular ise eritrositler ve karaciğerdir. (Yanbeyi,1999)

Memelilerde 5 tane GSH-Px izoenzimi bulunur. Hepsi aynı şekilde söylenmesine rağmen dokularda her bir izoformu çeşitli şekillerde bulunur. Sitozolik ve mitekondrial

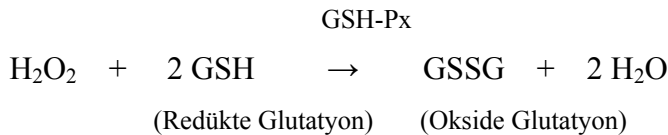
glutasyon peroksidaz (cGPx veya GPx1) glutasyon varlığında yağ asidi hidroperoksitlerini ve hidrojen peroksiti indirger. GPx1 ve fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidazı bir çok dokuda bulunur. GPx4 hem sitozolde hem membranda bulunur. PHGPx (PLGSH-Px) perokside membran ve okside lipoproteinler tarafından üretilen yağ asidi hidroperoksitlerini, kolesterol hidroperoksitlerini ve fosfolipid hidroperoksitlerini indirger. GPx1 eritrositlerde, böbrekde ve karaciğerde yoğun olarak bulunur ve GPx4 böbrek epitelyum hücrelerinde ve testislerde bulunur. Sitozolik GPx2 veya GPx-G1 ve ekstraselüler GPx3 veya GPx-P sırasıyla gastrointestinal bölge ve böbrek dışında birçok dokuda az miktarda bulunur. Geçenlerde GPx5 yeni bir üye olarak tanımlanmıştır. GPx5 fare epididimisinde bulunmuş ve ilginç olanı da selenyum bağımsız olması (Mates ve ark.,1999).

Fosfolipid hidroperoksid glutasyon peroksidaz da (PLGSH-Px) molekül ağırlığı 20.000 dalton olan monomerik, selenyum atomu içeren sitozolik bir enzimdir. Membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger (Akkuş,1995).



Membrana bağlı en önemli antioksidan olan Vitamin E yetersiz olduğu zaman PLGSH-Px membranın peroksidasyona karşı korunmasını sağlar.

Hidroperoksitlerin redükte olması ile meydana gelen okside glutasyon (GSSG), glutasyon redüktazın (GR) katalizlediği reaksiyon ile tekrar glutasyona (GSH) dönüşür (Akkuş,1995).



Glutasyon peroksidazın hücredeki dağılımı glutasyon redüktaza bağımlıdır. Her iki enzimde sitozolde en yüksek konsantrasyonlarda bulunur (Yanbeyi,1999)

2.6. NON-ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR

Organizmada bulunan bazı önemli non-enzimatik antioksidanlar:

2.6.1. VİTAMİNLER

E VİTAMİNİ (α -tokoferol): E Vitamin tokoferol yapısında olup ilk olarak Evans ve Sure tarafından tanımlanmış ve 1938 yılında izole edilmiştir. Doğal olarak alfa, beta, gama, delta, eta ve zeta gibi çeşitli tokoferoller bulunmaktadır. Bunların hepsi izoprenoidlerin substate edildiği 6-hidroksi kromanlar veya tokollerdir. D- α -tokoferol en geniş doğal dağılımı ve en büyük biyolojik aktiviteyi gösterir. Antioksidan aktivitesi en yüksek olan tokoferolde α -tokoferol'dur (Akkuş,1995).

E vitamini dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunur. En yüksek vitamin E konsantrasyonları, mitekondri ve mikrozomlar gibi membrandan zengin hücre fraksiyonlarında bulunur. Miyokard membranlarındaki miktarda fazladır (Akkuş,1995).

Görevi; temel membran koruyucusudur, lipid-çözünür zincir-kıran antioksidandır, süperoksit ve singlet oksijenle direk olarak reaksiyona girebilir (Machlin ve Bendich,1987).

C VİTAMİNİ (askorbik asit): C vitamini bir ketolaktondur. L-askorbik asit ve L-dehidroaskorbik asit gibi iki aktif formu olan iyi bir redüktan maddedir (Yanbeyi,1999).

Görevi: Önemli bir suda çözünebilen zincir kırıcı antioksidandır. Süperoksit ve Singlet oksijenle direk olarak reaksiyona girebilir. Tokoferolü tokoferoksi radikalinden yeniden oluşturabilir (Machlin ve Bendich,1987).

C vitamininin antioksidan olarak esas görevi lipit hidroperoksitlerin oluşumunu engellemektir. Bu da aterosklerotik plak oluşumunu engellemede önemli rol üstlendiğini gösterir (Frei ve ark.,1990).

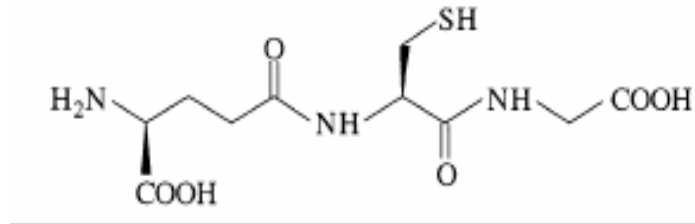
KAROTENOİDLER: Alkoller (retinoller), aldehitler (retinaller) ve retinoik asitler başta olmak üzere A vitamininin çeşitli türleri bulunur. A vitamininin en etkili ve en yaygın

türü β - karoten'dir. Suda çözünmeyen bu bileşik havada okside olarak inaktif ürünler oluşturur.

Görevi: A vitamininin antioksidan etkisi yanında gerekli olduğu sistemik etkiler hücre ve intrasellüler zar dayanıklılığının sağlanması, epitel dokunun bütünlüğünün sürdürülmesi ve glikoprotein sentezidir (Sies ve ark.,1992).

2.6.2. GLUTATYON (GSH)

Tripeptid yapıdaki GSH (L- γ - glutamil-L-sisteinil-glisin) oksidatif ve elektrofilik stres ve radyasyona karşı hücrelerin korunmasında önemli rol oynar . Glutatyon sitozolik glutatyon redoks döngüsünde substrat olarak rol alırken, reaktif oksijen türlerine karşı direkt olarak da savunma yapabilir (Knapen ve ark.,1999).



Redükte glutatyon

Hücrede milimolar derişimde bulunan GSH primer olarak redükte formda (GSH) bulunur ancak okside formda disülfid dimeri (GSSG) olarakta bulunabilir (Sies,1999).

2.6.3. UBİKİNON (Koenzim Q)

Ubikinon esas olarak mitokondride elektron transport zincirinin bir parçası olarak kullanılmaktadır, bunun yanında ubikinon düşük derişimlerde plazmada ve hücre zarlarında lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu antioksidan olarak bulunur.

Ubikinonun yenilenmesi lipoamid dehidrogenaz ve kısmen tiyoredoksin redüktazı da içeren enzim ailesinin diğer üyeleriyle gerçekleştirilir (Ernster ve Dallner,1999).

Diğer önemli non-enzimatik antioksidanlara, melatonin, selenyum, ürik asit, albümin, sistein, bilirubin, seruloplazmin, ferritin, transferin ve laktoferrin, haptogloblin ve hemopeksin,

mannitol, oksipurinol, probukol, deferoksamin, lipoik asit flavinoidler örnek olarak verilebilir (Demircan, 2005).

Çizelge 8. Reaktif oksijen türleri, antioksidanları ve ilave antioksidanları (Singh ve ark., 2004)

ROS	Antioksidanlar	(Endojen)	Antioksidanlar (eksojen)
	Direkt rolü	Dolaylı rolü	
Hidroksil radikali	Glutasyon peroksidaz (kofaktör-selenyum)	–	Vitamin C, lipoik asit
Lipit peroksit	Glutasyon peroksidaz (kofaktör-selenyum)	–	Vitamin E, beta-karoten
Süperoksit radikali	Süperoksit dismutaz (kofaktör Cu/Zn/Mn)	Seruplazmin (Cu) Metalotionin (Cu) Albumin (Cu)	Vitamin C
Hidrojen peroksit	Katalaz (kofaktör Fe)	Transferin (Fe) Ferritin (Fe) Myoglobin (Fe)	Vitamin C Beta-karoten Lipoik asit
Prooksidan/antioksidan dengesi	Tiyoller (GSH, Lipoik asit, N-asetil sistein, NADPH ve NADPH ubiquinon)	Bilurubin Ürik asit	Flavanoidler

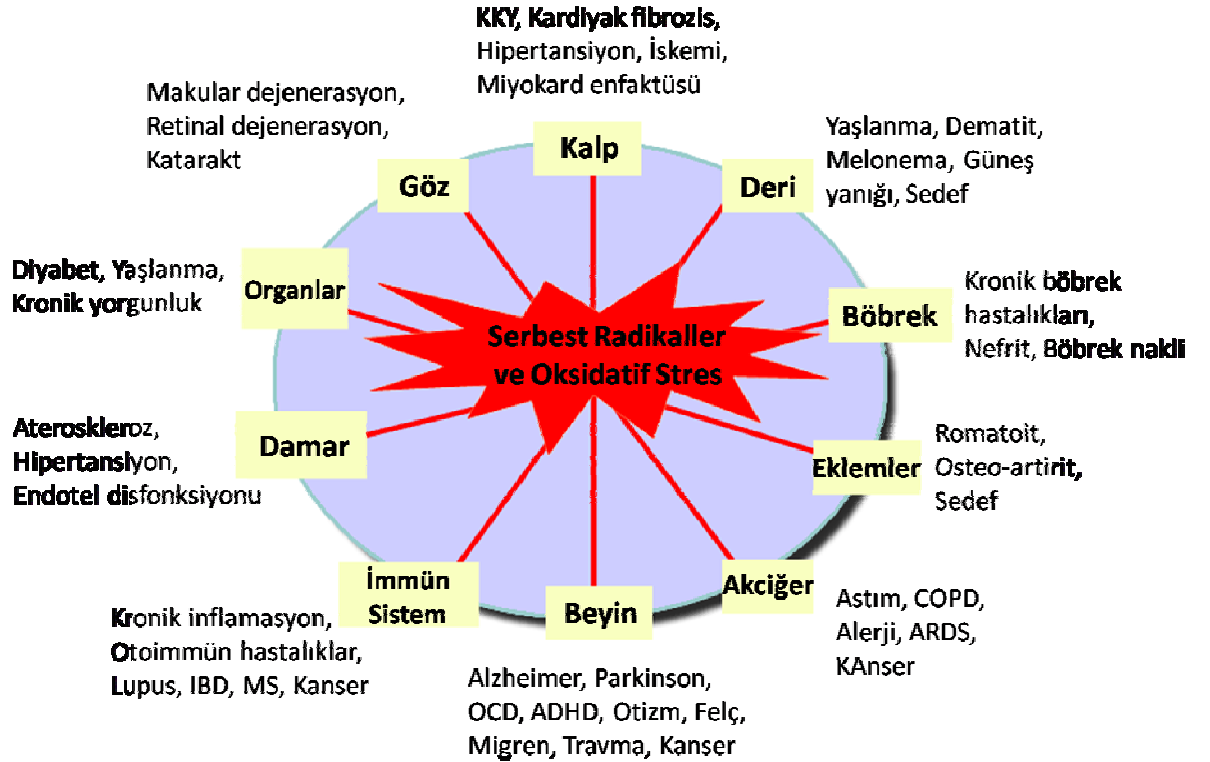
2.7. OKSİDATİF STRES VE HASTALIKLAR

Reaktif oksijen türleri kontrol edilmedikleri zaman netabolizmada oldukça reaktif bir duruma gelirler. Oksidatif DNA hasarını da içeren membran ve hücrel komponentlerdeki direk etkisi peroksidatif değişikliklerden kaynaklanır. Hücredeki SOD, GSH-Px ve CAT'ın süperoksit ve peroksitleri metallerle reaksiyona girip onların daha reaktif türleri

oluşturmalarına izin vermeden önce temizlemesi gerekmektedir. Sonuçta C vitamini, E vitamini, ubiquinon ve diğerleri gibi zincir kırıcı antioksidanlar tarafından sonlandırılan enzimatik yıkımdan kaçan reaktif türler tarafından peroksidatif zincir reaksiyonu başlatılır (Mates ve ark.,1999).

Reaktif oksijen türleri üretimindeki dengesizlik iskemi-reperfüzyon hasarı, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar, kanser ve alerji gibi bazı hastalıkların patogenezinde rol oynar. Antioksidanlarda sorun ortaya çıktığı zaman inflamasyon, hipertansiyon ve otoimmün koşullar meydana gelir. Örneğin inflamasyon hücrelerinde prokarsinojenlerin DNA hasarlı türlere aktive olmasıyla DNA hasarında artış meydana gelir (Mates ve ark.,1999).

Oksidatif/Nitrozatif stresin akut ve kronik hastalıklar üzerinde kanıtlanmış, oksidatif stres biomarkerlarıyla desteklenmiş ilişkisi vardır. Uzun zaman boyunca hastalıklar sürecinde bu biomarkerlar objektif olarak ölçülmüşlerdir (Valko ve ark.,2006).

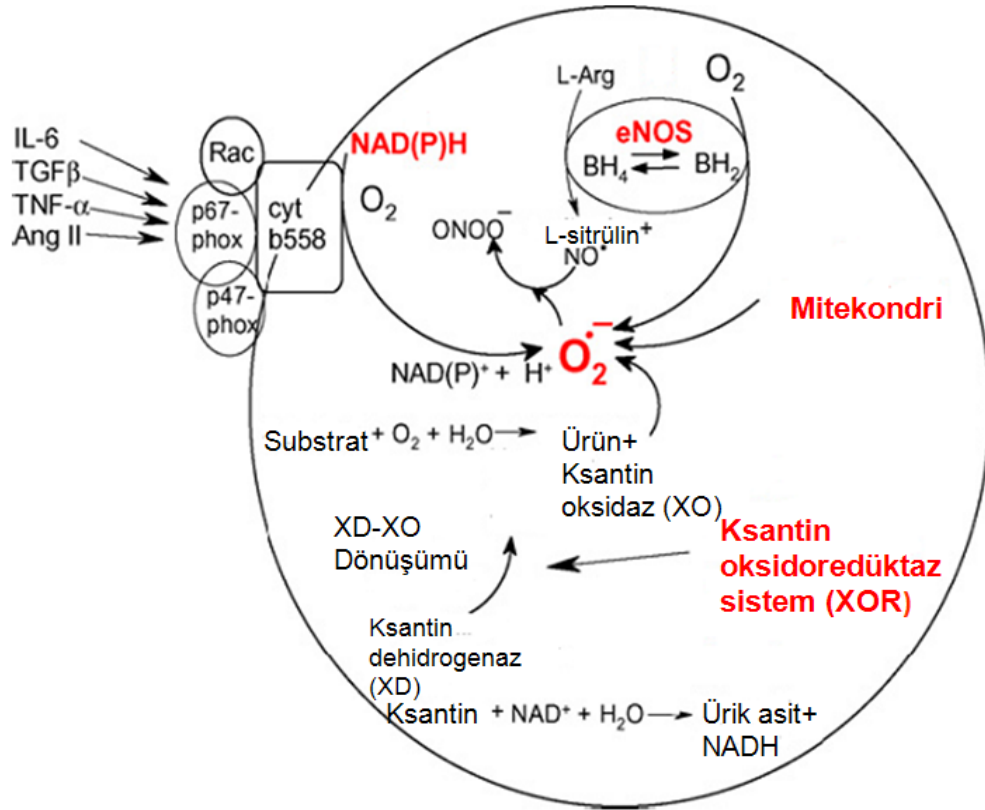


Şekil 13. Oksidatif stres ve hastalıklarla ilişkisi

OKSİDATİF STRES ENDOTEL DİSFONKSİYONU, ATEROSKLEROZ VE DİĞER KALP HASTALIKLARI ARASINDAKİ İLİŞKİ

Reaktif oksijen türlerinden kaynaklanan oksidatif stres kardiyak ve vasküler myositlerle ilişkili kardiyovasküler doku hasarına sebep olur. Oksidatif stres ve kardiyovasküler hastalıklar arasındaki bağlantı, ateroskleroz, iskemik kalp hastalıkları, hipertansiyon, kardiyomyopati, kardiyak hipertrofi ve konjestif kalp hastalığı gibi çeşitli kardiyovasküler hastalıklarda önemli rol oynar (Valko ve ark.,2006).

Kardiyovasküler sistemdeki temel oksidatif stres kaynakları ksantin oksidoredüktaz (XOR), NAD(P)H Oksidaz (multisubüniteli membran kompleksi) NOS'dur. Bunun yanında mitekondrial sitokromlar ve hemoglobinde temel kaynaklar arasında sayılır. NOSs ve hemoglobin reaktif nitrojen türlerinin temel kaynaklarındandır ve NO'yu ve SNOs (aminoasit, peptit ve proteinlerdeki NO modifiye edici sistein tiollerini içerir (Valko ve ark.,2006).



Şekil 14. Kardiyovasküler sistemde reaktif oksijen türleri temel oluşum yolları (Valko ve ark., 2006)

Kardiyovasküler hastalıkların temelinde ateroskleroz komplikasyonları yatar (Singh ve Jialal,2006). Aterogenezin erken safhalarında endotel disfonksiyonu görülür. Hasar gören endotel fonksiyonu birkaç risk faktörüyle birleştiği zaman daha da tehlikeli durumlar doğurabilir. Endotel disfonksiyonu uzun dönem aterosklerotik lezyonları önceden hazırlar, bu olay koroner sendromlar için önemli prognostik ve diagnostik zemin hazırlar (Vogiatzi ve ark.,2009).

Serbest oksijen radikalleri üretiminin aterogenezin başlangıç ayağı olan endotel disfonksiyonunu meydana getirdiği bilinmektedir. Oksidatif stres durumu LDL (ox-LDL / düşük yoğunluklu lipoprotein) oksidasyonunu gerçekleştirir. Bu lipoproteinler okside olmamış lipoproteinlere kıyasla makrofajlar tarafından daha kolay sindirilir (Vogiatzi ve ark.,2009).

ox-LDL'nin köpük hücresi oluşumunda ve aterogenezdeki rolü kesin olarak ispatlanmıştır. ox-LDL, aterojenik olaya dört mekanizma ile katılır.

. ox-LDL, makrofajlar tarafından toplayıcı reseptörler aracılığı ile alınır, böylece köpük hücresi ve lezyon oluşumuna sebep olur.

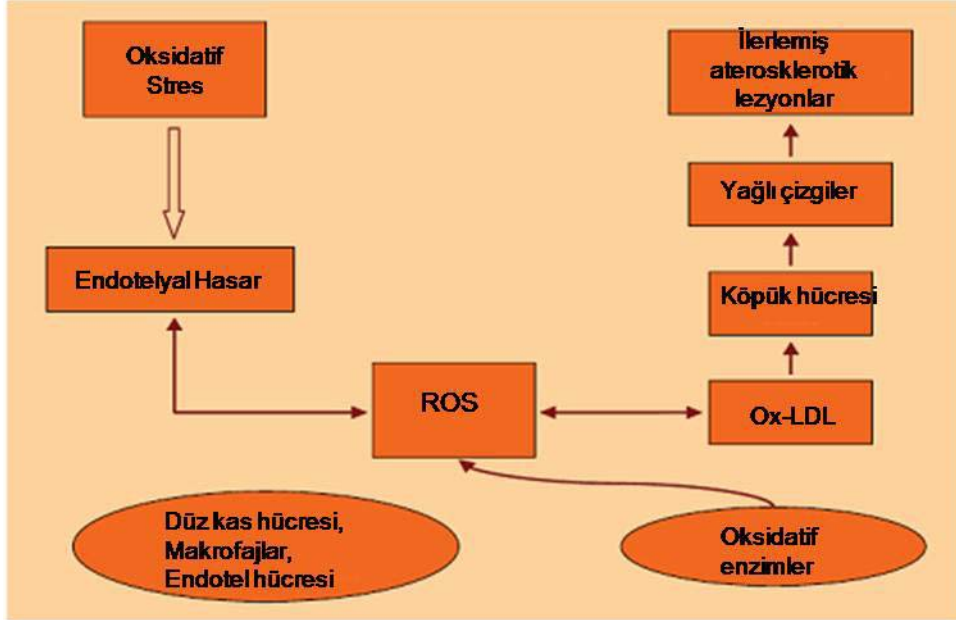
. ox-LDL, monositler için düz kas hücreleri ve endotelden salınan faktörler gibi kimyasal çekici bir maddedir. Makrofajların damar intimasına göç etmelerini hızlandırır, ayrıca makrofajların intimadan plazmaya kaçışını engelleyerek, arter intimasındaki kalış süresini de uzatır.

. ox-LDL, arter duvarındaki hücreler için sitotoksiktir. Hücresel hasar, endotel hasarı oluşturabilir.

. ox-LDL, EDRF (NO) aracılığı ile olan düz kas gevşemesini inhibe eder (Akkuş,1995).

Klinik ve epidemiyolojik çalışmalar artan LDL seviyesinin aterosklerozun daha erken oluşmasına sebep olduğunu göstermiştir (Singh ve Jialal,2006).

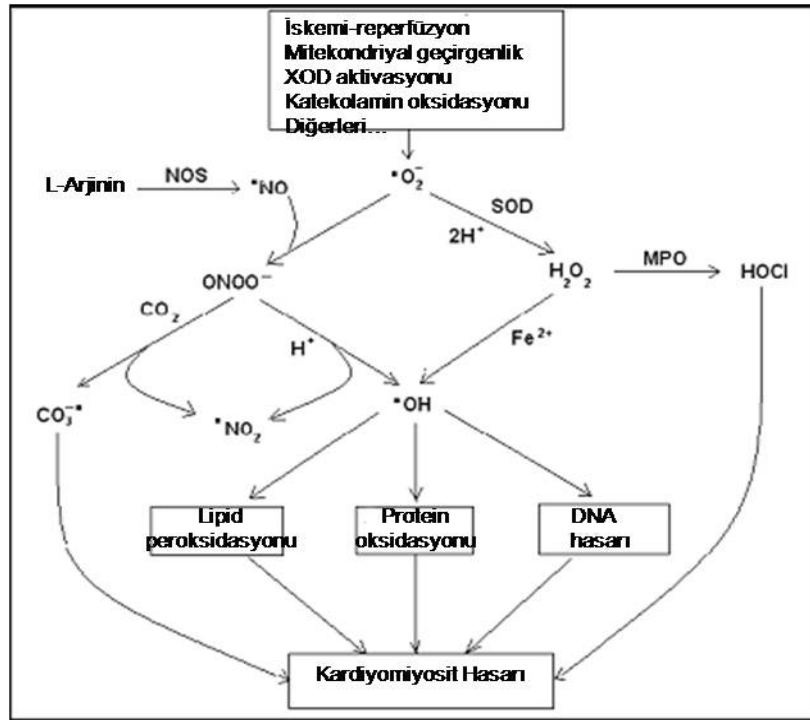
Reaktif oksijen türleri proteolitik matriks metaloproteinaz aktivasyonu ile kollojen matriks metabolizmasını değiştirir ki bu da plak oluşumunda önemli bir rol oynar (Nedeljkovic,2003).



Şekil 15. Ateroskleroz ve oksidatif stres arasındaki ilişki (Vogiatzi ve ark.,2009)

Hipoksi ve reoksijenasyon sırasında reaktif oksijen türleri oluşumunun primer yeri damar endotelidir. Endoteldeki reperfüzyon hasarının moleküler mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Reperfüzyonun indüklediği hasarı önlemek için, çeşitli antioksidanlar denenmektedir. Hipoksi-reoksijenasyon (ya da iskemi-reperfüzyon) hasarı kalpte hem koroner damarları (damar düz kası ve endotelini), hem de kalp kası hücrelerini etkilemektedir. Koroner damarlardaki hasar, koroner damar tonusunu değiştirebilir ve reperfüzyon esnasında koroner kan akışını etkileyebilir. Kas hücrelerindeki iskemi-reperfüzyon hasarına ek olarak koroner akışın azalması miyokardiyal disfonksiyonu artırmakta, bu da ölüm ve hastalıkla sonuçlanmaktadır (Sayın ve ark.,2008).

Kronik kalp yetmezliğinde (CHF) de oksidatif ve nitrozatif stres artışını kanıtlayan pek çok in vitro çalışma ve hayvan deneyi vardır. Ayrıca, hayvan çalışmalarında CHF'nin gelişmesine kalbin antioksidan savunma mekanizmalarında değişiklikler ve oksidatif miyokart hasarının eşlik ettiği görülmüştür. Öte yandan, genel olarak nitrozatif stres artışı oksidatif stres artışı ile bağıntılıdır. Nitrik oksit sentaz aktivitesi ve NO üretimindeki değişiklikler kalp yetmezliğini etkiler. Bu bilgiler, oksidatif / nitrozatif stres artışının, en azından CHF'nin ilerlemesine yol açan bir mekanizma olduğu düşüncesini doğrulmuştur (Yücel ve ark.,2006).



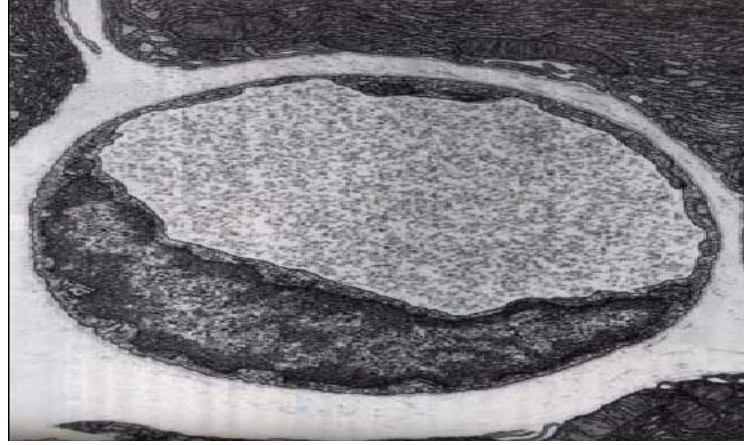
Şekil 16. Kronik kalp yetmezliğinde kardiyomyosit hasarıyla sonuçlanan reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin oluşumu (Yücel ve ark.,2006)

2.8. KAN DAMARLARI VE ENDOTEL HÜCRELERİ

Endotel bütün damar düz kaslarında bulunan, damar duvarını kaplayan mezoderm kaynaklı ince bir squamoz epitel tabakasıdır. Vazodilatör ve vazokonstriktör substratların yapımında etkili olarak, vasküler homeostazın sağlanmasında temel rol oynayan en küçük endokrin organdır (Torun ve Bayram,2004).

2.8.1. Endotel Hücrelerinin Yapısı

Çekirdekleri lümene doğru kabarık şekilde yassı, oval ve heterokromatindir. Bu hücrelerde küçük bir Golgi kompleksi, bir kaç mitokondriyon, serbest ribozomlar ve GER sarnıçları izlenir. Çekirdeğin yerleştiği kısım hücrenin en kalın kısmıdır. Perifere gidildikçe hücre incilir. Yaklaşık iki plazma zarı arası 0.2-0.4 µm kalınlığına iner.



10-15 μm genişliğinde, 20-25 μm uzunluğunda olan endotel hücreleri; uzamış nükleusları ile kan damarlarının iç yüzeyinin uzun eksenini boyunca sıralanarak tek katlı bir tabaka oluşturan poligonal hücrelerdir. Bu sayede damar endoteli; nontrombojenik bir iç yüzey oluşturduğu gibi, vücudun değişik dokuları ile alışveriş halinde bulunan kan arasında seçici bir geçirgenlik işlevini de üstlenir.

Yüzeyindeki glikoproteinler ile glikozaminoglikanların negatif yük kazandırdığı endotel hücreler birçok hücrel ve hormonal moleküllerle etkileşim içinde olduklarından çok sayıda reseptör taşımaktadırlar. Hasarlandığı zaman derindeki yapısal elemanlardan von Willebrand faktörü (vWf) ve kollagen zarar görmektedir.

Erişkin bir insanda endotel hücre kitlesi toplam, ortalama 1kg ağırlığında olup yaklaşık 1-7m² lik bir yüzey alanı oluşturmaktadır (Akçakoyun,2004).

2.8.2. ENDOTEL HÜCRESİNİN FONKSİYONLARI

Endotel hücresinin başlıca fonksiyonları şu şekilde özetlenebilir:

1. Dolaşım ve damar duvarı arasında selektif geçirgen bir bariyer oluştururlar.
2. Dolaşımda nontrombojenik bir yüzey vazifesi görürler.
3. Çeşitli vazoaaktif maddeler yaparlar.
4. Damar düz kas hücresi proliferasyon ve migrasyonunu düzenlerler.
5. Koagülasyon ve fibrinolitik olaylarda modülatör rol oynar.

6. İnflamatuar ve immünolojik olaylarda rol oynar.

7. Metabolik aktivitesi vardır. (lipid oksidasyonundaki rolü) (Torun ve Bayram,2004).

Neredeyse tüm dokuların kana ihtiyacı vardır ve kan ikmali de kan damarlarını döşeyen endotel hücrelerine bağlıdır. Endotel hücreleri bölgesel gereksinimlere göre, sayılarını ayarlama ve düzenleme konusunda dikkate değer bir kapasiteye sahiptir. Vücudun hemen her bölgesine hücre göçü ile erişerek, uyarlanabilir bir yaşam destek sistemi yaratırlar. Kan damarları ağını uzatıp şekillendiren endotel hücreleri olmasaydı, doku büyümesi ve onarımı imkansız olurdu (Alberts ve ark.,2008).

Endotel hücreleri, kalpten en küçük kılcallara kadar bütün damar sistemini kaplar ve maddelerin ve akyuvarların kana ve kandan dışarı geçişlerini kontrol eder. Bunun da ötesinde, bir embriyo incelendiğinde, atardamarlar ile toplardamarların sadece endotel hücreler ile bazal laminadan oluşan küçük damarlardan geliştiği görülür (Alberts ve ark.,2008).

Damar bir kez olgunlaştıktan sonra endotel hücrelerden çevredeki bağ dokuya ve düz kasa gelen sinyaller, damarın işlevlerinin ve yapısının düzenlenmesinde çok önemli rol oynamaya devam eder. Örneğin endotel hücreleri, yüzeylerinin üzerindeki kan akımından kaynaklanan sürtünme baskısını algılamalarını sağlayan mekanoalmaçlara sahiptir; bu bilgiyi çevredeki hücrelere ileterek, kan damarlarının çap ve duvar kalınlıklarını, kan akımına göre uyarlamalarına olanak sağlarlar. Endotel hücreleri ayrıca, kan damarı genişlemesini ön gören sinyallere hızla yanıt verilmesine damar duvarındaki düz kasları gevşetmek üzere NO gazı salıvererek aracı olurlar (Alberts ve ark.,2008).

Erişkin vücudundaki damar sisteminin tamamında, endotel hücreler bölünme ve hareket kapasitesine sahiptir. Örneğin aort duvarının bir parçası zarar görür ve endotel hücreler soyulursa, komşu endotel hücreler çoğalır ve soyulmuş yüzeyi örtmek üzere oraya göç eder.

Kültürdeki deneyler, uygun büyüme etmenlerini içeren ortamlarda bulunan endotel hücrelerinin, diğer bütün hücre tiplerinden yalıtılmış olsalar dahi, kılcal tüpleri kendiliklerinden oluşturacaklarını göstermektedir. Gelişen kapiller tüplerin kan ya da içlerinde geçen herhangi başka bir şey içermemeleri, yeni kapiller ağın oluşumunun başlaması için kan akımı ve basıncının gerekli olmadığını gösterir.

In vitro kılcal damar oluşumu: Kültürdeki endotel hücreleri kendiliğinden, hücreden hücreye bağıntı kurduğu izlenimi veren iç kofullar geliştirir ve bunlar bir kılcal tüp ağı meydana getirir. Bu fotoğraflar, bu işlem sırasında birbirini izleyen aşamaları göstermektedir. A'daki ok başlangıçta tek bir endotel hücresinde oluşan bir kofulu işaret etmektedir. Kültürler, kılcal damarın kısa bölütlerinden alınan iki veya dört endotel hücrelik küçük yamalardan hazırlanır. Bu hücreler kollojen kaplı kültür kaplarının yüzeyine oturarak, hücreler çoğaldıkça yavaş yavaş genişleyen, küçük yassı koloni oluşturur. Koloni kabın yüzeyine yayılır ve sonunda, yaklaşık 20 gün sonra, merkez bölgelerde kılcal tüpler oluşmaya başlar. Tüp oluşumu bir kez başladığında, kısa bir süre içinde dallar belirir ve 5 ila 10 gün sonra B'de görüldüğü gibi kapsamlı bir tüp ağı oluşturur. Bu işlem esas olarak hücrenin çevresindeki hücre dışı matriksin doğasına bağlıdır: Kılcal damar tüplerinin oluşumu, endotel hücrelerinin salgılayabildikleri, laminin gibi bazal lamina bileşenleri tarafından desteklenir (Alberts ve ark.,2008).

Endotelyal yapı ve fonksiyonuyla ilgili bilgilere ultrastrüktürel çalışmalar, endotelyal izolasyon ve kültür invitro deneyleri, hayvanlarda fizyolojik çalışmalar ve son zamanlarda insanlar üzerinde yapılan klinik çalışmalar da dahil çeşitli tekniklerle ulaşılmıştır. Bu bilgiler prostasiklin ve NO veya onların antagonistleri gibi endotelyal ürünlerinin temelinde kesin tedavi stratejilerinin gelişmesini kolaylaştırmıştır (Akçakoyun,2004).

Son yapılan çalışmalarda başta ateroskleroz olmak üzere bir çok hastalıkta endotelin rolü ortaya çıktııkça 'endotel ateroskleroza karşı birinci derecede (en önemli) savunma sistemidir' denmektedir. Normal endotel kan akımına karşı hem tromborezisrans bir yüzey görevi görürken hem de kan ve damar duvarı arasında makromoleküler bir bariyer vazifesi yapar. Endotel hücreleri morfolojik yapıları ve stratejik anatomik pozisyonları dolayısı ile vasküler düz kas hücreleri ile kan dolaşımının komponentleri arasında (platelet, monosit, enzimler, hormonlar v.b) selektif permeable bir bariyer oluşturur. Bunun için endotel hücreleri luminal yüzeyde dolaşım için nonadheziv bir yapıda bulunmalıdır. Bu görevi yanında endotel hücreleri, damar tonusunun düzenlenmesi, koagülasyon, hücre büyümesi ve ölümü, lökosit migrasyonu gibi çeşitli olaylarda rol oynar (Torun ve Bayram,2004).

Özetle şöyle diyebiliriz ki;

Endotelyum, vasküler tonusu, hücre çoğalmasını, trombositlerin ve lökositlerin damar duvarı ile etkileşimini düzenleyen, tromboregülatör molekülleri ve büyüme faktörlerini

sentezleyebilen, fiziksel ve kimyasal uyarılara yanıt verebilen vasküler düz kas ile damar lümeni arasında uzanan bazal membran üzerinde yerleşmiş tek sıralı yassı epitel hücrelerden oluşan bir dokudur (Akçakoyun,2004).

Endotelyal doku prostasiklin, NO (endotel kaynaklı gevşetici faktör: EDRF), endotelinler, endotel hücre büyüme faktörleri, interlökinler, plazminojen inhibitörleri ve von Willebrand faktör gibi maddeler salgılar. Bu genel fonksiyonlara ilaveten endotelyal doku, akciğerlerde gaz değiş tokuşu, kalpte miyokardiyal fonksiyonun kontrolü, karaciğer ve dalakta fagositozis gibi vücudun farklı bölümleri için farklılaşmış organ spesifik rollere de sahiptir (Akçakoyun,2004).

VAZOMOTOR TONUSUN KONTROLÜ

Endotelyum dolaşımla çevre dokular arasında yalnızca yapısal bir bariyer olma özelliği göstermez aynı zamanda fizyolojik durumlarda vasküler hemodinamiyi etkileyen mediyatörler de salgılar. Endotelyal hücreler NO ve prostasiklin (PGI₂) gibi vazodilatörler yanı sıra endotelin (ET) ve platelet aktive edici faktör (PAF) gibi vazokonstriktörler salgılayarak kan basıncı ve kan akımı kontrolüne katkıda bulunurlar (Akçakoyun,2004).

1980'den önce damarın gevşeme ve kasılmasından asıl sorumlu mekanizmanın nörohumoral faktörlerin damar düz kasları üzerinde yaptığı etkiler ile olduğu düşünülüyordu. Vasküler tonusun kontrolünde endotelin merkezi rol aldığı NO ve prostasiklin gibi güçlü vazodilatörlerin keşfinden beri bilinmektedir. Endotelyal hücreler kendi ürettiği mediyatörlerin yanı sıra dolaşımda bulunan trombin, bradikinin, ADP ve ATP gibi vazodilatör ve vazokonstriktörlerce de fonksiyonları kontrol edilir (Akçakoyun,2004).

2.8.3. ENDOTELDEN SALINAN MEDİYATÖRLER

Vazodilatör mediyatörler

Adenozin

Nitrik Oksit =Endotel Kaynaklı Relaksan Faktör (EKRF)

Prostasiklin (PGI₂)

Endotel Kaynaklı Hiperpolarizan Faktör (EKHF)

Vazokonstriktör mediyatörler

Endotelin-1 (ET-1)

Anjiyotensin II

Endotel Kökenli Konstrüktör Faktör (EKKF)

Platelet Aktive Edici Faktör (PAF)

Adenozin: İskemide endotel ve mezangial hücre hasarı sırasında yüksek enerjili fosfatların yıkımı ile ortaya çıkar ve kuvvetli bir vazokonstriktördür. Reaktif oksijen metabolitlerini bloke eder (cankurtaran ve Kıyıkım,2002). Adenozinin düz kaslardaki P1 reseptörlere bağlanması cAMP üretimiyle sonuçlanır ve vazodilatasyon oluşur. Adenozinin hem endotel hücresinde hemde düz kas hücresinde P2 reseptörü vardır. Endoteldeki P2 reseptörün uyarılması EDRF/prostosiklin üretimi ve vazodilatasyon, düz kastaki P2 reseptörün uyarılması ise vazokonstriksiyon ile sonuçlanır (Akçakoyun,2004).

Nitrik Oksit: Nitrik Oksit düz kas, endotel hücresi, ve diğer birçok memeli hücresinden L-arjinin amino asidinin guanido nitrojeninin nitrik oksit sentaz enzimi aracılığı ile oksitlenmesi sonucu sentez edilir. Nitrik oksit lipofilik bir maddedir. Bu nedenle vasküler endotelden düz kas hücrelerine kolaylıkla difüze olarak guanilat siklaz enziminin hem grubuna bağlanır. Bu enzimi aktif hale getirip düz kas hücrelerinde siklik guanozin monofosfat (cGMP) düzeyini yükseltir. cGMP miktarının artması vasküler düz kas hücrelerinde gevşemeye ve trombosit adezyon ve agregasyonunun inhibisyonuna neden olur (Atalık ve Doğan,1997).

Endotel Kaynaklı Hiperpolarizan Faktör (EKHF): EKHF'ün hangi molekül veya moleküllerden oluştuğu açıklık kazanmamıştır. Olası EKHF adaylarının farklı damar yatakları üzerinde farklı etkiler göstermesi birden çok EKHF molekülü olabileceğini akla getirmiştir. Bu moleküllerden bir tanesi araşidonik asit metabolitlerinden olan Epoksieikosatrenoik asittir (EETs). Birçok laboratuar NO ve PGI2 dışında endotel kaynaklı vazodilatör aktör tanımlamıştır. Bu laboratuarlar asetilkoline karşı nitrik oksit sentaz ve siklooksijenaz inhibitörleri ile engellenemeyen vazodilatatör yanıt rapor etmişlerdir. Daha sonra benzer vazodilatör yanıt bradikinin ve substant P ve shear stres'e karşı elde edildi. Bu vazodilatör yanıtın potasyum kanallarının bloke edilmesi ile ortadan kalktığı gösterildi. Bu vazodilatasyon, düz kaslardaki K⁺ kanallarının açılması ile hücre dışına K⁺ çıkması sonucu hücrenin hiperpolarize olması ve bunun sonucunda da voltaj bağımlı Ca⁺⁺ kanallarının kapanması ile hücre içine Ca⁺⁺ akışının durmasından kaynaklanır. Bu nedenle söz konusu faktöre Endotel

kaynaklı hiperpolarizan faktör denildi (EKHF). EKHF insanda ilk kez mezenterik arterde gösterildi. Daha sonra, insan koronerinde bradikinin ile oluşan vazodilatör yanıtın sorumlu olan asıl faktörün EKHF olduğu saptandı. EKHF nin küçük damarlar (rezistan arterler) üzerine olan etkisi, büyük damarlardan oldukça fazladır. Bunun tersine NO in büyük damarlar üzerine etkisi belirgindir. Bu küçük damarlarda nitrik oksit sentaz aktivitesinin küçük damarlarda düşük olmasıyla uyumludur (Akçakoyun,2004).

Prostasiklin (PGI₂): Prostasiklin, arachidonic asid metabolizmasının bir ürünü olarak damar endotel ve düz kas hücreleri tarafından sentez edilirler. Prostasiklin platelet aktivasyonu, sekresyonu, ve agregasyonunu ayrıca monositlerin endotel ile etkileşimini inhibe eder. Aynı zamanda düz kas hücrelerinin gevşemesine neden olur (Özdoğu).

Endotelin-1 (ET-1) Endotelyum sadece dilatör etkili mediatörler salgılamaz aynı zamanda vazokonstriktör mediatörlerin de salınımından sorumludur. Bunlardan en iyi tanımlanmış olanı endotelinlerdir (ET). Endotelin-1 (ET-1), 21 aminoasitli peptid olup endotel hücrelerinden salınır ve bilinen en güçlü vazokonstriktör ajandır. ET-1 sentezi karmaşık olup preproendotelin denen öncü bir molekülden sentezlenir sonra büyük endoteline dönüşür ve nihayet endotelin dönüştürücü enzim vasıtasıyla aktif ET-1'e dönüşür. Vazodilatör uyarılara cevap olarak hızla salınıp saniyeler içinde inaktive olan NO'nun tersine ET-1 bağımlı konstrüksiyon yavaş başlangıçlıdır ve saatler hatta günlerce devam eder. ET-1 vasküler tonus regülasyonunda primer rolü tonik vazokonstriktör etkisine bağlıdır. Vazoaktif özelliklerine ilaveten düz kas hücre proliferasyonunu uyarır, vasküler remodelinge ve lökosit adhezyonuna katkıda bulunur. Böylece inflamasyon ve aterogenezde önemli rol oynar (Akçakoyun,2004).

Anjiyotensin II: Renin Anjiyotensin Sistemi (RAAS) vücutta birçok sistemi ilgilendiren kompleks bir endokrin sistemdir. RAAS temel olarak sıvı-elektrolit dengesini sağlayarak vücutta plazma hacminin ve kan basıncının regüle edilmesinde rol oynar. Dolaşıma verilen renin anjiotensinojenden anjiotensin I oluşmasını sağlar, bu basamak RAAS'ta hız kısıtlayıcı basamaktır. Anjiotensinojen bütün anjiotensinlerin ana kaynağıdır. Esasen karaciğerde sentezlenmekle birlikte az miktarda böbrek, damar endoteli, ve diğer organlarda da sentezlenebilmektedir. Anjiotensin (ANG) I orta etkili vazokonstriktör etki gösteren ve dolaşımda kalma süresi saniyelerle sınırlı olan bir molekül olduğu için dolaşım fonksiyonları üzerine tek başına anlamlı değişikliklere yol açmaz. Dolaşımda kısa süre kalan anjiotensin I

Anjiotensin Dönüştürücü Enzim (ADE) (Kininaz) ile anjiotensin II' ye dönüşür. ANG II 'de dolaşımında 1-2 dakika durduktan sonra anjiotensinazlarla yıkılarak inaktive edilir. RAAS'ın çoğu fizyolojik etkilerinden sorumlu olan ANG II' nin 2 majör sistemik etkisi bulunmaktadır. Bunlar; sodyum ve su retransiyonu ile vazokonstriksiyondur (Polat ve Yalçın,2008). Ayrıca ANG II damarsal NAD(P)H oksidazın kuvvetli bir aktivatörüdür ve ROT üretimini artırır. Son çalışmalar ANG II ile uyarılan reaktif oksijen türleri üretimi ile hücre büyümesi, hipertrofisi, göçü ve anjiyogenez gibi kardiyovasküler cevaplar arasında bir ilişki göstermiştir. Yakın zamanki klinik çalışmalarda ANG II ile uyarılan reaktif oksijen türleri ve kardiyovasküler hastalık arasında ilişki bulunmuştur (Hitomi ve ark.,2007).

Endotel Kökenli Konstrüktör Faktör (EKKF): Endotel kökenli konstrüktör faktör tromboksan A₂ (TXA₂) ve prostaglandin H₂ (PGH₂) gibi (21 aminoasitli endotelin peptidi ve renin anjiyotensin sisteminin bir üyesi) vazokonstrüktör prostanoidleri içerir. Köpek ve insan veninde araşidonik asit, asetilkolin, histamin ve serotonin endotel kaynaklı kasılmayı başlatır. İndometasin varlığında kasılma bloke olur ve endotel bağımlı gevşeme ortaya çıkar. TXA₂ gibi siklooksijenaz ve endoperoksitler (prostaglandin H₂: PGH₂) asetilkolin ve histaminle stimülasyondan sonra endotel bağımlı kasılmayı gerçekleştirir (Wight ve ark.,1997).

Platelet Aktive Edici Faktör (PAF): Birçok hücre tarafından üretilen PAF salınımı endotoksin tarafından uyarılır. Temelde vazokonstriktör bir maddedir. Kemotaksis, nötrofil aktivasyonu ve intravasküler koagülasyona katılır (Cankurtaran ve kıyıkım,2002).

Endotel hücrelerinden salgılanan diğer maddeleride şu şekilde sıralayabiliriz;

1- Vasokonstriktörler

- Angiotensin converting enzim (ACE)
- Endotelinler (ET-1, ET-2, ET-3)
- Angiotensin II
- Tromboksan A₂
- Asetil kolin, araşidonik asit, PGH₂, trombin, nikotin

2- Vasodilatatörler

- Nitrikoksit (NO=EDRF)
- Adrenomedüllin
- Endotelium derived hiperpolarizing faktörler

- Prostatiklin (PGI₂)
- Bradikinin, asetilkolin, serotonin, histamin, substance P

3- Antitrombotik (homeostaz) maddeler

- Trombomodulin
- Doku plazminojen aktivator (t-PA)
- Plazminojen aktivator inhibitör tip I (PAI-1)

4- Büyüme modulator / mediatörleri

a) Büyüme promotörleri b) Büyüme inhibitörleri

- PDGF • Heparin sülfat
- Basic FGF • TGF- β
- IGF-1 • NO
- IL-1 • Bradikinin
- Endotelin • Prostatiklin
- AII

5- İnflamatuvar mediatörler

Adezyon molekülleri;

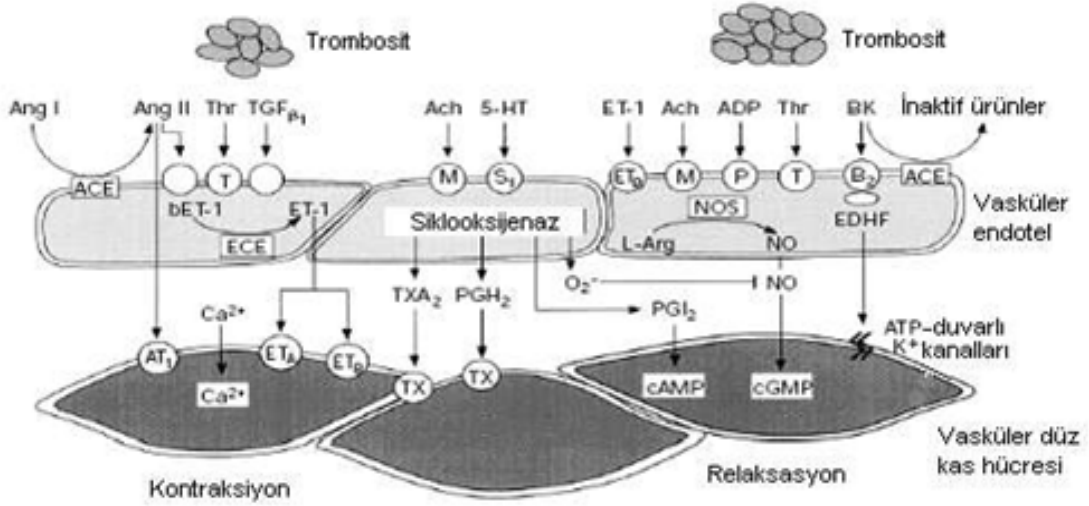
- Endotelyal Lökosit Adezyon Molekülü (ELAM)
- İntraselüler Adezyon Molekülü (ICAM)
- Vasküler Hücre Adezyon Molekülleri (VCAM)

Antijenler ;

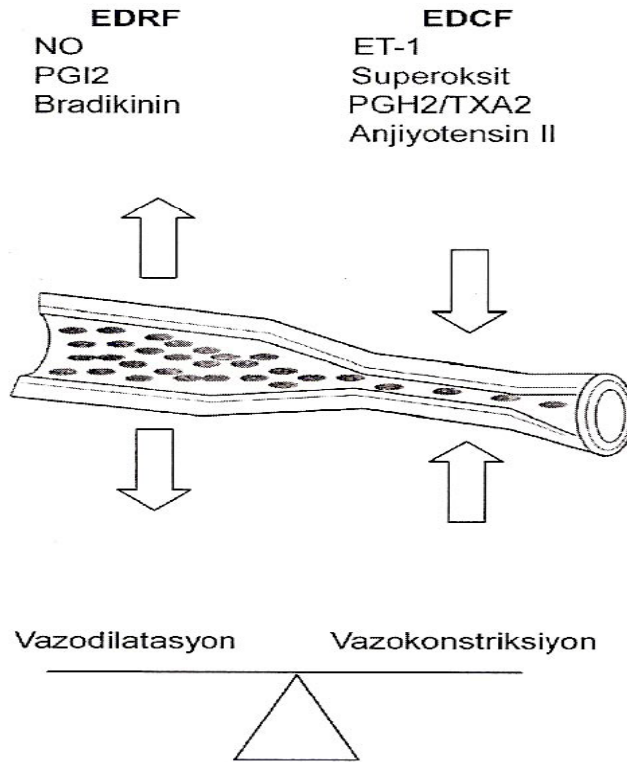
- Major histokompatibilite kompleks 2 (MHCII)

6- Redoksitite

(Torun ve Bayram,2004)



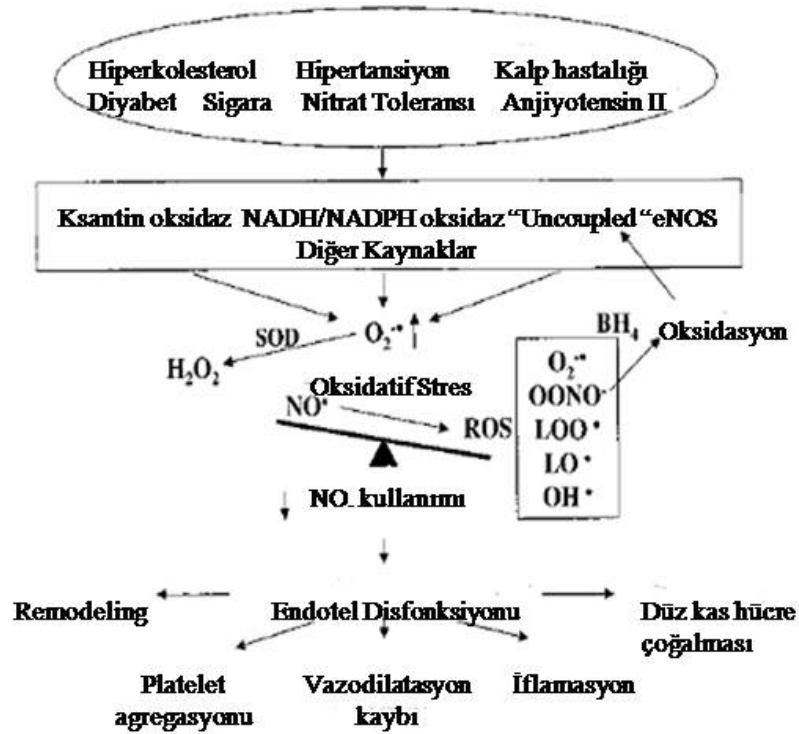
Şekil 17. Endotelyumdan salınan vazoaktif medyatörler (Tekkes,2006)



Endotel tabakasının normal işlev görmesi endotel kaynaklı gevşetici (EDRF) ve endotel kaynaklı konstriktör (EDCF) maddeler arasındaki dengeye bağlıdır (Kılıç,2006).

2.8.4. VASKÜLER DUVARDA OKSİDATİF STRES KAYNAKLARI:

Memeli hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin potansiyel enzimatik kaynakları, mitekondrial solunum, araşidonik asit metabolizması enzimleri lipooksijenaz ve siklooksijenaz, sitokrom p450, ksantin oksidaz, NADH/NADPH oksidaz, nitrik oksit sentaz, peroksidazlar ve diğer hemoproteinlerdir. Bu kaynakların sayısı çok olmasına rağmen hepside NO'ı inaktive eden reaktif oksijen türlerinin potansiyel üreticisidir. Kardiyovasküler sistemde bunlardan üç tanesi oldukça önemlidir. Bunlar ksantin oksidaz, NADH/NADPH oksidaz ve nitrik oksit sentazdır (Cai ve Harrison,2000).

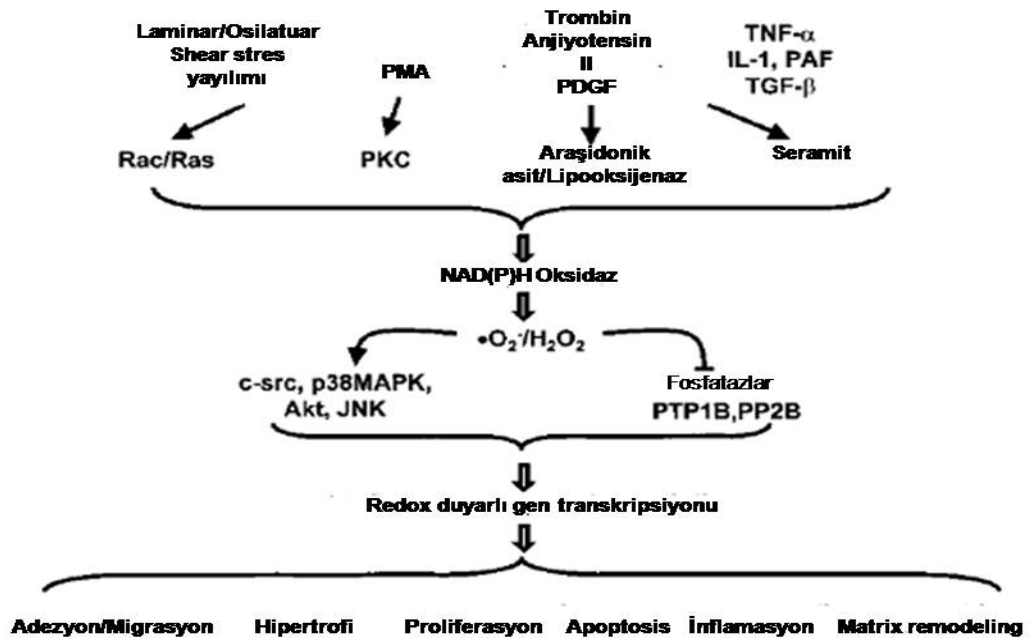
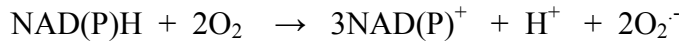


Şekil 18. Kardiyovasküler hastalıklarda endotel disfonksiyonuyla oluşan oksidatif stres mekanizması (Cai ve Harrison, 2000)

1. NAD(P)H OKSİDAZ: Kardiyovasküler sistemde NAD(P)H oksidaz elektron vericisi olarak NADPH veya NADH' kullanan oksijenin bir elektron indirgenmesini katalizleyen enzimdir. Bu enzimatik aktivite ksantin oksidaz, araşidonik asit ve mitekondrial

oksidazla kıyaslandığında reaktif oksijen türleri üretiminde kardiyak hücreler ve vasküler dokuda en etkili olanıdır (Griendling ve ark.,2000). NAD(P)H oksidaz vasküler hücrelerdeki serbest oksijen radikallerinin en önemli kaynağıdır. 5 alt ünitelerden meydana gelmiştir. P40^{PHOX} (PHOX=fagosit oksidaz) p47^{PHOX}, p67^{PHOX}, p22^{PHOX} ve Nox. Bu enzim duvar stresinde etkili ve aterosklerozla ilişkili olan anjiyotensin II, trombin, PDGF, TNF- α ve doğal kaynaklar gibi çeşitli patofizyolojik uyarımları düzenler. Vazodilatasyon bozukluk ve artan kan basıncının etkisiyle anjiyotensin II tip I reseptörünün aktivasyonu protein kinaz C'nin stimülasyonu sağlar. Bu durumda NADPH'dan reaktif oksijen türlerinin oluşmasını artırır (Vogiatzi ve ark.,2009). Bir kere uygun bir şekilde aktive oldukları zaman fagosit hücreleri konak savunması için gerekli olan süperoksit radikalini fazla miktarda ve oldukça kısa sürede üretirler.

Damarda süperoksit radikali üretimi hasarlı endotel bağımlı vazodilatasyon, okside LDL, monosit infiltrasyonu ile sonuçlanan adhezyon molekülleri ekspresyonunun artması, vasküler remodellinge yol açan matriks metalloproteinlerinin artmasını sağlayan peroksinitritin üretilmesine yol açan nitrik oksit inaktivasyonunu sağlar (Griendling ve ark.,2000).



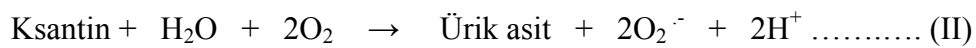
Şekil 19. Oksidaz aktivasyon modeli ve kardiyovasküler hücrelerde fonksiyonel sonuçları (Griendling ve ark.,2000)

2. ENDOTELYAL NİTRİK OKSİT SENTAZ: Nitrik oksit sentaz ve özel bir türü olan endotelial nitrik oksit sentaz patofizyolojik koşullar altında süperoksit radikalının kuvvetli kaynağıdır (Madamanchi ve ark.,2005). eNOS elektron vericisi NADPH'dan flavin bağımlı elektron transportunu prostetik hem grubuna katalizleyen sitokrom p-450 redüktaz benzeri bir enzimdir (Cai ve Harrison,2000). Normal koşullarda kofaktör olarak tetrahidrobiopterine (BH₄) bağlanır ve NO üretmek için substrat olarak L-arjinin kullanır. Bu enzimin ayrı olması oksijenin indirgenmesi ve reaktif oksijen türlerinin oluşmasına olanak sağlar. Neticede peroksinitrit oluşur ve bu yüzden lipid ve proteinler oksidasyona uğrar (Vogiatzi ve ark.,2009).

Endoteliumdan eNOS'un uncoupling olması endotelial disfonksiyona ve oksidatif strese neden olur. Bu 3 şekilde gerçekleşir. Birinci, enzimatik olarak eNOS tarafından üretilen nitrik oksit indirgenir ve radikal oluşur ki bu da normal olarak hücrel hedeflere saldırır. İkinci, enzim süperoksit radikalının üretimini başlatır. Üçüncü, eNOS uncoupled olur ve hem süperoksit radikali hem de nitrik oksit eş zamanlı olarak üretilir (Cai ve Harrison,2000).

3. KSANTİN OKSİDAZ: Ksantin oksidaz plazma ve endotel hücrelerinde bulunup düz kas hücrelerinde bulunmaz. (Ksantin dehidrogenaz bulunur ama süperoksit radikali sadece ksantin ksantin oksidazla ürik aside dönüşümü aşamasında oluşur) (Vogiatzi ve ark., 2009).

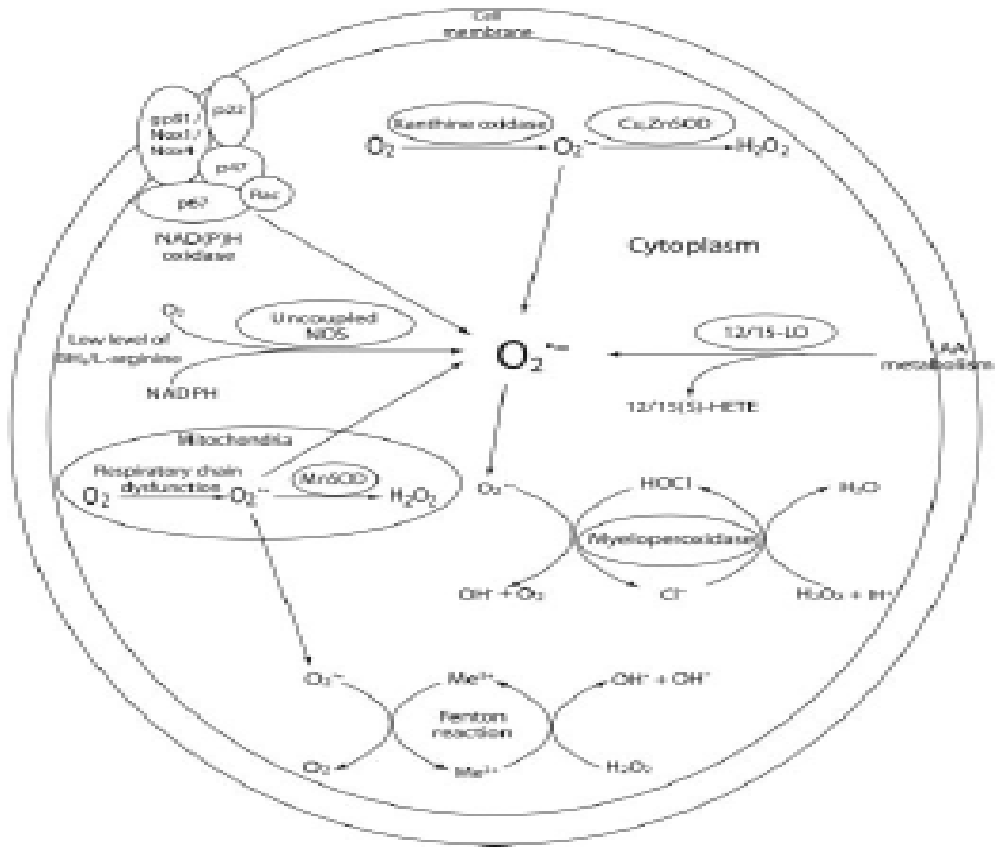
Ksantin oksidaz pürin metabolizması sırasında oksijen varlığında hipoksantin ve ksantin oksidasyonunu katalizleyen enzimdir (Cai ve Harrison,2000). Hipoksantini ksantine veya ksantini ürik aside oksitler. Bu reaksiyonda elektron alıcısı moleküler oksijendir.



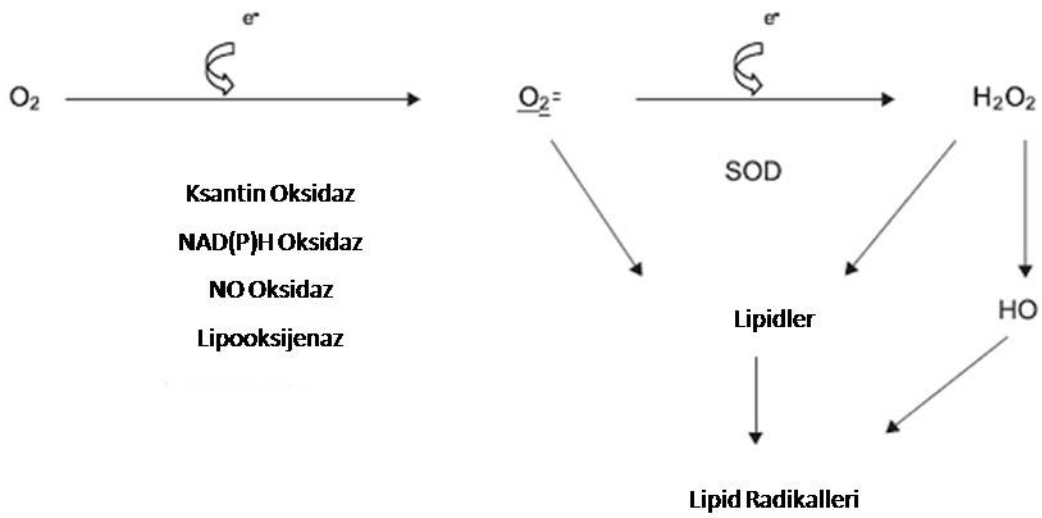
Ksantin oksidaz iskemik dokuların reperfüzyon hasarında rol alır (Akkuş,1995,Yanbeyi, 1999).

Hipoksantin- ksantin arasındaki bu tepkime sonucu oluşan süperoksitin yarattığı en büyük hasar vasküler sistemdedir (Yanbeyi,1999).





Şekil 20. Vasküler hücrelerde ROS kaynakları (Madamanchi ve ark.,2005)



Şekil 21. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu (Vogiatzi ve ark.,2009)

2.9. ENDOTEL DİSFONKSİYONU

Endotel disfonksiyonu geniş kapsamlı bir terimdir ve nitrik oksit üretiminde bozulma ve / veya endotel-kaynaklı, endotelin-1 (ET-1), angiotensin ve oksidanlar gibi gevşeme ve kasılma faktörlerinde dengesizliği ifade eder. Geniş açıdan bakıldığında endotel disfonksiyonu, endotel aktivasyonu ile birlikte birçok proinflamatuvar ve prokoagulan değişiklikleri kapsar. Endotel disfonksiyonu ateroskleroziste belirgindir, aynı zamanda diyabet, preeklampsi, hipertansiyon, üremi ve diğer hastalıklarda da tanımlanmıştır (Özdoğu). Birkaç insan çalışması ateroskleroz için tanımlanan risk faktörlerinin endotel disfonksiyon içinde geçerli olduğunu göstermiştir (Cai ve Harrison,2000).

Nitrik oksit amino asit argininin nitrik oksit sentaz enzimi ile NO ve L-citruline dönüştürülmesi ile elde edilir. Endotel-kaynaklı gevşetici faktörlerden en önemlisidir ve vasküler tonusun ve vasodilatasyonun ayarlanmasında en önemli rolü oynar. Oluşan aterosklerozis ile koroner arterlerde endotel-bağımlı vasodilatasyonun bozulmasına ve paradoksal vasokonstriksiyona, myokardial perfüzyonun azalmasına ve myokardial iskemiye neden olur (Özdoğu). Nitrik oksitin hızlı inaktive olması önemli bir rol teşkil eder (Meinertz). Vasomotor disfonksiyon olarak ifade edilen endotelial disfonksiyon, aterosklerosisin yapısal değişikliklerinden oldukça önce oluşur ve gelecekteki kardiovasküler olayları öngörmeye yardım eden bağımsız bir faktördür (Özdoğu).

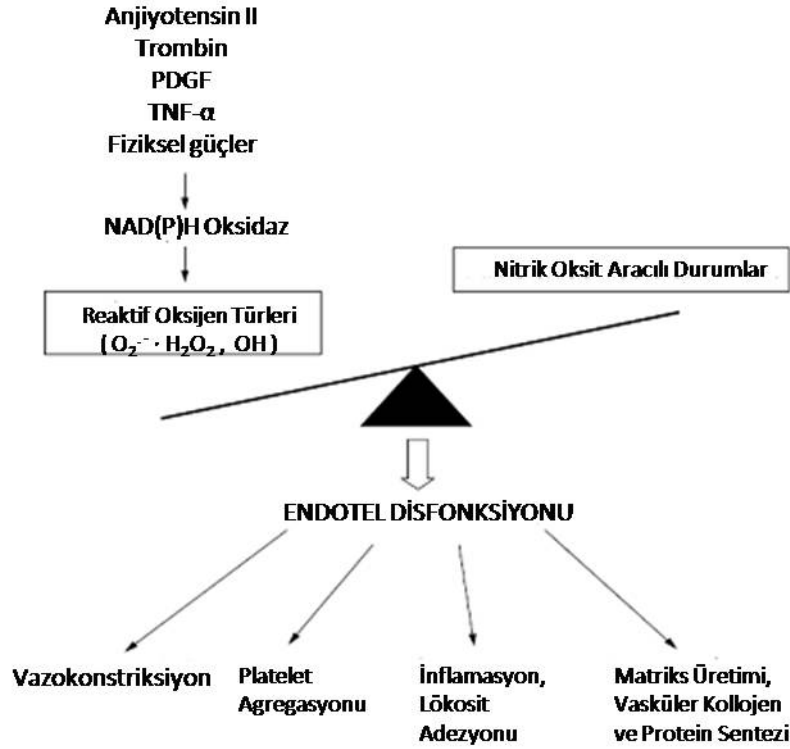
Nitrik oksit vasodilatatör etkinin yanı sıra, vasküler zararlanma, inflamasyon ve trombosise karşı koruyucudur. Nitrik oksit lökositlerin endotele adesyonunu inhibe eder, vasküler düz kas hücrelerini nonproliferatif konumda kalmasını sağlar ve platelet agregasyonunu sınırlar. Hipertansiyon, diyabet ve hiperkolesterolemi gibi geleneksel kardiovasküler risk faktörleri endotelin koruyucu fonksiyonunun bozulmasına neden olur. Hiperkolesterolemi normal koşullarda lökositlerin sıkı adesyonuna dirençli olan endotel tabakasına kandaki lökositlerin başlamasına neden olur. oxLDL endotel aktivasyonuna ve NO'nun hücre içi konsantrasyonunu azaltarak biyolojik karakterinin değişmesine neden olur. Hipertansiyon ile ilişkili angiotensin II, vasokonstrüktördür ve NO'un karşıtı olarak etkir. Angiotensin II reaktif oksijen köklerinin reaktif oksijen türleri üretimine, proinflamatuvar sitokinler interlökin (IL)-6 ve monosit kemeotaktan protein-1 (MCP-1) ekspresyonlarının artmasına ve endotel hücrelerinde vasküler cell adesyon molekül -1 (VCAM-1) in ifadesinin artmasına neden olur. Yeni risk faktörlerinden C-reaktif protein (CRP) seviyesinin artması; NO üretimini baskılayarak ve biyoaktivitesini azaltarak endotelial disfonksiyona neden

olabilir. Bu endotelial değişiklikler damar duvarında inflamasyona yol açarak aterosklerotik lezyonların başlama ve ilerlemesinde bir ilk basamak oluşturur (Özdoğu). Nitrik oksit kullanımındaki azalma endotel l nitrik oksit sentazın expresyonunda azalmaya neden olur. eNOS kofaktörü eksikliğinde de hücrel sinyallerde değişim meydana gelir öyle ki eNOS uygun bir şekilde aktive edilemez (Cai ve Harrison,2000).

Kardiyovasküler risk faktörleri ve aterosklerotik hastalık arasındaki ilişki iyi bir şekilde gösterilmiş olmasına rağmen, bu faktörlerin lezyon oluşumunu artırması ve aterosklerotik olaylara yol amasına yönelik mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Ciddi kardiyovasküler risk faktörlerinin varlığına rağmen bazı kişilerde aterosklerotik sonuçların gelişmemesine yönelik gözlemler, bir eşik noktaya ulaşılıp aktive edildiğinde risk faktörünün istenmeyen vasküler etkilere yol açtığını göstermektedir. Kan ve vasküler duvar arasında mekanik ve biyolojik bariyer olarak tanımlanan endotelial hücre tabakasının stratejik yeri ve biyolojik özellikleri, risk faktörü ve onun zararlı vasküler etkileri arasında bir ‘kayıp bağlantı’ olarak hizmet yapabilir (Bonetti ve ark.,2003).

Geleneksel ve geleneksel olmayan risk faktörlerini içeren, ateroskleroz ve kardiyovasküler morbidite ve mortalite ile ilişkili olan risk faktörlerin çoğu aynı zamanda endotelial disfonksiyonla da ilişkilidir. Hiperlipidemi, hipertansiyon, diyabet ve sigara içiciliğini içeren çok sayıda risk faktörü reaktif oksijen ürünlerinin aşırı üretimi ve artmış oksidatif stress ile birliktelik gösterir (Meinertz). Nitrik oksit ile reaksiyonu sonrası reaktif oksijen ürünleri vasküler NO’nun biyo-kullanılabilirliğini azaltabilir ve hücre hasarını artırabilir (Bonetti ve ark.,2003). Nitrik oksit henüz tanımlanmadan EDRF süperoksit radikali tarafından inaktive edilebilir veya SOD tarafından stabilize edilebilirdi. şimdilerde EDRF’nin NO olduğu biliniyor ve bu kimyasal reaksiyonlar daha rahat bir şekilde anlaşılıyor. Nitrik oksit ve süperoksit radikali arasındaki reaksiyon süperoksit radikali ve SOD arasında oluşan reaksiyondan tam 3 kat daha hızlı bir şekilde gerçekleşir. Bu hızlı reaksiyon süperoksit radikali ile NO’nin hücre içi ve hücre dışında daima reaksiyona girdiğini bize göstermiştir. Fizyolojik koşullar altında endojen antioksidan savunma bu etkileşimi aza indirgemiş ve süperoksit ve NO arasında denge oluşturmuştur (Cai ve Harrison,2000). Bundan dolayı, artmış oksidatif stress, endotelial patogenezinde majör bir mekanizma olarak düşünölmekte olup, risk faktörlerinin endoteliuma olan etkilerinin en yaygın patogenetik mekanizması olarak kabul edilmektedir (Bonetti ve ark.,2003).

Başlıca bulgu olarak şunu söyleyebiliriz ki; Endotel disfonksiyonu ve oksidatif stres koroner kalp hastalıklarındaki kardiyovasküler olaylarda risk belirteçleridir. Oksidatif stres ve endotel disfonksiyonunu uzamı periferel damarlarca tahmin edilebilir (Meinertz).



Şekil 22. Vasküler sistemde oksidatif stres ve nitrik oksit hareketi arasındaki denge (Calver ve ark.,1993)

Endotel disfonksiyonuna hiperlipidemi, hipertansiyon, diyabetes mellitus, menapoz, sigara, ileri yaş, insulün direnci gibi sebep ve rahatsızlıklar neden olmaktadır (Kılıç,2006).

2.10. ENDOTELYAL DİSFONKSİYONUNUN YOL AÇTIĞI HASTALIKLAR

Vasküler homeostazın temel düzenleyicisi olan endotel vazodilatasyon ve vazokonstriksiyon arasındaki denge, düz kas hücre göçü ve proliferasyonu, trombogenesis ve fibrinolizisi sağlar. Bu denge bozulduğu zaman endotel disfonksiyonu meydana gelir ve arter duvarında hasara yol açar (Davignon ve Ganz, 2004).

Vasküler biyologlar arasındaki konsensus aterosklerozun başlangıç lezyonunun endotel fonksiyon bozukluğu olduğu yönündedir. Ayrıca koroner arter hastalığının

manifestasyonlarında da önemli rol oynar. İlk olarak 1986 da ilerlemiş ateroskleroza olan hastaların koroner arterlerinde endotel disfonksiyonunun varlığı gösterilmiştir. Sağlıklı endotelde endotele bağımlı NO salınımı sayesinde asetilkoline yanıt vasodilatasyondur. Endotel fonksiyon bozukluğunda karşılıksız kalan muskarinik düz kas aktivasyonu vazokonstriksiyona yol açar. Ateroskleroz ayrıca asetilkolinle indüklenen koroner kan akım artışını da bozar. Ateroskleroz varlığında oluşan bu disfonksiyonunun bir nedeni de bozulmuş nitrik oksit sentaz aktivitesi olarak öne sürülmüştür. Daha sonra hiperkolesterolemi ve sigara içiciliği gibi ateroskleroz için risk faktörlerine sahip semptomsuz gençlerde ve çocuklarda da endotel disfonksiyonu gösterilmiştir. Anormal endotel fizyolojisi hem aterosklerozun erken dönemi ve oluşumunda, hem de geç dönemde dinamik plak kontrolünde rol oynamaktadır.

Genel olarak endotel disfonksiyonu üzerine yapılan çalışmalar ateroskleroza konu edinse de, endotel disfonksiyonunu sadece aterosklerozun bir erken belirtisi olarak düşünmek doğru olmaz. Sağlıklı endotel kardiyovasküler kontrolde merkezi bir roldedir. Bu yüzden aterosklerozun yanında sistemik ve pulmoner hipertansiyon, kardiyomyopatiler, vaskülitler gibi birçok hastalığın patogeneğinde de rol oynar (Kılıç,2006).

Endotel disfonksiyonu ile ilişkili bazı fizyolojik ve patofizyolojik olaylar:

Ateroskleroz

Hipertansiyon

Hiperkolestorelemi

Diabetes Mellitus

İnsülin Rezistansı

Preeklamsi

Angina Pektoris

Kalp Yetmezliği

Böbrek Yetmezliği

İntravasküler Koagülasyon

Periferik Arter Hastalığı

Obezite

İskemi-Reperfüzyon Hasarı

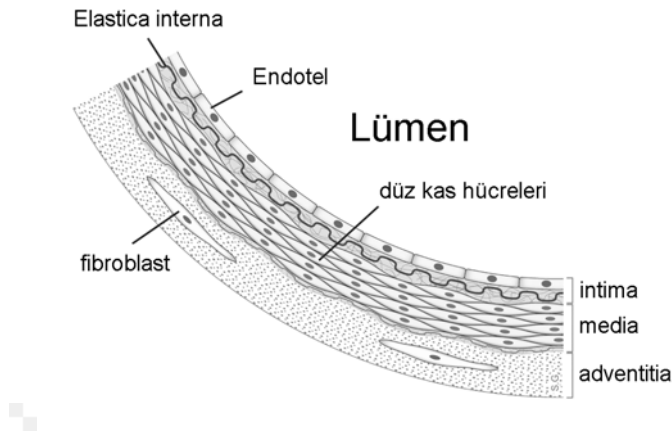
Sepsis

Yaşlanma

İnflamasyon

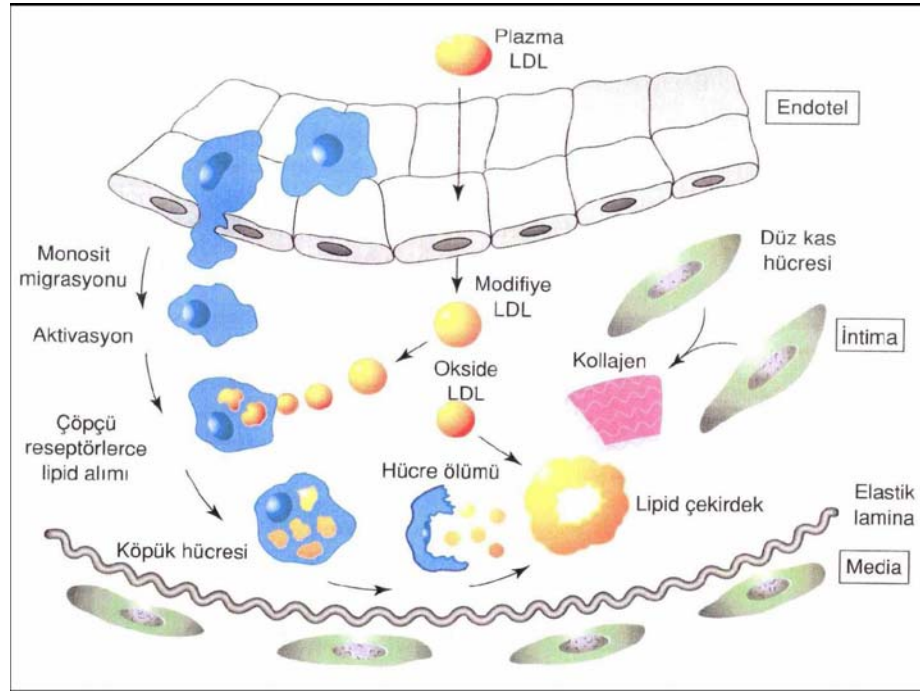
Ateroskleroz:

Lipidler, fibroblastlar, makrofajlar, düz kas hücreleri ve hücre dışı maddeleri değişik oranlarda içeren *intimal plaklara* bağlı olarak meydana gelen, ilerleyici (progresif) arteriyel darlık ve tıkanmalara, arterlerin esneklik ve antitrombotik özelliklerinin bozulmasına yol açan hastalığa **ateroskleroz** denir. Aterosklerozun en erken görülen patolojik değişikliği subintimal kalınlaşma olup, patogeneizde ilk temel basamağı endotel disfonksiyonu oluşturur. Ludmer ve ark. Asetilkolin kullanarak yaptıkları çalışmada insanlarda aterosklerozda endotel kaynaklı vazodilatasyonun hasar gördüğünü kanıtlamışlardır. Bu nedenle endotel disfonksiyonu, aterosklerozun klinik bulguları ortaya çıkmadan önceki ilk öncü patolojik bulgusudur (Davignon ve Ganz,2004). Ox-LDL, IL-1, bazı antikorlar ve birçok faktör endotel hasarına sebep olur. Hasara uğramış endotel, vazoaktif maddeleri ortama salarak inflamasyon, trombosit birikimi ve vazokonstrüksiyona sebep olarak ateroskerozu başlatır

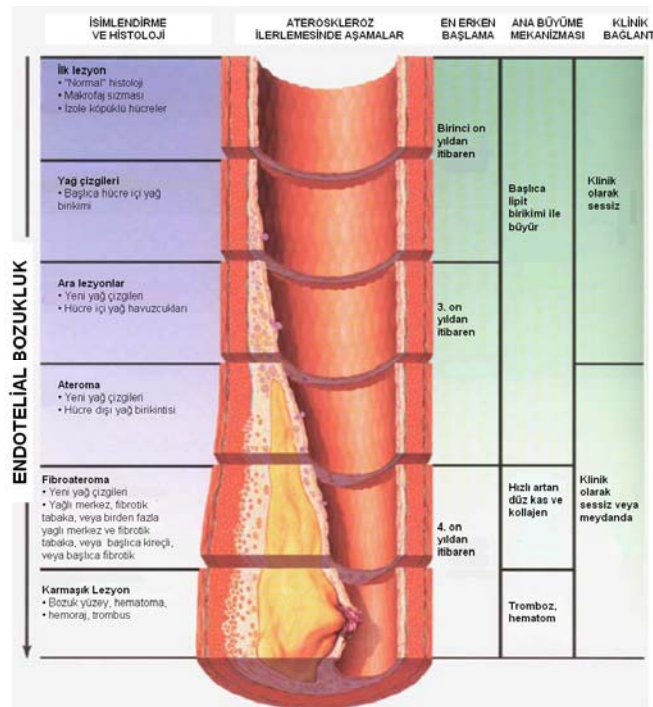


Aterosklerozun mikroskop altında görülebilen ilk aşaması "yağ çizgileri" oluşumudur. Bunlar endotelin altında bulunan, içi lipit dolu hücre topluluklarıdır; yağ çizgileri gelip geçici olabilir. Arter damarlarında hücrelerin (özellikle monosit türevi makrofaj gibi lökositler) ve değişime uğramış lipoprotein birikmesine paralel olarak arter yapısı değişime uğrar. Bunu izleyen yangı (enflamasyon), arterin *intima* tabakasında aterom plaklarının oluşumuna yol açar. İntima, damarda endotel ile media ve adventitia arasındaki kısımdır. Bu plaklar aşırı yağ,

hücreler, kollajen ve elastinden oluşur. Lümen diye adlandırılan arter boşluğunda başlangıçta herhangi bir daralma (stenoz) oluşturmazlar.



Şekil 23. Temel Ateroskleroz Süreci: Plazmadaki LDL intimaya girer, modifiye olur ve endotelde monosit migrasyonu ile sonuçlanan değişiklikleri başlatır. İntimada daha da fazla okside olan LDL, makrofajlar tarafından aktif biçimde alındığında köpük hücreleri oluşur. Makrofaj ölümüyle, lipidler serbest kalarak çekirdeği oluşturur. Endotel hücreleri ve makrofajlar tarafından salınan büyüme faktörleri, düz kas hücresinde büyümeyi ve bağ dokusu matriksinde sentezi uyarırlar (Koca,2007). 19





Şekil 24. Ateroskleroz gelişiminde oksidatif stresin rolü

Hipertansiyon:

Hipertansiyonda gözlenen vasküler tonus artışının temelde endotel tarafından salgılanan vazodilatatör ve vazokonstriktör mediyatörler arasındaki dengesizlikten kaynaklandığı öne sürülmüştür. Hipertansiyon endotel ilişkisinde üzerinde en çok yoğunlaşılacak endotel kökenli NO, asetilkolin, bradikinin ve mekanik streslere ikincil damar endotelinden salınır. Nitrik oksit vasküler tonusu ve kan basıncını düzenlemenin yanı sıra, uyarılmış düz kasın gevşemesini sağlamakta, trombositlerin endotele adezyonu ve agregasyonunu inhibe etmekte ve düz kasın proliferasyonunu baskılamaktadır. Kan ile damar duvarı arasındaki yerleşimi nedeniyle endotel, kan akımı ile ilişkili hemodinamik güçlere (shear stress) direk olarak maruz kalmakta ve hemodinamik uyarılara karşı vazoaaktif mediyatörler salgılamaktadır. Kan akımında artış olması, sağlıklı bir endotel varlığında, NO veya prostasiklin salınımı eşliğinde vazodilatasyonu uyarır. Akıma bağlı vazodilatasyon önemli bir korunma mekanizması olup, damar duvarını kan akımı ile damar duvarı arasındaki sürtünmeden köken alan kuvvetlere karşı önemli bir bariyerdir. Endotelin akımı ve akım ile ilişkili hemodinamik güçleri algılayıp, bunları biyokimyasal sinyallere dönüştürerek

endotelial mediyatörleri salgılaması henüz tam anlamıyla çözülememiştir. İyon kanallarının aktivasyonu ve intrasellüler kalsiyum homeostazı endotelin mekanik uyarıya karşı verdiği akut yanıtta yer almaktadır. Hipertansiyonda hemodinamik uyarıya karşı endotel cevabının bozulduğu, hipertansif ratlarda akımla indüklenen endotel kökenli vazodilatasyonun azalması ile gösterilmiştir. Hipertansiyonda endotel disfonksiyonu sonucunda hemodinamik strese cevap olarak üretilen ve vazodilatasyona neden olan NO'nun salınımı azalırken anjiyotensin dönüştürücü enzim ve güçlü vazokonstriktör olan endotelin yapımı artmaktadır. Sonuç olarak disfonksiyone endotel, vaskül hasara ve vasküler rezistansta artışa neden olarak hipertansiyonun gelişmesinden sorumlu vasküler mekanizma patogeneğinde önemli rol oynar (Kırkpantur ve Altun,2006).

Kalp Yetmezliği:

Damar endoteli vasküler tonusun, hemostazın ve inflamasyonun düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar. Bozulmuş endotel fonksiyonu aterosklerotik sürecin ilk basamağında mevcuttur. Bunun dışında hipertansiyon, diyabet, hiperkolesterolemide olduğu gibi kalp yetmezliğinde de tanımlanmıştır. Konjestif kalp yetmezliği (KKY) yaygın bir sendrom olup genellikle 65 yaş üstü popülasyonu etkiler. Kalp yetmezliğinin etiyolojisinde pek çok neden mevcuttur. Kalp yetmezliği bir multisistem hastalık olup genellikle kontraktıl fonksiyon bağı olarak sıvı birikimi, nöro hormonal sistem aktivasyonu, periferik dolaşım kısıtlanması ve uç organ yetmezliği ile karakterizedir. Son bulgular kalp yetmezliğinin patogeneğinde ve ilerlemesinde immün mekanizmalar ve inflamatuvar sürecin önemli olduğunu göstermiştir.

Bugün için KKY de gerek büyük damarlarda gerekse rezistan damarlarda endotel disfonksiyonu olduğunu gösteren pek çok kanıt mevcuttur. Endotel disfonksiyonu dinlenimde veya çeşitli endotel bağımlı faktörlerin uygulanılmasından sonra, endotel kaynaklı vazodilatör ajanların (özellikle NO salınımı) yetersizliğinden dolayı bozulmuş vazodilatör kapasite olarak tanımlanabilir.

Endotel disfonksiyonu farmakolojik veya mekanik uyarılara karşı vazodilatör cevabın ölçülmesi ile değerlendirilir. Endotel disfonksiyonu koroner veya periferik arterlerden ölçülebilir. Büyük damarlarda damar çapı değişimi, rezistan damarlarda damar akımındaki değişiklik endotel fonksiyon göstergesi olarak değerlendirilebilir.

Drexler ve arkadaşlarının yaptırdığı çalışmaya göre endotel disfonksiyonunun kalp yetmezliğinin erken döneminde başladığını bunun organ perfüzyonunda azalmaya, egzersiz toleransında bozulmaya ve kalp yetmezliğinde ilerlemeye neden olduğunu göstermişlerdir.

Kalp yetmezliğinde endotel fonksiyon bozukluğu:

NO üretiminde azalma

NO yıkımında artma

Endotelin-I üretiminde artma

Apoptozisde artma B2 olarak tanımlanabilir.



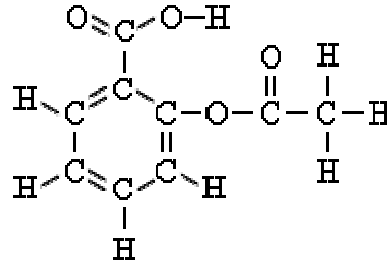
Endotel Disfonksiyonunun Tedavisi;

Teorik olarak endotel disfonksiyonunu çeşitli şekillerde düzeltilebilir:

- a) Endotel disfonksiyonunun nedeninin tedavisi ile,
- b) NO'yu arttırmakla,
- c) NO'nun inhibisyonunu bloke etmekle.

2.11. ASPIRİN

Aspirin adı ile bilinen asetil salisilik asidin (ASA) kökeni doğadır. Hipokrat (M.Ö 460–377), söğüt (Salix sp.) kabuklarından elde edilen bir özsuyn ağrı yatıştırıcı etkisinden söz eder (Söğüt,2008). Asetilsalisilik asit, kimyasal olarak saf ve stabil bir formda ilk olarak 1897’de Bayer laboratuvarlarında elde edildi ve 1899’da bu yeni ilaç Berlin’deki Imperial Patent Ofisi’ne “ Aspirin” ismi ile kayıt ettirildi. Preparatın bariz analjezik, antiinflamatuvar ve antipiretik özellikleri aspirinin tüm dünyada hızla yayılmasına yol açtı. Bu klasik ilacın muzafferhane ilerleyişi; bugüne kadar durmadan devam etmiştir. Aspirin hala en sık kullanılan analjeziktir (Nietsch,1991).



Şekil 25. Aspirinin kimyasal formülü

Son zamanlardaki çalışmaları aspirinin düşük dozlarda bile trombosit agregasyonunu etkin olarak inhibe ettiğini göstermiştir. Ağrı dindirmek, ateş azaltmak ve inflamasyonu inhibe etmek gibi klasik endikasyonlar grubu, böylece geçici iskemik atakların önlenmesi ve tedavisi ve bunların sonucunda unstabil angina pectoris ve reinfarktüsli hastalarda inmelerin ve miyokard infarktüsünün önlenmesi gibi alanlara doğru genişletilmektedir (Nietsch,1991).

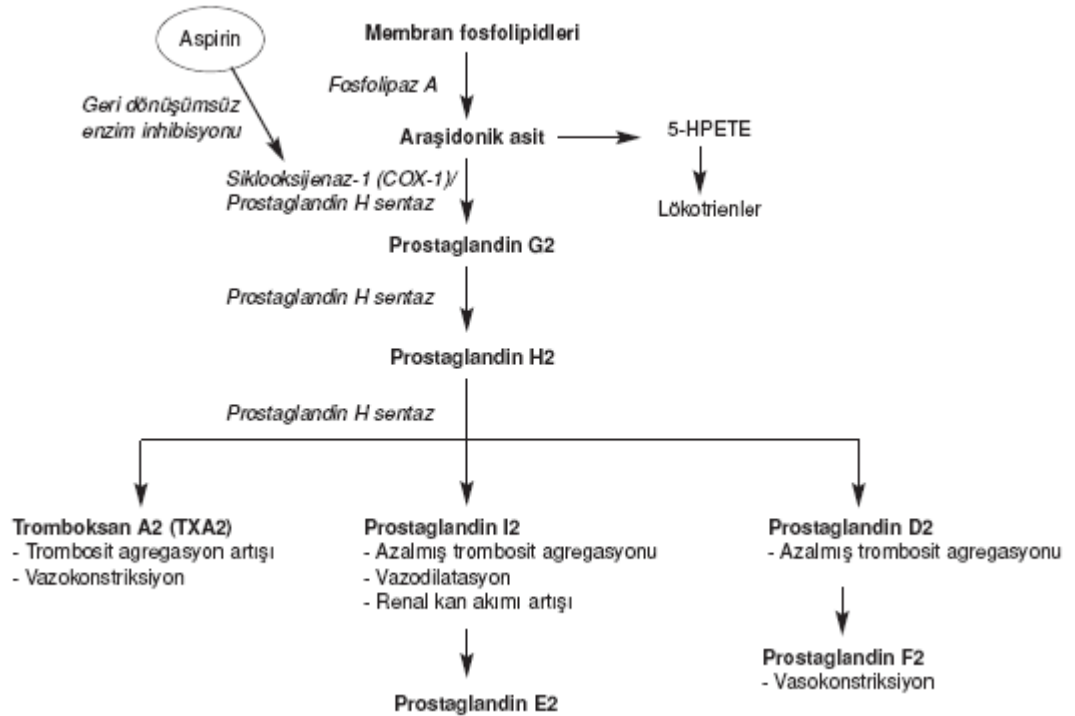
1970'lerin başlarında aspirin, etki mekanizmasının prostaglandin sentezi inhibisyonu olarak İngiliz farmakolog Prof. Dr. Jhon R. Vane tarafından tanımlanmasından sonra, bilimsel bir Rönesans yaşamıştır.

Aspirinin tarihsel gelişiminde bir diğer dönüm noktası Frankfurt Üniversitesi Anjiyoloji Merkezi'nde K. Breddin ve araştırma grubu tarafından yürütülen asetilsalisilik asitin trombosit agregasyonu inhibisyonu hakkındaki araştırmasıdır. Bu etki tromboembolizm riskini düşürme, geçici iskemik atakların önlenmesi ve tedavisi ve myokard infarktüsünün primer ve sekonder profilaksisindeki yeni terapötik uygulamalarına yol açmıştır (Nietsch,1991).

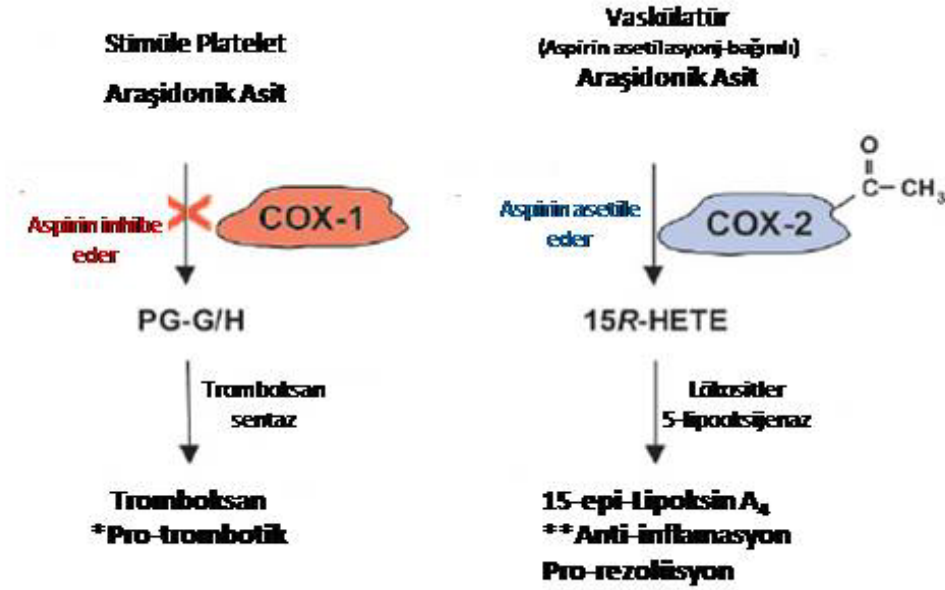
Siklooksijenaz enziminin, COX-1 ve COX-2 olarak bilinen iki izoformu vardır. COX-1 tüm hücrelerde yapısal eleman olarak bulunurken, COX-2 inflamatuvar yanıtla bağlı olarak ortaya çıkar (Aktürk ve ark.,2005). Aspirinin temel etki mekanizması, COX-1 ve COX-2 (prostaglandin- PG- H sentaz-1 ve 2 olarak da adlandırılır) enzim aktivitelerini geri dönüşümsüz olarak inhibe etmesidir. Bu inhibisyon COX-1 enziminin 529. noktasındaki serinin (ser529), COX-2'de ise 516 noktasındaki serinin (ser516) asetillenmesi ile olmaktadır. Asetillenen enzimin aktivitesi geri dönüşümsüz olarak baskılamaktadır (Demir,2007). Aspirin, yapısal izoform olan COX-1'e, COX-2'ye oranla 150-200 kat daha fazla bağlanır. Bu durum antitrombotik etki (COX-1 enzimiyle) ve anti-inflamatuvar etki (COX-2 enzimiyle) elde etmek için aspirinin neden farklı dozlarda kullanıldığını açıklar (Aktürk ve ark.,2005). Trombosit membranındaki fosfolipaz A2 enziminin aktivasyonu sonrası, araşidonik asit (AA)

salınımı artar. COX-1 ve COX-2 izoenzimleri AA'yi PG H₂'ye dönüştürürler. PGH₂ bir ara ürün olup, PG D₂, E₂ F₂α, I₂ ve Tx A₂'nin öncüsüdür. Sonuçta PG'lerin oluşumu ve bilinen en güçlü agregan ve vazokonstriktör ajan olan Tx A₂ oluşumu azalmaktadır. Aspirinin COX-1'i COX-2 göre daha fazla inhibe eder. COX-1 trombositlerde, COX-2 ise inflamatuvar yanıt gösterebilen hücrelerde daha fazla oranda bulunmaktadır. COX izoenzimlerin inhibisyonu aspirin dozu ile ilişkilidir. Düşük doz aspirin COX-1'i inhibe edebilirken, COX-2'nin inhibisyonu için ise, yüksek dozlar gerekmektedir. Aspirinin antiagregan ve antiinflamatuvar dozunun farklı olması bundan kaynaklanmaktadır. Sağlıklı bireylerde 100 mg tek doz aspirin, TxA₂ oluşumunu %80 oranında azaltır. Tek doz aspirinden 5-6 gün sonra trombositlerin %50'sinden fazlasında inhibisyon ortadan kalkmaktadır. Çünkü trombositlerin her gün %10'u yenilenmektedir (Demir,2007).

Aspirin, prostaglandin üretimini engellemenin yanı sıra vitamin-K antagonizması, trombin üretimini azaltması ve pıhtılaşma faktörlerini asetillemesiyle kardiyovasküler hastalıkları önlemektedir. Ayrıca, LDL kolesterolün oksidasyonunu önleyerek antioksidan etki gösterir, aterosklerotik plakta inflamasyonu azaltır ve endotel bütünlüğüne katkıda bulunur (Aktürk ve ark.,2005).



Şekil 26. Araşidonik asit metabolizmasının aspirin tarafından inhibisyonu (Aktürk ve ark.,2005)



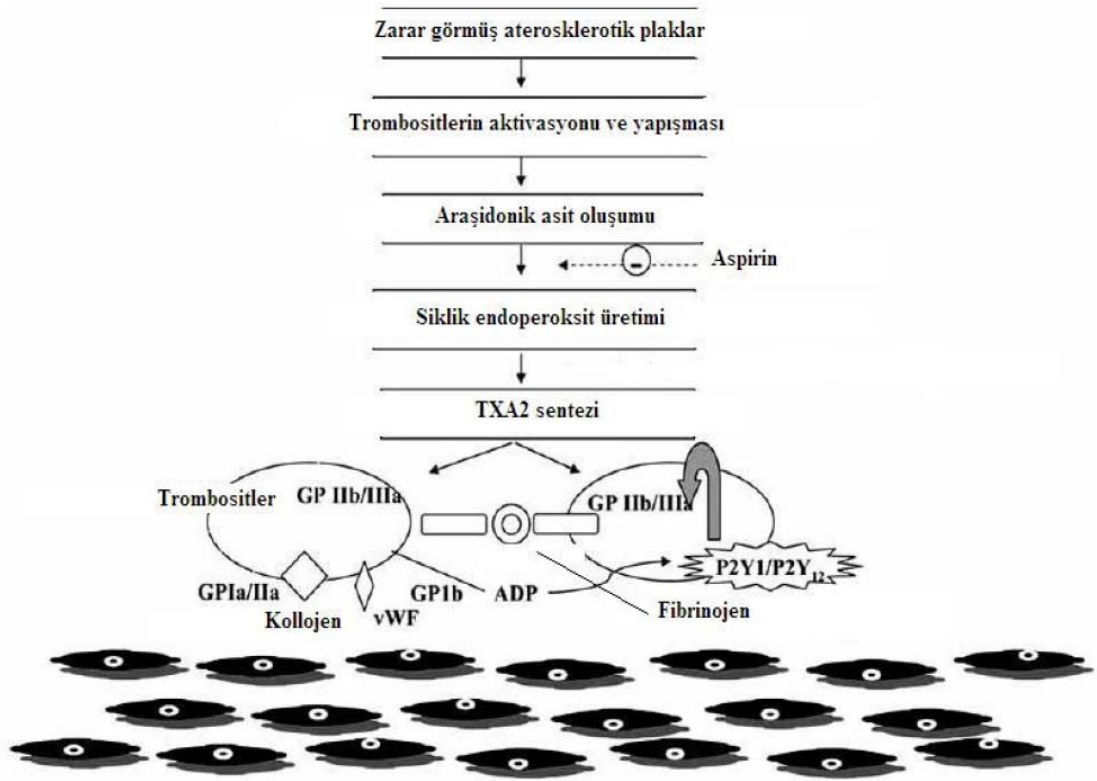
Şekil 27. Aspirinin etki mekanizması (Chiang ve ark.,2004)

Prostaglandin: Otokrin ve parakrin düzenleyici işlevlere aracılık eder, iki genel fizyolojik etkisi vardır. Birincisi düz kasın kasılma durumu üzerindeki etkisi, ikincisi de sinyal iletimini aktive eden dış uyarıya hedef dokuların yanıtını değiştirici etkidir. Trombositlerin agregasyonunu tetikleyerek kanın pıhtılaşmasını sağlar.

Prostasiklin: Damar endoteli tarafından sentezlenen temel prostaglandindir, bir vazodilatördür, damar düz kasını gevşetir, trombositlerin agregasyonunu ve endotel yüzeyine tutunmayı engeller.

Tromboksan A₂: Trombositler tarafından sentezlenir, arterleri daraltır ve trombosit agregasyonunu tetikler (Söğüt,2008).

Aspirinin temel etki mekanizması, anahtar enzim siklooksijenazın inaktivasyonu ve sonuçta prostaglandin sentezinin inhibisyonudur. Bu analjezik, anti-inflamatuar ve antipiretik etkileri ve trombosit agregasyonunu açıklamaktadır (Nietsch, 1991) .



Şekil 28. Trombosit agregasyonu (Söğüt, 2008)

Aspirin genellikle myokard infarktüsü ve inme gibi trombotik olayların sekonder önleyicisi olarak kullanılır (Podhaisky ve ark.,1997). Düşük doz aspirin (75-325 mg/gün) koroner ve serebrovasküler hastalıkların sekonder önleyicisi ve akut olaylarda fayda sağlayıcısıdır (Taubert ve ark.,2004).

Platelet inhibisyonuna ek olarak vasküler endotelyumun korunmasını da sağlar. Bu nedenle oklüzif kardiyo ve serebrovasküler hastalıkların önlenmesinde ve aterosklerozun başlangıcında oluşan zararlar üzerinde oldukça etkilidir (Podhaisky ve ark.,1997).

Çalışmalar oksidatif stresin kardiyovasküler risk faktörü ve aterogenez sırasında endotelial hasarın önemli kaynağı olduğunu göstermiştir. Nötrofil ve monositlerden salınan oksijen radikalleri direk olarak endoteliuma hasar verirler (Podhaisky ve ark.,1997).

Düşük doz aspirin kullanımı antitrombotik ve vazodilatör siklooksijenaz metabolitleri olan endotelial prostasiklini baskılar. Aspirin endotel bütünlüğünü korur bu nedenle oksidatif stres altında bulunan endotelin antitrombotik ve antiaterojenik fonksiyonlarını korur

(Podhaisky ve ark.,1997). Klinik alışmalar dşşk doz aspirinin vasküler homeostazın temeli olan endotel bağımlı arterial relaksasyonu sağladığını göstermiştir (Taubert ve ark.,2004).

Aspirinin metal bağlama özelliği mevcuttur. Bu özelliği ile oksijen radikalleri oluşum bölgesinden demir iyonlarını çekebilir. Bu nedenle hidrojen peroksit bağımlı hücre hasarıyla karşılaştırma yapıldığında aspirin 10 kat daha güçlü hücre koruyucusu gibi davranır (Podhaisky ve ark.,1997).

Hidrojen peroksite maruz kalan endotel hücrelerinin hücre canlılıklarında azalma olmasına dair kanıtlar mevcuttur. Aspirin ile ilgili yapılan çalışmalar aspirinin (3-30 $\mu\text{mol/L}$) konsantrasyona bağlı olarak hücreleri sitotoksiteden koruduğunu göstermiştir. Bu da aspirinin hidrojen peroksitin zararlı etkisinden endotel hücrelerini koruma kapasitesi ve serbest radikal kovucu özellikleri olduğunu gösterir (Grosser ve Schröder,2003).

Aspirinin antioksidan etkisi vasküler tonusu azaltmak ve lipid peroksidasyonunu baskılamaktır (Grosser ve Schröder,2003).Aspirindeki asetil grubu eNOS'un sentezini ve yararlılığını artırır (Bulckaen ve ark.,2008).Bu da NO ile oluşan hücre korunmasını sağladığını gösterir. Aspirin gibi NO 'de endotel hücrelerinin hidrojen peroksit ve diğer oksidan ajanlara duyarlılığını azaltır. Hem aspirin hem de NO'in endotel hücreleri üzerinde uzun dönem koruyucu etkisi mevcuttur (Grosser ve Schröder,2003).

Aspirinin Yan Etkileri:

Genel olarak en sık görülen yan etkileri, sindirim sistemi üzerine olan etkileri ve deri kanamalarıdır. Bazı risk etmenleri sindirim sistemi kanama oluşumunu kolaylaştırır. Kullanılan doz, kullanım süresi, eşlik eden durumlar kaltsal ve edinsel kanamaya yatkınlık çizelgeleri ve birlikte kullanılan ilaçlar bilinen risk etmenleridir (Demir,2007).

Başka kaynaklarda da yine gastrointestinal hasar üzerine nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) ilaçların etkileri üzerinde durulmuştur. Oksijen radikali kaynaklı lipid peroksit ve nötrofil aktivasyonu NSAID kaynaklı gastrik mukozal hasarın oluşmasına neden olur. Bu hipotezi destekleyen üç unsur vardır:

1. Hem lipid peroksitler, hem de nötrofiller aspirin uygulamasından sonra insan ve hayvan gastrik mukozasında birikir.
2. SOD ve DMSO ile muamele NSAID'ler tarafından yapılan mukozal hasarı iyileştirir.
3. Mukozal hasarlar nötrofilleri eksik olan hayvanlarda inhibe olmuştur (Wolfe ve ark.,1999).

Aspirinin karbohidrat metabolizmasında adrenal medulla ve korteksi uyarır, glukoz-6-fosfataz aktivitesini artırır (hiperglisemi) böylece glikoliz artar, glikoneogenez bozulur (hipoglisemi). Protein sentezini inhibe ederek protein degradasyonunu hızlandırır, aminoasitlerin tübüler geri emilimini inhibe eder. Lipid metabolizmasında lipogenez düşer, lipoliz artar, plazma proteinlerinde yağ asitlerinin yapısı bozulur. Trombositlerin aspirine yanıtları doza bağlı değişken sürelidir (Negoro ve Wakabayashi, 2005).

Aspirinin eritrosit ve trombosit zarı üzerindeki etkisini inceleyen çalışmalar, aspirinin zar akıcılığını ve lipid düzenini bozduğunu bunun yanı sıra lipid protein matriksi ve zar protein konformasyonunda düzensizliklere neden olduğunu göstermiştir (Watala ve Gwozdinski, 1993).

Düşük dozda (< 150 mg/gün) ve kısa süreli (< 4-6 hafta) kullanımda genellikle sorun olmaz. Fakat aspirinin endike olduğu aterosklerotik hastalıklar geçici olmadığından ve kullanım belkide hayat boyu olacağından düşük-etkin dozda kullanmak önem kazanmaktadır. Eşlik eden durumlara ve ilaç kullanımına dikkat etmek kanama riskini azaltacaktır (Demir, 2007).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

Biyogüvenlik Kabini Class 2

İnverted Mikroskop

CO₂ İnkübatör

Derin Dondurucu (-80 °C)

Otoklav

Santrifüj

Pipet Aid

Hassas Terazı

Otomatik Pipetler

Mikroplate Okuyucu

Steril Filtre (0.22µ)

Santrifüj Tüp 50 ml

Santrifüj Tüp 15 ml

Disposable Pipet (5-10 ml)

Vidalı Kapaklı Flasklar (T-25,T75 cm²/yüzey)

Plate (12-96 kuyucuklu)

3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Fetal Calf Serum

Sodyum bi karbonat

Potasyum Fosfat Sigma

Potasyum Klorid Sigma

Sodyum Sitrat

Penicilin-Streptomycin

Tripsin-EDTA

H₃PO₄

%0.1 Naftiletlen Daimin Dihidroklorid

%1 Sülfanilamid

Fenol Red

DMEM F-12 Ham

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide;Thiazolyl blue)

Bakır Sülfat

3.3. Çalışmada Kullanılan Kitler

Katalaz Ölçüm Kiti - Cayman

Süperoksit Dismutaz ölçüm Kiti - Cayman

Glutasyon Peroksidaz Ölçüm Kiti - Cayman

TBARS Ölçüm Kiti - Cayman

Çalışmada insan umbilikal vasküler endotel hücre soyu (human umbilical vascular endothelial cell line - HUVEC) kullanıldı. HUVEC İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik A.B.D’den temin edildi.

3.4. Çalışmada Kullanılan Ortamın ve Malzemenin Temizliği ve Sterilizasyonu

Cam malzemeler bir gece çamaşır suyunda bekletildi. Daha sonra deterjanlı suda bir gece bekletilen malzemeler ertesi gün önce deterjanla yıkandı daha sonra çeşme altında bol su ile durulanarak bir gece distile suda bekletildi. Daha sonra etüvde kurutulan malzemeler ağızları alüminyum folyo ile kapatılarak, pipetler ise pipet kutuları içerisinde 180°C’lik etüvde bir saat steril edildi.

Isıya dayanıklı pipet uçları, ependorflar gibi plastik malzemeler ise otoklavda 121°C’de 3 atm basınçta 15 dakika steril edildi.

Hazırlanan çözeltiler otoklavda 121°C’de 3 atm basınçta 15 dakika steril edildi. Medyum, serum gibi ısıya dayanıksız malzemeler ise 0.22µm’lik milipor filtreler kullanılarak steril edildi.

Doku kültürü laboratuvarı yerleri ve çalışma alanları her hafta periyodik olarak % 70 alkol çözeltisi ile silindi. Laboratuvar kullanılmadığı zamanlarda ve içeriye girilmeden en az yarım saat önce biyogüvenlik kabini çalıştırılarak ve UV lamba kullanılarak ortamın sterilizasyonu sağlandı.

3.5. Hücre Kültürü Aşaması

3.5.1. Hücre Kültüründe Kullanılacak Malzemelerin Hazırlığı

Deneyler Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Deneylerde İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalından sağlanan HUVEC (İnsan Umbilikal Vasküler Endotel Hücre Soyu) kullanıldı.

Hücreler, içerisinde inaktive edilmiş % 10 fetal sığır serumu (FCS), 0.2 mM glutamin, 100 µg/ml streptomisin 100 IU/ml penisilin içeren DMEM-F12 Ham medyumunda (Dulbecco'nun Modifiye edilmiş Eagle Medyum, besleyici karışım F12 Ham medyum) 37 °C'de, % 5 CO₂ ve 1 atm basınç altında 25 ve 75 cm²'lik steril flasklar içerisinde kültüre edildi. DMEM-F12 Ham medyum ticari olarak hazır kullanıma hazır şekilde satın alındı. Hücreler haftada 2 kez rutin olarak pasajlandı. Hücreler, yoğunluk olarak flaskın yarı yüzeyini kapladıklarında deneylerde kullanıldı.

3.5.1.1. FCS'nin Kullanıma Hazırlanması

FCS (fetal sığır serumu) -20 °C'de saklanır ve taşınması soğuk zincirle yapılır. Stok serum kullanılmadan önce 56 °C'de ½ saat ısı ile inaktive edildi.

3.5.1.2. Hücre Kültürü Deneylerinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Kullanılan Tripsin-EDTA ticari olarak kullanıma hazır biçimde temin edildi. 1/8 oranında distile su ile sulandırılarak ve sulandırma sonunda 0.22µm'lik milipor filtreden süzülerek steri hale getirildi ve kullanıldı.

Penicilin-Streptomycin kullanıma hazır halde satın alındı. -20 °C'de saklandı.

Kalsiyumsuz magnezyumsuz fosfat tamponu (CMF-PBS), 1 lt bidistile su içerisine 8 gr NaCl, 0.25 gr KCl, 0.25 gr KH₂PO₄, 0.01 gr Phenol Red ilave edilerek hazırlandı. Çözelti otoklavda 121 °C, 3 atm basınçta 15 dakika steril edildi.

NaHCO₃ (0.00052 M), 200 ml bidistile suya 8.8 gr NaHCO₃ ve 0.01 gr Phenol Red ilave edilerek hazırlandı. Çözelti otoklavda 121 °C, 3 atm basınçta 15 dakika steril edildi.

3.5.2. Hücre Kültürü Teknikleri

3.5.2.1. Hücre Soyunun Açılması

Uzun süre sıvı azot buharında saklanmış olan hücreler çözünmesi sağlanana kadar 37 °C'lik su banyosunda tutulur. Çözünen hücre süspansiyonu %20 serumlu medyum içeren flasklara damla damla alınarak 3-4 saat 37 °C'de, % 5 CO₂ ve 1 atm basınç altında inkübasyona bırakılır. Bu sürenin sonunda hücre medyumunu %10 serumlu medyumla değiştirilir.

3.5.2.2. Hücrelerin Çoğaltılması

Hücreler 25 cm²'lik flasklarda 8-10 ml, 75 cm²'lik flasklarda ise 25 ml %10 FCS ve 100 IU/penisilin-streptomisin içeren DMEM-F12 Ham medyumunu içerisinde % 80-90 yoğunluğa geldiklerinde pasajlanmak suretiyle üretilir.

3.5.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

Flasklar içerisinde yeterli yoğunluğa gelen hücrelerden medyum uzaklaştırılır. Hücrelerin üzerine % 0.05'lik tripsinden küçük flasklara 1-2 ml, büyük flasklara 3-4 ml eklenerek 1 dakika bekletilir. Tripsin hücrelerden uzaklaştırılır ve flasklar 37°C'lik %5'lik CO₂ etüvde 1.5 dakika bekletilerek kontrollü şekilde kalkmaları sağlanır. Yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine tripsinin etkisini bloke etmek için tripsinle aynı miktarda medyum eklenir iyice pipetaj yapıldıktan sonra santrifüj tüpüne süspanse halde toplanan hücreler 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatantı uzaklaştırılır. Bir miktar medyumla süspanse edilen ve iyice pipetaj yapılan hücreler yeterli miktarda medyum konulmuş flasklara ekilir. Flasklar 37°C'lik %5'lik CO₂ etüve kaldırılır.

3.5.2.4. Hücre Sayımı

Toplam hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre sayısını hesaplamak için, üzeri 4 adet 16 küçük kare içeren bölgeden oluşan 1 mm²'lik alan ve 0.1 mm derinliğe sahip hemasitometre kullanılır. Süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle hesaplanır.

Toplam hücre sayısı/ml = Hemasitometre sayım sonucu x 10⁴ x Medyum miktarı(ml)

3.5.2.5. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Hücreler %0.05'lik tripsin uygulaması ile tutundukları yüzeyden kaldırılır. Kalktıkları gözlenen hücrelere tripsinin etkisini bloke etmek için medyum eklenir ve süspansiyon santrifüj tüpünde toplanarak 1000 rpm'de 3 dk santrifüj edilir. Süpernatant uzaklaştırılır. Pellete tekrar medyum eklenir ve tripsinin etkisinden kurtarmak için tekrar santrifüj edilir. Bu işlem sonrasında pellete tekrar medyum ilave edilir ve pipetajla hücreler tek hücre süspansiyonu haline getirilir. Hemasitometrede hücre sayımı yapılır. Hücreleri içeren falkon tüpü, %45 serum ve %10 DMSO içeren medyumlu falkon tüpü buz içerisine oturtulur. Kullanılacak soğuğa dayanıklı saklama tüpleri (cryo tüp) de buza oturtularak soğumaları sağlanır. Tüp içerisindeki tek hücre süspansiyonundan DMSO'lu serumlu medyum içerisine alınan hücreler cryo tüpüne damla damla ilave edilir. Saklama tüpü 1 gece -20 °C'de, 1 gece de -70 °C'de bekletildikten sonra sıvı nitrojen buharına alınır. Tüpteki son konsantrasyon 2.5×10^6 hücre/ml olmalıdır.

3.5.3. Antioksidant Enzim Aktivitesi Deneyleri

3.5.3.1. Hücrelerin Hazırlanması

Flasklarda yarı yarıya yoğun hale gelen HUVEC %0.05'lik tripsin ilavesiyle kontrollü olarak kaldırılıp aynı miktar medyum ilavesi ile toplandı. Toplanan hücre süspansiyonu 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantı uzaklaştırılmış dibe çökmüş hücreler serumlu medyumla tekrar sulandırılarak tek hücre süspansiyonu elde edildi. Bu süspansiyon hemasitometrik kamera yardımıyla sayılarak toplam hücre sayısı hesaplandı.

3.5.3.2. Aspirinin Hücrelere Verilecek Dozlarının Ayarlanması

Öncelikle 0.01M aspirin 10 ml distile suda çözüldü. Hazırladığımız bu stok solusyondan 25µM, 50µM, 100µM, 250µM, 500µM, 750µM, 1000µM ve 1500µM son konsantrasyonları olacak şekilde besiyeri ile sulandırılarak çeşitli oranlarda hücrelere verilmek üzere ilaç dozları hazırlandı.

3.5.3.3. Tek Sıralı Monolayer Hücre Kültürü Deneyleri

24 kuyucuklu kültür tabakalarının her kuyucuğuna her dozdan iki kuyucuk olacak şekilde 1'er ml DMEM-F12 Ham medyumunu verildi. Kontrol kuyucuklarına yine her doz için iki kontrol kuyucuğu olacak şekilde etken maddesiz medyumdan 1 ml verildi. Bu kuyucukların her birine hücre sayısı hesaplanmış %100 canlı tek hücre süspansiyonundan 1 ml'sinde 100.000 olacak şekilde HUVEC ekildi. Böylelikle örneğin 20µM'lık bir dozu kuyucuğa 1 ml verdiğimiz zaman, üzerine 1 ml'sinde 100.000 canlı hücre olacak şekilde hücre süspansiyonunda eklediğimizde kuyucuğun etken madde miktarı olarak son konsantrasyonu 10µM oluyor.

Deneylerde yukarıda da bahsedildiği gibi etken maddenin her konsantrasyonu için 2 kuyucuk kullanıldı ve her konsantrasyon için 0-1, 24, 48, 72 saatlik deney grupları oluşturuldu.

3.5.3.4. Sitotoksik Dozların Değerlendirilmesi

Hücrelerin verilen etken maddenin her konsantrasyonu için tüm sürelerin sonunda invert mikroskop altında fotoğrafları çekildi ve sitotoksik doz alanları fotoğraflar üzerinde belirtildi.

3.5.3.5. MTT Ölçümü

Bu ölçüm için 96 kuyucuklu mikropate kullanılmıştır. Hücrelerin 24 saat süre ile kuyucuklara tutunması beklendikten sonra her kuyucuğa 100 µl hücre süspansiyonu olacak şekilde aktarıldı. Test periyodunun sonunda üst medyum kuyucuklardan çekildi ve üzerilerine 100 µl MTT solusyonu eklendi ve 4 saat süre ile 37 °C'de %5 CO₂'de inkübasyona bırakıldı . MTT solusyonu 5 mg/ml olacak şekilde PBS içinde çözülüp steril filtrasyon ile bir şişeye transfer edilerek hazırlandı. 4 saat inkübasyon sonunda MTT solusyonu kuyucuklarda çekildi ve kuyucukların üzerine MTT ile oluşan formazon kristallerini çözmek için 200 µl DMSO eklendi, hemen ardından 540 nm dalga boyunda mikropate okuyucuda okutuldu. Okunan absorbans değerine göre sitotoksite düzeyi belirlendi. Sitotoksite düzeyleri aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$1-(\text{test kuyucuğunun absorbansı}/\text{kontrol kuyucuğunun absorbansı})\times 100$$

Kontrole göre %50 oranında sitotoksik etki gösteren konsantrasyon sitotoksik doz olarak kabul edildi.

3.5.3.6. Enzim aktivitesi deneyleri için süpernatant eldesi

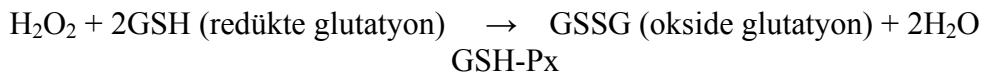
İnkübasyon süreleri sonunda deney gruplarının medyumları uzaklaştırıldı. Bu medyumlar NO ölçümü için süpernatant olarak kullanıldı. Medyumları uzaklaştırılan hücreler tutundukları alandan kaldırıldı. Kalkan hücrelerin üzerine 2 ml lizis tamponu eklenip iyice pipetaj yapılarak homojenize olması sağlandı. Homojenize olan hücreler bu karışım içerisinde toplanarak 10.000 g'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi. Enzim aktivitesi ölçümü için süpernatantları ayrıldı. Ölçüm yapılana kadar süpernatantlar -80 °C'de saklandı.

3.6. NO Ölçümü

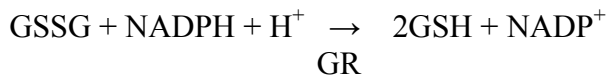
NO üretimi NO'nin stabil ürünü olan nitrit (NO₂) düzeyi ölçülerek değerlendirildi. Bu amaçla, süpernatantlardan 50µl alınarak üzerine eşit miktarda Griess ayıracı (%1 sülfanilamid / %0.1 naftiletlen daimin dihidroklorid / %2.5 H₃PO₄) ilave edildi. Nitrit konsantrasyonu, renk değişimi standart soydum nitrit (10, 20, 50, 100M) solusyondak ile karıştırılarak 550nm dalga boyunda, spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.7. Glutasyon Peroksidaz Aktivite Tayini

Glutasyon Peroksidaz enziminin aktivite tayini için ticari olarak satılan Glutasyon Peroksidaz Ölçüm Kiti kullanıldı.



H₂O₂' lerin redükte glutasyon ile indirgenmesi ile oluşan okside glutasyon glutasyon redüktazın katalizlediği reaksiyonla tekrar glutatyona dönüşür.



Bu reaksiyonlar sonucunda NADPH'ın NADP^{+} 'ya oksidasyonu 340 nm'deki absorbans değerlerinde azalmaya neden olur.

96 kuyucuklu mikropate kullanılmıştır.

Kullanılan Reaktifler:

- 1- Assay Buffer
- 2- Sample Buffer
- 3- Glutasyon Peroksidaz
- 4- Glutasyon Peroksidaz Co- Substrat karışımı
- 5- Kümene Hidrojen peroksit

Ölçümün Yapılması:

- 1- Non-enzimatik kuyucuklar
120 μl assay buffer
50 μl co-substrat karışımı
- 2- Pozitif Kontrol Kuyucuğu
100 μl assay buffer
50 μl co-substrat karışımı
20 μl dilüye GPx (kontrol)
- 3- Örnek Kuyucukları
100 μl assay buffer
50 μl co-substrat karışımı
20 μl örnek

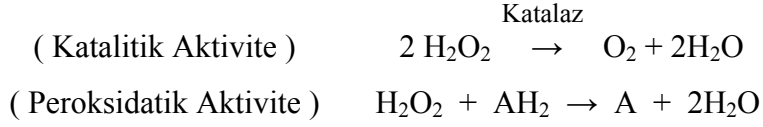
Reaksiyon tüm kuyucuklara 20 μl kümene hidrojen peroksitin eklenmesiyle başlar. Birkaç dakika shakerda karıştırılır. 340 nm'de absorbans okunur. Okuma 1'er dakika arayla 5 kez tekrarlanır.

3.8. Katalaz Aktivite Tayini

CAT enziminin aktivite tayini için ticari olarak satılan Katalaz Ölçüm Kiti kullanıldı.

Bu enzim iki molekül H_2O_2 'nin moleküler oksijen ve iki molekül suya dönüşümünü katalizler. CAT aynı zamanda peroksidatik aktivite ile de tanımlanır, reaksiyonda düşük moleküler ağırlıklı alkoller elektron vericisi olarak davranır. Alifatik alkoller CAT için özel

bir substrat gibi davranırken diğ er enzimler peroksidatik aktivite için bu substratları kullanmazlar.



Katalaz  l  m kiti enzim aktivitesinin belirlenmesi için CAT'ın peroksidatik fonksiyonundan yararlanır. Metot H₂O₂'nin optimal konsantrasyonlarında metanol ile enzimin reaksiyonuna dayanır. Oluşan formaldehit kolorimetrik olarak 4-amino-3-hidrazin-5-merkapt-1,2,4 triazol ile ölçülür. Oluşan mor renk 540 nm'de absorbands okunur.

96 kuyucuklu mikropate kullanılmıştır.

Kullanılan Reaktifler:

- 1- Assay Buffer
- 2- Sample Buffer
- 3- Formaldehit Standardı
- 4- Katalaz (Kontrol)
- 5- Potasyum Hidroksit
- 6- Metanol
- 7- Hidrojen Peroksit
- 8- Purpald (Kromojen)
- 9- Potasyum Periodat

 l  m n Yapılması:

- 1- Formaldehit Standart Kuyucukları:
 - 100  l dilüye edilmiş assay buffer
 - 30  l metanol
 - 20  l standart
- 2- Pozitif Kontrol Kuyucukları
 - 100  l dilüye edilmiş assay buffer
 - 30  l metanol
 - 20  l dilüye edilmiş katalaz
- 3- Sample Kuyucukları
 - 100  l dilüye edilmiş assay buffer
 - 30  l metanol
 - 20  l  rnek

Reaksiyon 20 µl dilüye H₂O₂'nin tüm kuyucuklara koyulmasıyla başlar. Plate 20 dakika shakerda oda sıcaklığında inkübe edilir. İnkübasyon sonucunda her kuyuya 30 µl potasyum hidroksit koyulur ve reaksiyon sonlandırılır. Her kuyuya 30 µl purpald eklenir. Shakerda 10 dakika inkübasyon sonucunda her kuyuya 10 µl potasyum potasyum periodat eklenir. Shakerda oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyondan sonra 540 nm absorbansta okunur.

3.9. Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini

SOD enziminin aktivite tayini için ticari olarak satılan Süperoksit Dismutaz Ölçüm Kiti kullanıldı.

Süperoksit Dismutaz ölçüm kiti hipoksantin ve ksantin oksidaz ile oluşturulan süperoksit radikalinin belirlenmesi için tetrazolium tuzu kullanır. 1 ünite SOD süperoksit radikalinin %50 dismutasyonunu için gerekli enzim miktarı olarak tanımlanır.

96 kuyucuklu mikropate kullanılmıştır.

Kullanılan reaktifler:

- 1- Assay Buffer
- 2- Sample Buffer
- 3- Radical Detector
- 4- SOD Standartları
- 5- Xanthine Oxidase

Ölçümün Yapılması:

- 1- SOD Standart Kuyucukları
200 µl dilüye edilmiş Radical Detector
10 µl standart
- 2- Örnek Kuyucukları:
200 µl dilüye edilmiş Radical Detector
10 µl örnek

Reaksiyon 20 µl dilüye Xanthine Oxidase'ın tüm kuyucuklara koyulmasıyla başlar. 5 dakika plate shakerda karıştırılır. 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. 440-460 nm'de absorbans okunur.

3.10. Lipid Peroksidasyonu Tayini

Lipid peroksidasyonu düzeyi Varshey ve Kale tarafından tariflenen Tiyobarbitürik Asit (TBARS) metodu ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Sonuçlar mg protein başına MDA miktarı olarak verildi.

Bu metotta Lipid peroksidasyonu aldehid ürünlerinden MDA ile TBA reaktivitesi esas alınmıştır.

Kullanılan Reaktifler:

- 1- TBA: 52mM, pH: 2,1
- 2- Tampon: $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$, 100mM, pH:7,4
- 3- Standart (MDA): 10 $\mu\text{mol/L}$
- 4- TCA: %30

	Numune	Standart	Kör
Süpernatant	0.2 ml	-	-
Standart	-	0.2 ml	-
Saf Su	-	-	0.2 ml
Tampon	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml
TCA	0.25 ml	0.25 ml	0.25 ml
TBA	0.25 ml	0.25 ml	0.25 ml

Deney tüpleri vortex ile karıştırıldı. 80⁰C’lik su banyosunda 45 dakika inkübasyona bırakıldı. Oda ısısında 10 dakika 3000 rpm’de santrifüj edildi.

Köre karşı supernatant kısmı 532 nm’de absorbans okundu.

3.11. İstatistiksel Analiz

Sürekli değişkenler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. Sürekli değişkenlerin çalışma ve kontrol gruplarındaki farklılığı Kruskal-Wallis testi ile araştırıldı. Antioksidan enzim aktivite değerlerinin gruplar içinde zaman göre farklılığı Friedman testi ile araştırıldı. p değerlerinin <0.05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiki analiz “Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 15.0 programı” ile yapıldı.

4. BULGULAR

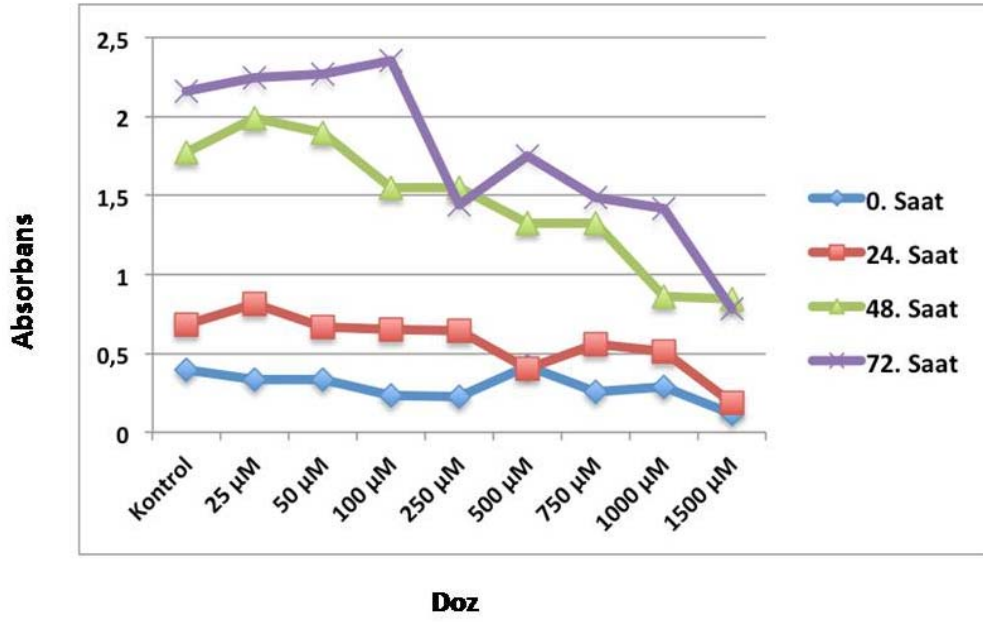
Çalışmada kullanılan 24 kuyucuklu mikropate'lerdeki endotel hücrelerinin her sıradaki 4 kuyucuktan 2'sine 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 ve 1500 μM dozlarında aspirin verilirken, diğer 2 kuyucuk kontrol olarak alındı. Buna göre hücre lizatlarından bazal şartlarda (0. saat), 24. saatte, 48. saatte ve 72. saatte katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve lipid peroksidasyonu ölçümleri yapılırken hücre medyumlarından ise NO salınımına bakıldı. MTT ölçümü için, 96 kuyucuklu mikropate'lerdeki hücrelere 3 kontrollü 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 ve 1500 μM dozlarında aspirin verilirken 3 kuyucuk kontrol kuyucuğu olarak kullanıldı. 0, 24, 48 ve 72. saatteki absorbans ölçümü yapıldı.

4.1. MTT Ölçümleri

MTT analizlerine göre kontrol grubuna göre %50 absorbans azalması ile belirlenen toksik doz düzeyi 0, 24 ve 72. saatte ölçülen analizlerde 1500 μM olarak belirlenirken, 48. saatteki ölçümlerde 1000 μM olarak saptanmıştır. (Çizelge 9, Şekil 29)

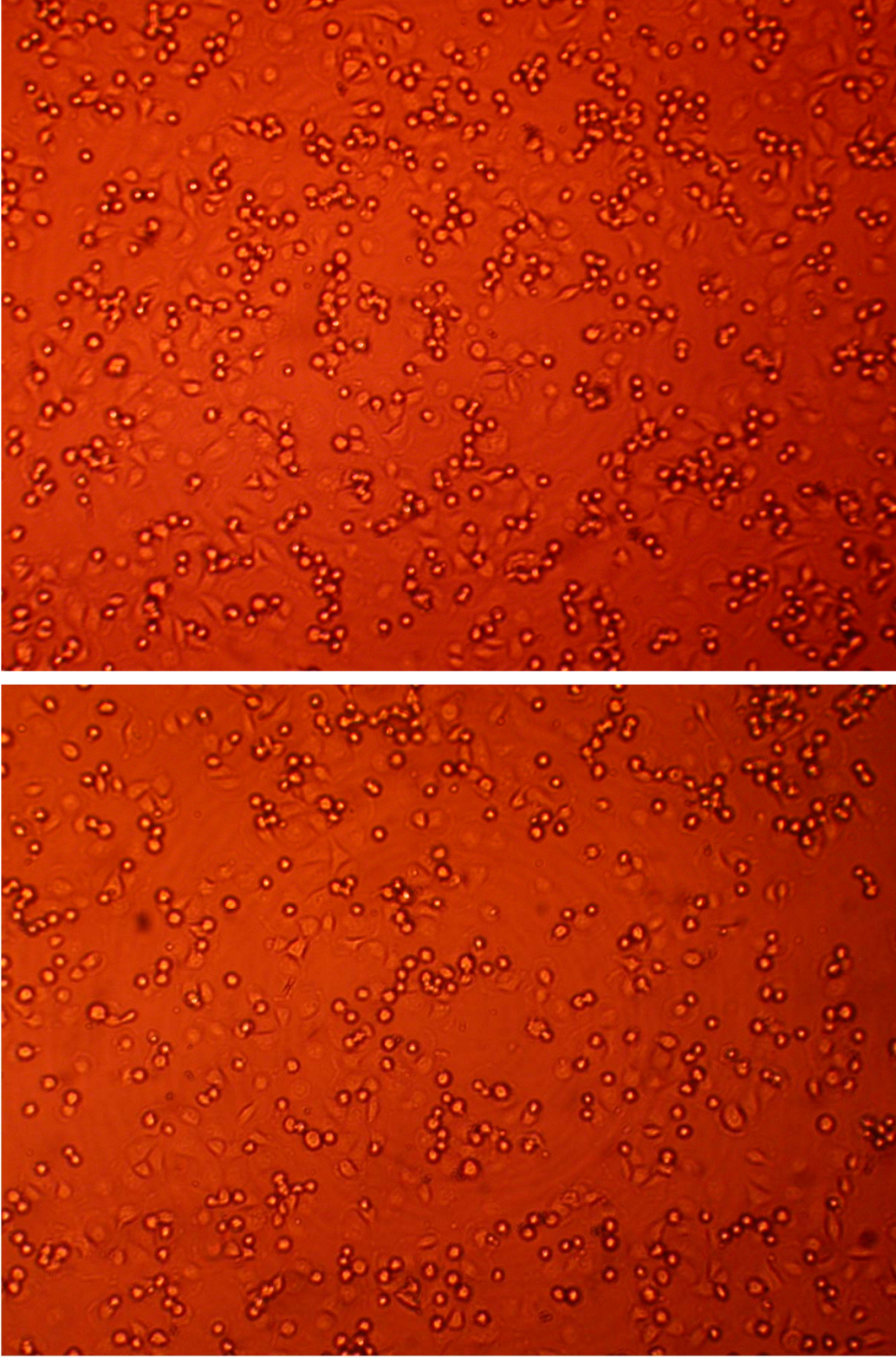
Çizelge 9. Farklı ilaç dozları ve kontrollerdeki zaman göre belirlenen absorbans değerleri

Doz	0. Saat	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Kontrol	0,394	0,685	1,776	2,157
25 μM	0,333	0,814	1,987	2,246
50 μM	0,332	0,669	1,897	2,26555
100 μM	0,231	0,1029	1,547	2,357
250 μM	0,222	0,644	1,549	1,437
500 μM	0,418	0,407	1,321	1,749
750 μM	0,257	0,558	1,327	1,484
1000 μM	0,289	0,508	0,857	1,42
1500 μM	0,117	0,187	0,841	0,779

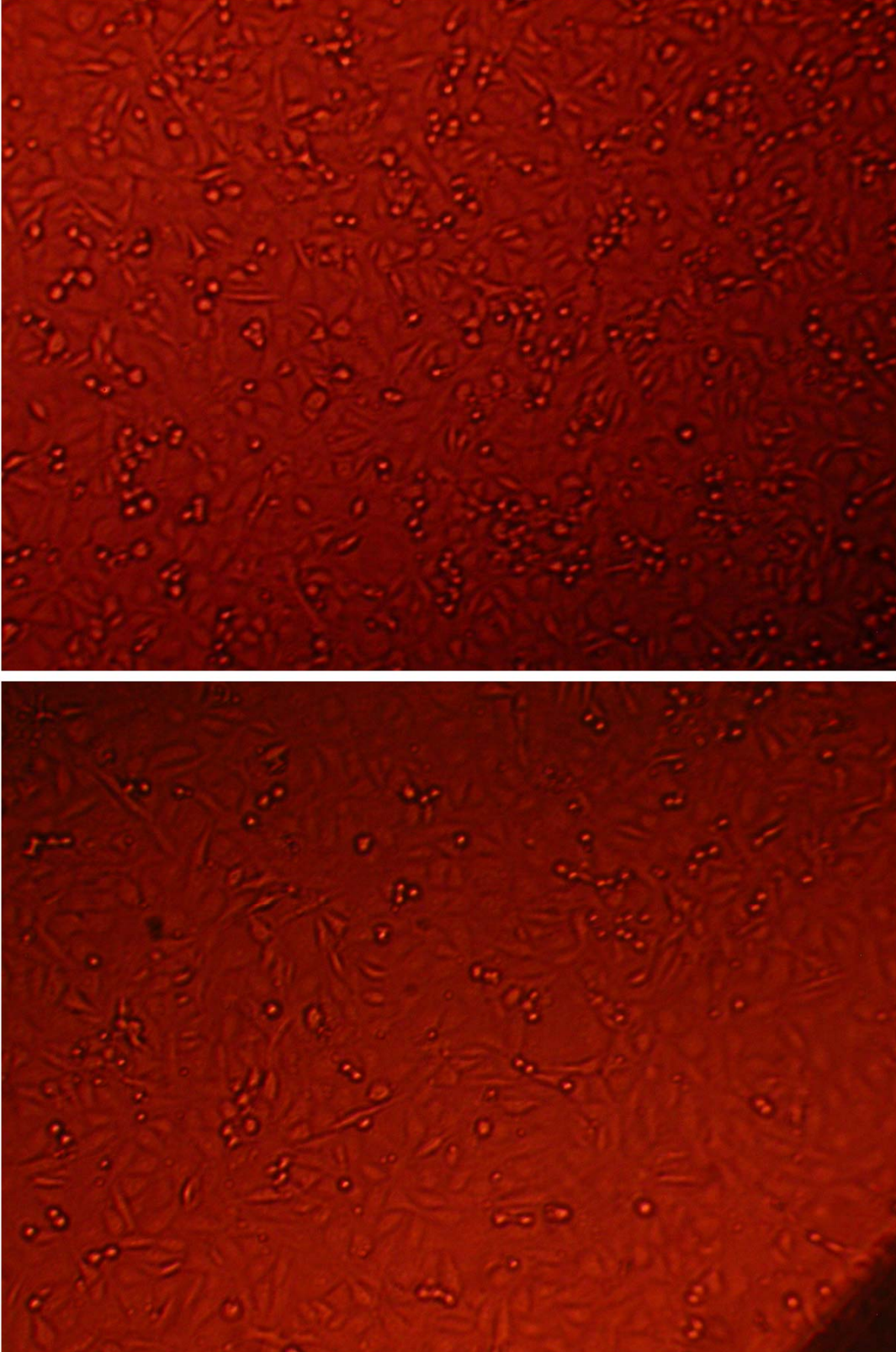


Şekil 29. Kontrollerde ölçülen absorbans değerlerinin farklı ilaç dozlarına göre değişimi

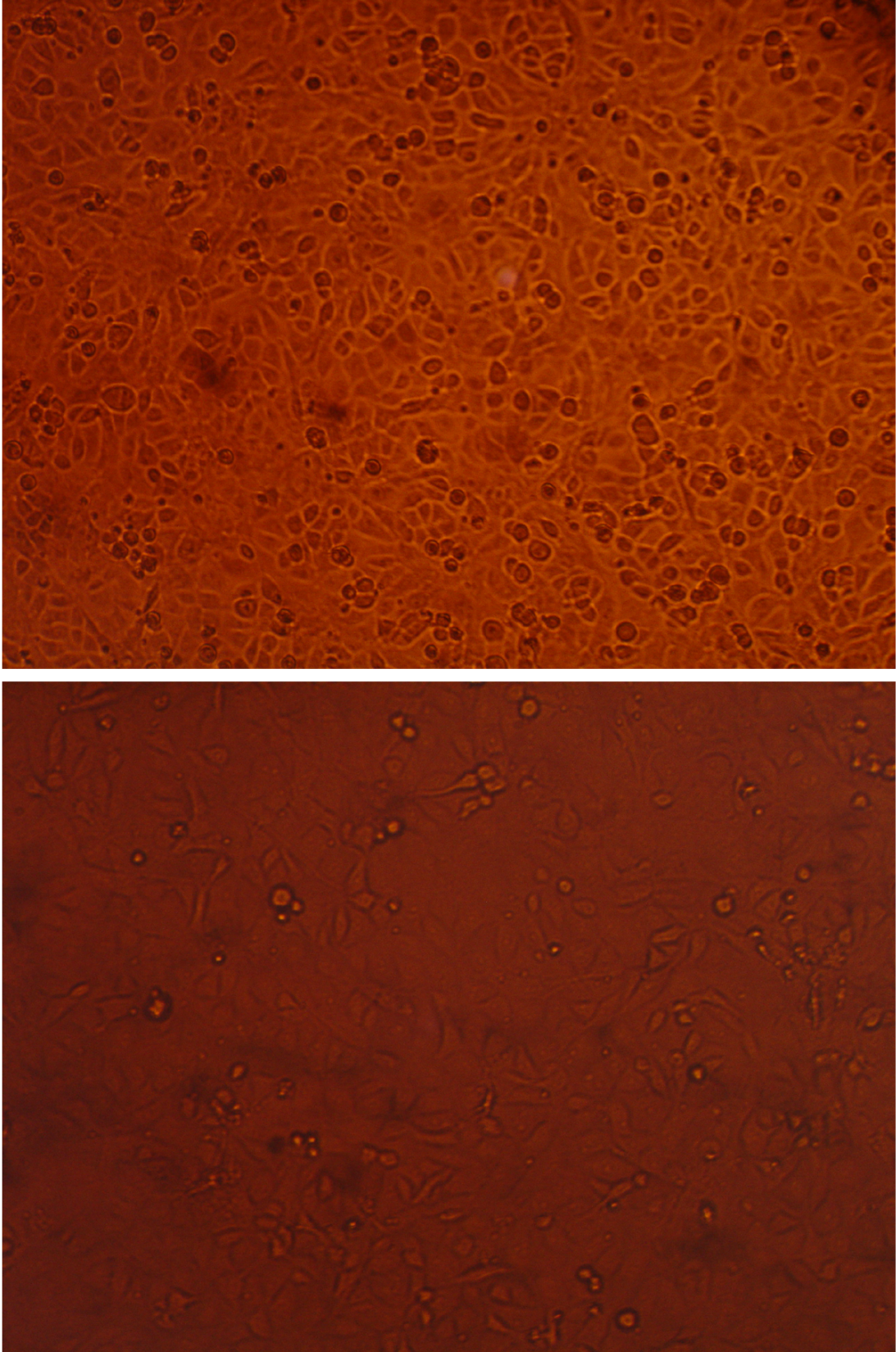
25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 ve 1500 μ M Aspirin verilmiş vasküler endotel hücrelerinin morfolojileri dikkate alınarak yapılan değerlendirmede, ilaç grupları ve kontroller arasında gözle görülen bir toksik etkiye rastlanmamıştır. Gözlenen bulgu, gözlenen hücrelerin özellikle 1000 μ M ve 1500 μ M gibi verilen yüksek dozlarda düşük dozlara oranla daha güzel açılım göstermeleridir (Şekil 30, 31, 32, 33).



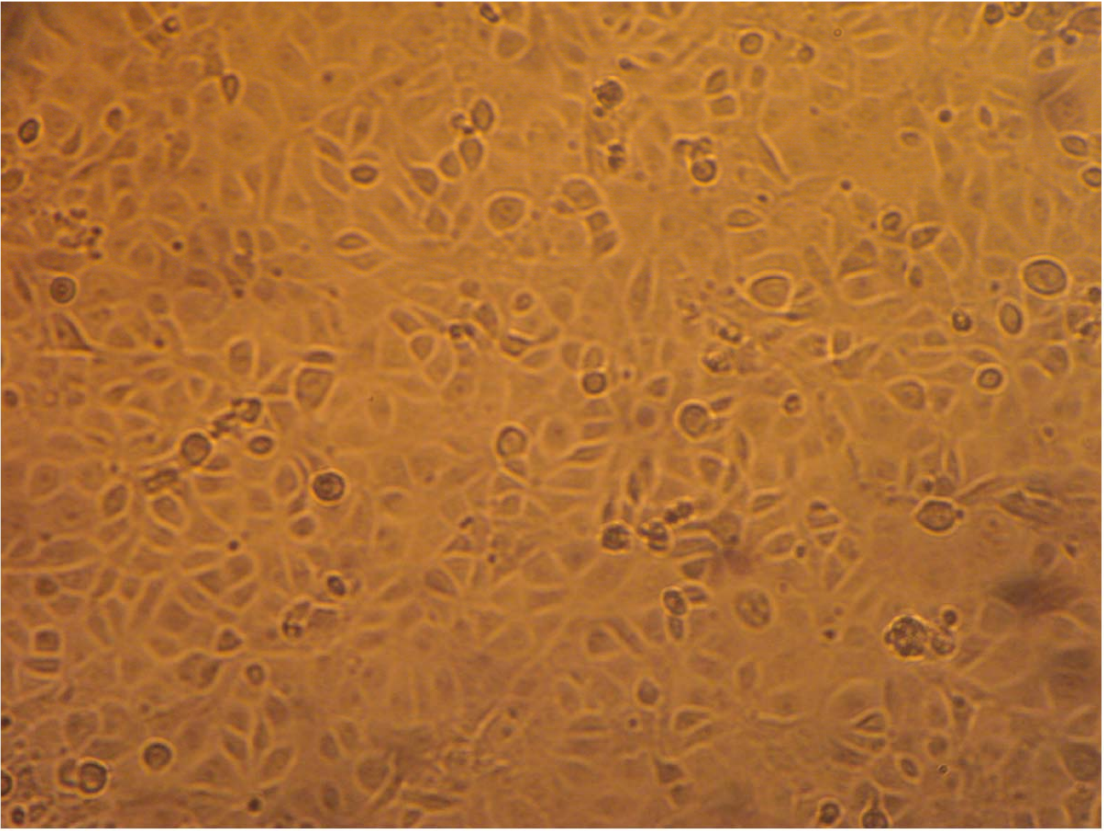
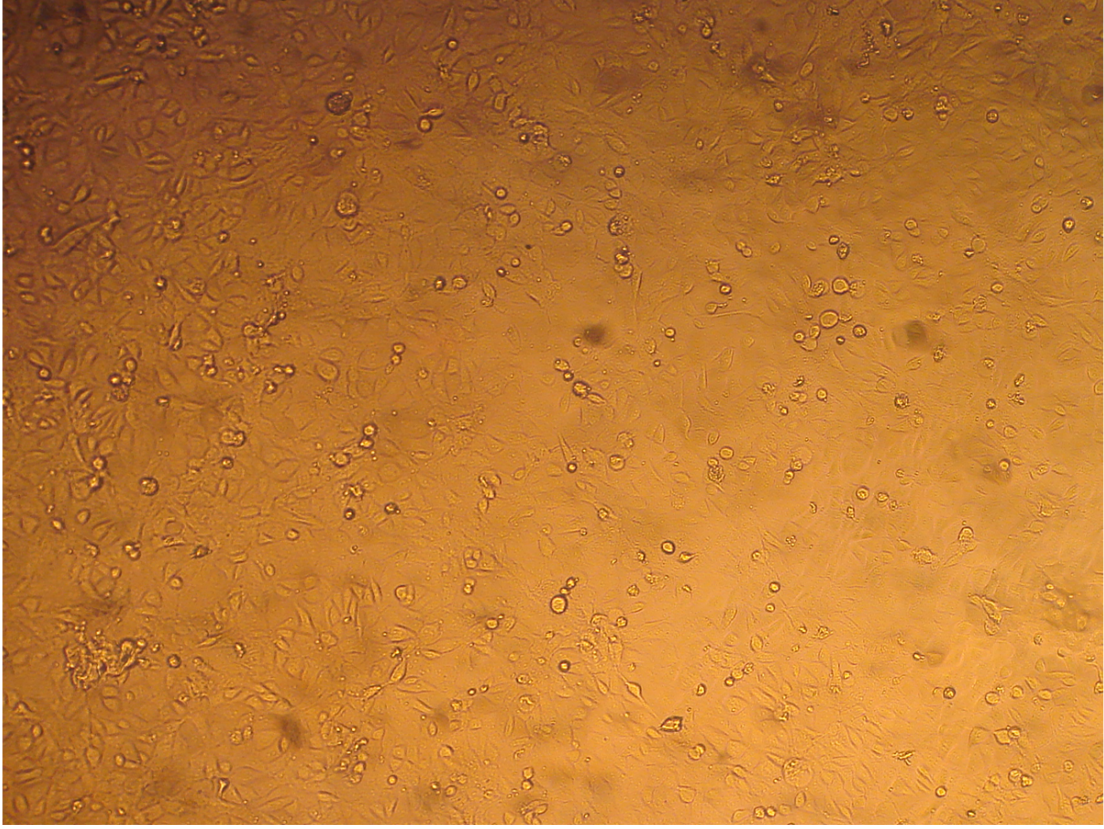
Şekil 30. (0. Saat) 1000 μ M Aspirin verilmiş endotel hücresi (üstteki resim) ve Aspirin verilmemiş kontrol endotel hücresi (alttaki resim)



Şekil 31. (24. Saat) 500 μ M Aspirin verilmiş endotel hücresi (üstteki resim) ve 1500 μ M Aspirin verilmiş endotel hücresi (alttaki resim)



Şekil 32. (48. Saat) 500 µM Aspirin verilmiş endotel hücresi (üstteki resim) ve 1500 µM Aspirin verilmiş endotel hücresi (alttaki resim)



Şekil 33. (72. Saat) 500 μ M Aspirin verilmiş endotel hücresi (üstteki resim) ve 1500 μ M Aspirin verilmiş endotel hücresi (alttaki resim)

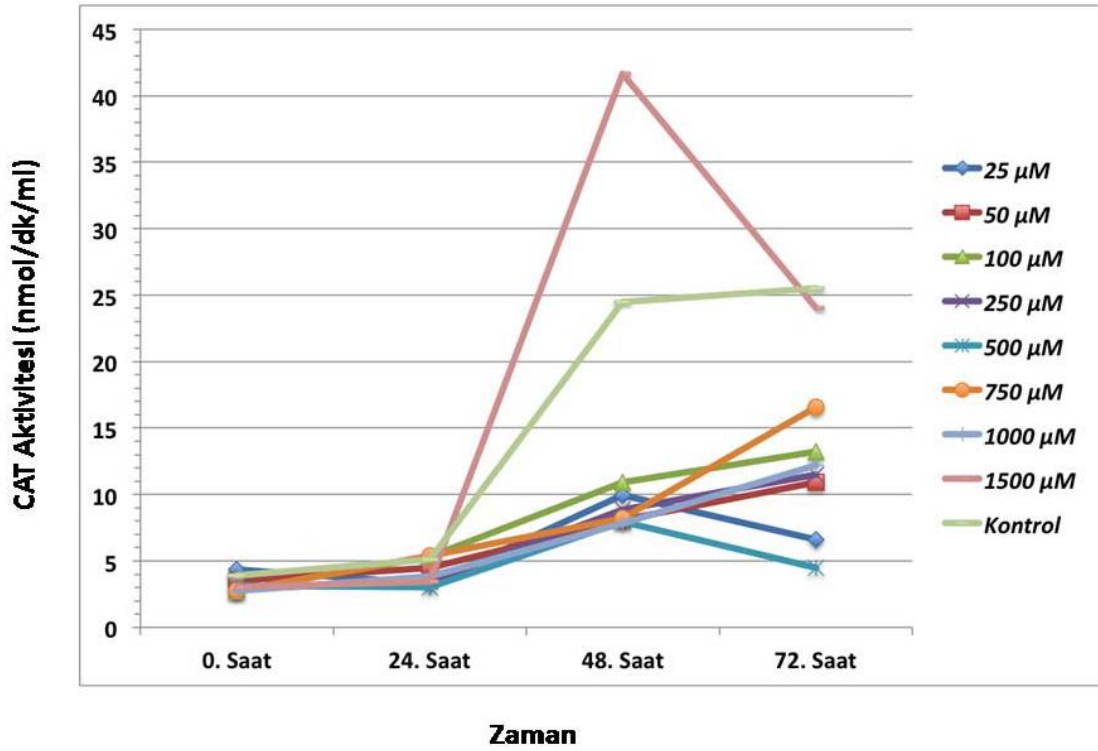
4.2. Katalaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Farklı ilaç dozları verilen ve kontrol olarak belirlenen kuyucuklardan bazal şartlarda (0. saat) ölçülen katalaz değerleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p=0.571$). Yine 24. Saat ($p=0.696$), 48. Saat ($p=0.249$) ve 72. saatte ($p=0.118$) ölçülen katalaz değerleri farklı ilaç dozları ve kontrol arasında farklılık göstermemiştir.

25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 ve 1500 μM ilaç verilen kuyucukların herbirinden 0., 24., 48. ve 72. saatte ölçülen katalaz değerleri karşılaştırıldığında, zamana göre farklılık göstermediği saptanmıştır ($p>0.05$). ASA verilmeyen kontrol grubunda ise 0., 24., 48. ve 72. saatte ölçülen katalaz değerleri arasında anlamlı fark saptanmıştır ($p< 0,0001$).

Farklı doz ve zamanlarda ölçülen katalaz aktivitesi ile ilgili veriler **Çizelge ..’de** sunulmuştur.

Çizelge 10	0, 24, 48 ve 72 saatte farklı ilaç dozları ve kontrollerde ölçülen katalaz aktivitesi (nmol/dk/ml)				
DOZ	0. saat	24. saat	48. saat	72. saat	p değeri
25 μM (n=2)	4,373 $\pm$ 2,295	3,291 $\pm$ 0,765	9,953 $\pm$ 5,595	6,594 $\pm$ 1,899	0,345
50 μM (n=2)	3,515 $\pm$ 0,073	4,478 $\pm$ 0,289	8,105 $\pm$ 1,780	10,893 $\pm$ 2,176	0,112
100 μM (n=2)	2,750 $\pm$ 0,000	5,307 $\pm$ 3,616	10,926 $\pm$ 4,120	13,240 $\pm$ 3,379	0,157
250 μM (n=2)	2,909 $\pm$ 0,615	3,468 $\pm$ 0,006	8,865 $\pm$ 0,709	11,523 $\pm$ 4,172	0,112
500 μM (n=2)	3,160 $\pm$ 0,000	3,030 $\pm$ 0,395	7,977 $\pm$ 3,327	4,504 $\pm$ 1,583	0,145
750 μM (n=2)	2,726 $\pm$ 0,350	5,380 $\pm$ 0,007	8,193 $\pm$ 0,767	16,599 $\pm$ 0,193	0,112
1000 μM (n=2)	2,750 $\pm$ 0,000	3,851 $\pm$ 1,557	7,826 $\pm$ 1,108	12,230 $\pm$ 1,739	0,120
1500 μM (n=2)	3,030 $\pm$ 0,395	3,477 $\pm$ 1,028	41,685 $\pm$ 11,504	24,025 $\pm$ 12,197	0,120
Kontrol (n=16)	3,892 $\pm$ 2,409	5,145 $\pm$ 2,812	24,496 $\pm$ 10,023	25,489 $\pm$ 22,013	< 0,0001
p değeri	0,571	0,696	0,249	0,118	



Şekil 34. Farklı ilaç dozları ve kontrollerde ölçülen katalaz aktivitesinin zamanla değişimi

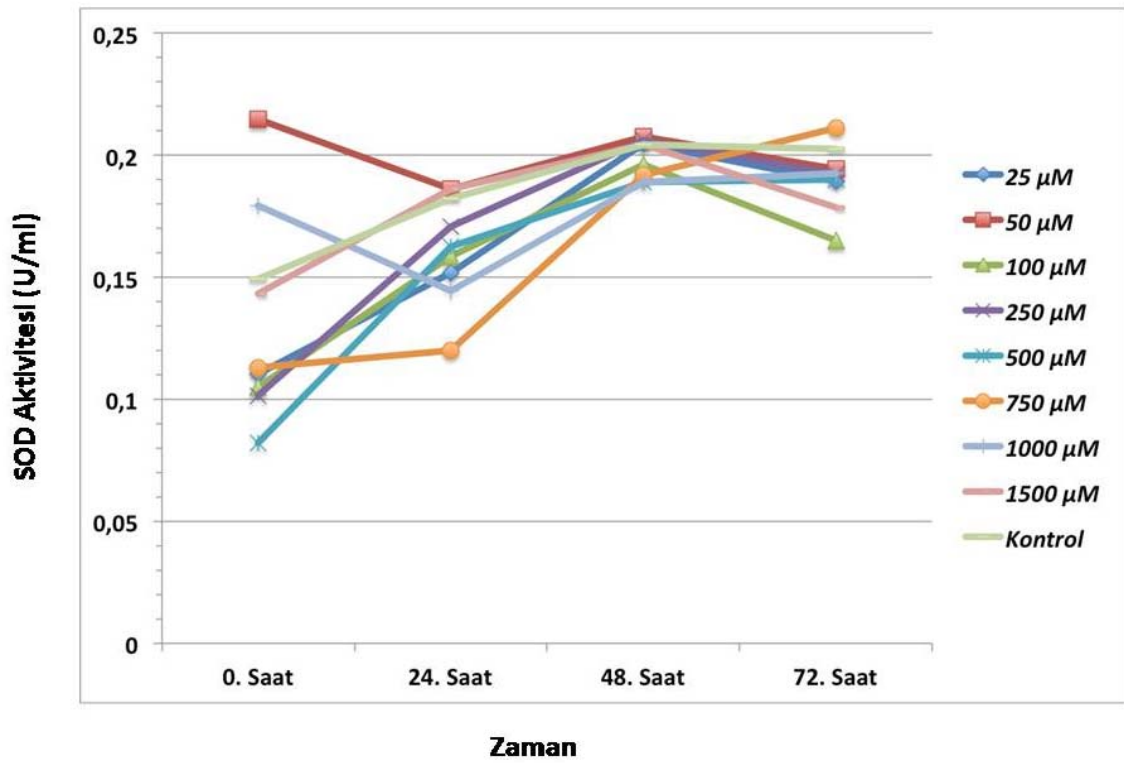
4.3. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 ve 1500 µM ilaç verilen ve kontrol olarak belirlenen kuyucuklardan bazal şartlarda (0. saat) ölçülen süperoksit dismutaz (SOD) değerleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p=0.494$). Yine 24. Saat ($p=0.565$), 48. saat ($p=0.566$) ve 72. saatte ($p=0.659$) ölçülen SOD değerleri farklı ilaç dozları ve kontrol arasında farklılık göstermemiştir.

25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 ve 1500 µM ilaç verilen kuyucukların herbirinden 0., 24., 48. ve 72. saatte ölçülen SOD değerleri karşılaştırıldığında, zamana göre farklılık göstermediği saptanmıştır ($p>0.05$). ASA verilmeyen kontrol grubunda ise 0., 24., 48. ve 72. saatte ölçülen SOD değerleri arasında anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.003$).

Farklı doz ve zamanlarda ölçülen SOD aktivitesi ile ilgili veriler Çizelge 11’de sunulmuştur.

Çizelge 11	0, 24, 48 ve 72 saatte farklı ilaç dozları ve kontrollerde ölçülen SOD aktivitesi (U/ml)				
DOZ	0. saat	24. saat	48. saat	72. saat	p değeri
25 µM (n=2)	0,11026 ± 0,06867	0,15190 ± 0,05561	0,20460 ± 0,15555	0,18910 ± 0,01711	0,241
50 µM (n=2)	0,21464 ± 0,10142	0,18601 ± 0,01054	0,20755 ± 0,01441	0,19408 ± 0,01081	0,896
100 µM (n=2)	0,10485 ± 0,08803	0,15838 ± 0,03368	0,19597 ± 0,14750	0,16485 ± 0,07177	0,615
250 µM (n=2)	0,10149 ± 0,03956	0,17064 ± 0,06477	0,20619 ± 0,00642	0,19199 ± 0,00772	0,241
500 µM (n=2)	0,08213 ± 0,01707	0,16235 ± 0,07035	0,18895 ± 0,03768	0,18990 ± 0,36345	0,241
750 µM (n=2)	0,11296 ± 0,05007	0,11981 ± 0,00704	0,19185 ± 0,00777	0,21092 ± 0,00533	0,145
1000 µM (n=2)	0,17940 ± 0,00339	0,14435 ± 0,04886	0,18885 ± 0,00063	0,19230 ± 0,03295	0,494
1500 µM (n=2)	0,14318 ± 0,09604	0,18600 ± 0,03945	0,20408 ± 0,01482	0,17845 ± 0,00063	0,753
Kontrol (n=16)	0,14913 ± 0,06912	0,18193 ± 0,02845	0,20430 ± 0,01358	0,20253 ± 0,01492	< 0,003
p değeri	0,494	0,565	0,566	0,659	



Şekil 35. Farklı ilaç dozları ve kontrollerde ölçülen SOD aktivitesinin zamanla değişimi

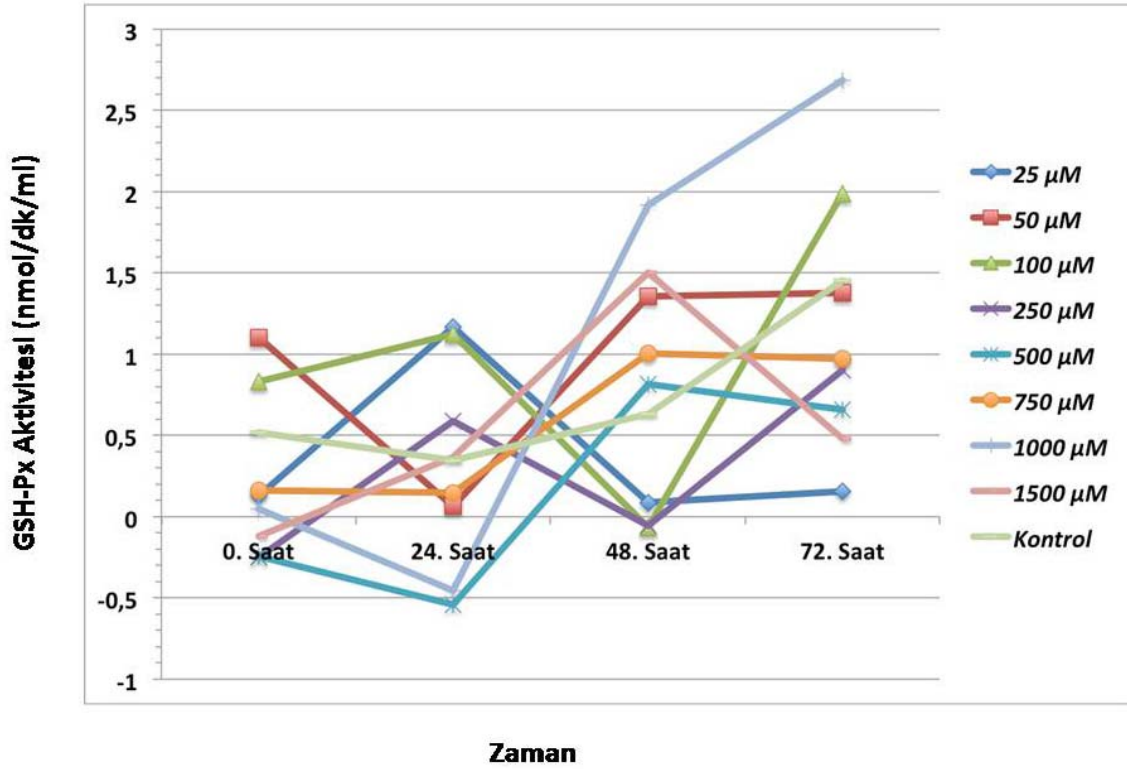
4.4. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 ve 1500 μM ilaç verilen ve kontrol olarak belirlenen kuyucuklardan bazal şartlarda (0. saat) ölçülen glutasyon peroksidaz (GSH-Px) değerleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p=0.624$). Yine 24. Saat ($p=0.513$), 48. saat ($p=0.590$) ve 72. saatte ($p=0.375$) ölçülen GSH-Px değerleri farklı ilaç dozları ve kontrol arasında farklılık göstermemiştir.

25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 ve 1500 μM ilaç verilen kuyucukların herbirinden 0., 24., 48. ve 72. saatte ölçülen GSH-Px değerleri karşılaştırıldığında, zamana göre farklılık göstermediği saptanmıştır ($p>0.05$). ASA verilmeyen kontrol grubunda ise 0., 24., 48. ve 72. saatte ölçülen GSH-Px değerleri arasında anlamlı fark saptanmıştır ($p< 0,02$). (Şekil 32)

Farklı doz ve zamanlarda ölçülen GSH-Px aktivitesi ile ilgili veriler **Çizelge 12'de** sunulmuştur.

Çizelge 12	0, 24, 48 ve 72 saatte farklı ilaç dozları ve kontrollerde ölçülen GSH-Px aktivitesi (nmol/dk/ml)				
DOZ	0. saat	24. saat	48. saat	72. saat	p değeri
25 μM (n=2)	0,130285 $\pm$ 0,276797	1,164839 $\pm$ 4,044800	0,088341 $\pm$ 0,771087	0,158243 $\pm$ 0,434973	1,000
50 μM (n=2)	1,100569 $\pm$ 1,055960	0,063526 $\pm$ 1,020622	1,354878 $\pm$ 0,553523	1,376815 $\pm$ 2,687833	0,896
100 μM (n=2)	0,829307 $\pm$ 2,174858	1,122900 $\pm$ 0,810627	-0,065442 $\pm$ 0,395426	1,989691 $\pm$ 1,799198	0,392
250 μM (n=2)	-0,250178 $\pm$ 0,686040	0,589871 $\pm$ 0,229931	-0,052255 $\pm$ 0,744080	0,900379 $\pm$ 0,105861	0,145
500 μM (n=2)	-0,245208 $\pm$ 0,830400	-0,540780 $\pm$ 0,316345	0,815326 $\pm$ 1,324688	0,661543 $\pm$ 0,790856	0,187
750 μM (n=2)	0,163651 $\pm$ 0,128836	0,148060 $\pm$ 1,093653	1,003614 $\pm$ 0,892688	0,972225 $\pm$ 0,701923	0,187
1000 μM (n=2)	0,046401 $\pm$ 0,039542	-0,456900 $\pm$ 0,316345	1,919788 $\pm$ 2,609826	2,688716 $\pm$ 0,296571	0,145
1500 μM (n=2)	-0,121365 $\pm$ 0,158170	0,367952 $\pm$ 0,217485	1,500373 $\pm$ 1,937598	0,479794 $\pm$ 1,680572	0,615
Kontrol (n=16)	0,519243 $\pm$ 0,821678	0,346849 $\pm$ 0,781278	0,633676 $\pm$ 1,265019	1,451028 $\pm$ 0,89589	< 0,02
p değeri	0,624	0,513	0,590	0,375	



Şekil 36. Farklı ilaç dozları ve kontrollerde ölçülen GSH-Px aktivitesinin zamanla değişimi

4.5. Nitrik Oksit Aktivitesinin Değerlendirilmesi

İlaç verilen ve ilaç verilmeyip kontrol olarak belirlenen kuyucuklardan yapılan analizlerde aktivite azlığı nedeniyle örneklerin önemli bir kısmında kantitatif NO aktivite ölçümü yapılamamıştır. Mevcut ölçümlerden yapılan analizlerde; 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 ve 1500 µM ilaç verilen ve kontrol olarak belirlenen kuyucuklardan bazal şartlarda (0. saat) ölçülen nitrik oksit değerleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p=0.406$). Yine 24. Saat ($p=0.392$), 48. saat ($p=0.392$) ve 72. saatte ($p=0.416$) ölçülen GSH-Px değerleri farklı ilaç dozları ve kontrol arasında farklılık göstermemiştir.

Farklı ilaç dozları verilen ve kontrol örneklerinde elde edilen NO aktivite ölçümlerinin farklı zamanlar arasında farklılık gösterip göstermediğinin analizi veri azlığı nedeniyle yapılamamıştır. Farklı doz ve zamanlarda ölçülen nitrik oksit aktivitesi ile ilgili veriler Çizelge 13’de sunulmuştur.

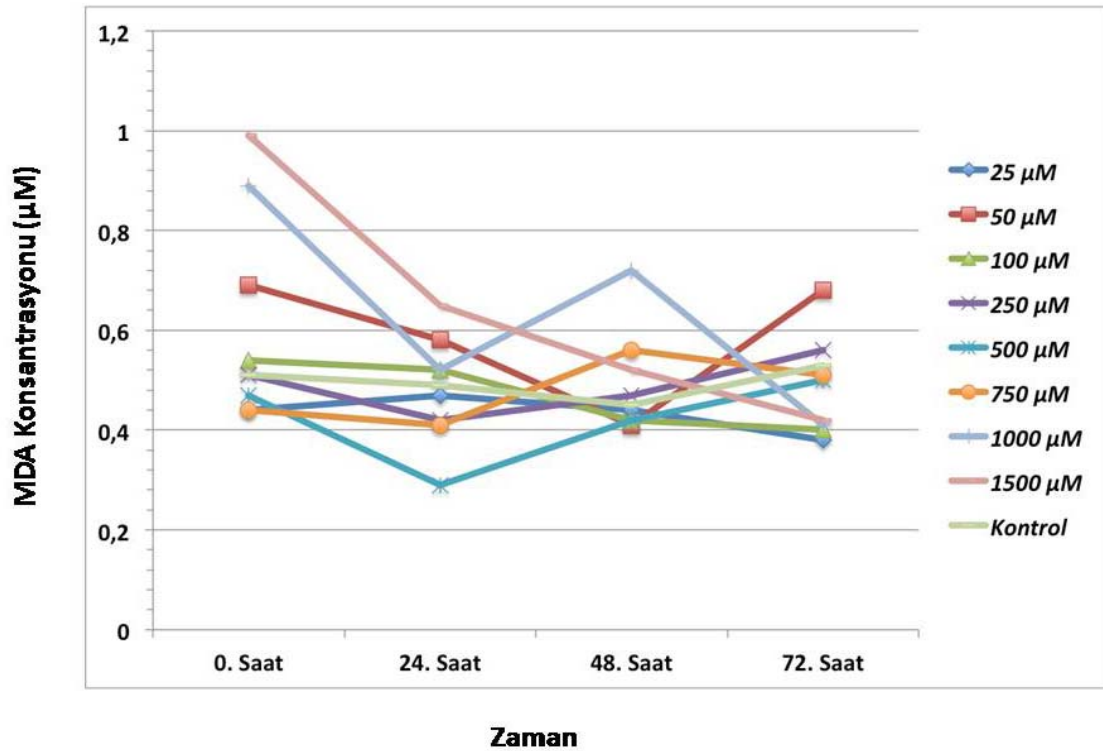
Çizelge 13	0, 24, 48 ve 72 saatte farklı ilaç dozları ve kontrollerde ölçülen NO aktivitesi (µM)			
DOZ	0. saat	24. saat	48. saat	72. saat
25 µM (n=2)	2,350	4,138	3,021	3,759
50 µM (n=2)	-	-	-	3,349
100 µM (n=2)	3,691	3,244	3,244	3,485
250 µM (n=2)	2,126	-	-	-
500 µM (n=2)	3,468	3,691	3,468	3,622
750 µM (n=2)	-	-	-	3,349
1000 µM (n=2)	3,244	3,691	3,759	3,554
1500 µM (n=2)	-	-	-	-
Kontrol (n=16)	-	-	-	-
p değeri	0,406	0,392	0,392	0,416

4.6. Lipid Peroksidaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 ve 1500 µM ilaç verilen ve kontrol olarak belirlenen kuyucuklardan bazal şartlarda (0. saat) ölçülen lipid peroksidaz değerleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (p=0.383). Yine 24. Saat (p=0.362), 48. saat (p=0.425) ve 72. saatte (p=0.477) ölçülen lipid peroksidaz değerleri farklı ilaç dozları ve kontrol arasında farklılık göstermemiştir.

25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500 µM ilaç verilen ve kontrol olarak belirlenen kuyucukların herbirinden 0., 24., 48. ve 72. saatte ölçülen lipid peroksidaz değerleri karşılaştırıldığında, zamana göre farklılık göstermediği saptanmıştır (p>0.05). Farklı doz ve zamanlarda ölçülen lipid peroksidaz aktivitesi ile ilgili veriler **Çizelge 14**'de sunulmuştur.

Çizelge 14	0, 24, 48 ve 72 saatte farklı ilaç dozları ve kontrollerde ölçülen lipid peroksidaz aktivitesi (μM)				
DOZ	0. saat	24. saat	48. saat	72. saat	p değeri
25 μM (n=2)	0,44 $\pm$ 0,01	0,47 $\pm$ 0,01	0,44 $\pm$ 0,10	0,38 $\pm$ 0,01	0,494
50 μM (n=2)	0,69 $\pm$ 0,32	0,58 $\pm$ 0,27	0,41 $\pm$ 0,12	0,68 $\pm$ 0,33	0,562
100 μM (n=2)	0,54 $\pm$ 0,05	0,52 $\pm$ 0,08	0,42 $\pm$ 0,07	0,40 $\pm$ 0,02	0,304
250 μM (n=2)	0,51 $\pm$ 0,18	0,42 $\pm$ 0,03	0,47 $\pm$ 0,15	0,56 $\pm$ 0,14	0,753
500 μM (n=2)	0,47 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,10	0,42 $\pm$ 0,07	0,50 $\pm$ 0,-2	0,180
750 μM (n=2)	0,44 $\pm$ 0,07	0,41 $\pm$ 0,02	0,56 $\pm$ 0,03	0,51 $\pm$ 0,04	0,145
1000 μM (n=2)	0,89 $\pm$ 0,63	0,52 $\pm$ 0,18	0,72 $\pm$ 0,07	0,41 $\pm$ 0,17	0,392
1500 μM (n=2)	0,99 $\pm$ 0,30	0,65 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,27	0,42 $\pm$ 0,22	0,145
Kontrol (n=16)	0,51 $\pm$ 0,10	0,49 $\pm$ 0,12	0,45 $\pm$ 0,11	0,53 $\pm$ 0,13	0,129
p değeri	0,383	0,362	0,425	0,477	



Şekil 37 Farklı ilaç dozları ve kontrollerde ölçülen lipid peroksidaz aktivitesinin zamanla değişimi

5. TARTIŞMA

İçinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle devamlı bir radikal oluşumu vardır. Hücresel koşullarda da önemli miktarda ve çeşitlilikte radikal üretilmektedir. Fizyolojik şartlarda mitokondriyal elektron transport zincirinden, patolojik süreçlerde ksantin oksidaz metabolizmasından, aktive olmuş nötrofillerden, katekolamin oksidasyonundan, endotel hücrelerinden ve prostaglandinlerden serbest radikaller üretilmektedir (Kukreja ve ark.,1986).

Yüksek konsantrasyonlardaki reaktif oksijen türlerinin, hücredeki nükleik asitlerin, lipidlerin ve proteinlerin uğradığı hasarda önemli payı vardır. Serbest radikaller vücutta antioksidan savunma mekanizmasının kapasitesini aştıkları zaman çeşitli hasarlara yol açarlar. Böylece karbonhidrat, lipid, protein, DNA gibi biyomoleküllerle ve diğer hücre komponentleri ile etkileşme özelliği göstererek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olurlar. Serbest oksijen radikallerinin artması, membran poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımına (lipid peroksidasyonuna); ayrıca protein, karbohidrat ve nükleik asit deoksidasyonuna neden olur. Bunun sonucunda çeşitli patolojilere yol açan oksidatif stres oluşur. (Tekkes,2006, Berköz ve ark.,2008, Valko ve ark.,2006, Mates ve ark.,1999).

Reaktif oksijen türlerinden kaynaklanan oksidatif stres, kardiyak ve vasküler myositlerle ilişkili kardiyovasküler doku hasarına sebep olur. Oksidatif stres, ateroskleroz, iskemik kalp hastalıkları, hipertansiyon, kardiyomyopati, kardiyak hipertrofi ve konjestif kalp hastalığı gibi çeşitli kardiyovasküler hastalıklarda önemli rol oynar (Valko ve ark., 2006). Singal ve ark (1983) ve Hess ve ark (1983) yaptıkları in vitro ve in vivo çalışmalarında önemli birçok kalp hastalığının patogeneğinde artmış serbest oksijen radikallerinin önemini ortaya koymuştur.

Kardiyovasküler hastalıkların temelinde ateroskleroz komplikasyonları yer alır (Singh ve Jialal,2006). Aterogenezin erken safhalarında da endotel disfonksiyonu görülür. Hasar gören endotel fonksiyonu birkaç risk faktörüyle birleştiği zaman daha da tehlikeli sonuçlar oluşturur. Endotel disfonksiyonun uzun dönem aterosklerotik lezyonlara zemin hazırlaması bu sonuçlardan biridir, bu durum koroner sendromların tanı ve teşhisinde önemlidir. (Vogiatzi ve ark.,2009).

Özellikle ateroskleroz gibi vasküler sorunların yol açtığı kalp hastalıklarında aspirin tedavisi önemlidir. Hem hiperlipidemi, hipertansiyon, diyabet ve sigara

içiciliğinden bir veya birkaçına sahip risk faktörü olan kişilerde hem de koroner veya diğer vasküler olay (inme, periferik damar hastalığı gibi) geçiren kişilerde aspirin tedavisi tekrarlayan olayları azaltmada etkilidir.

Ateroskleroz ve kardiyovasküler morbidite ve mortalite ile ilişkili olan risk faktörlerin çoğu aynı zamanda endotelial disfonksiyonla da ilişkilidir. Hiperlipidemi, hipertansiyon, diyabet ve sigara içiciliğini içeren çok sayıda risk faktörü, reaktif oksijen ürünlerinin aşırı üretimi ve artmış oksidatif stress ile birliktelik gösterir (Meinertz).

Bu çalışmada, endotel hücrelerine farklı dozlarda aspirin verilerek bu ilacın CAT, SOD, GSH-Px, lipid peroksidaz ve NO aktivitesinde zamana bağlı olarak oluşturduğu değişiklikler ve dozlar arasındaki farklılıklar araştırılmıştır.

Çalışmalarımızda, hücrelere verilecek olan aspirin dozları MTT analizi ile belirlenmiştir (McGahan ve ark., 1995). MTT analizlerinde, kontrol grubuna göre %50 absorbans azalmasına yol açan aspirin dozu sitotoksik doz olarak belirlenmiştir. 0, 24 ve 72. saatte ölçülen analizlerde sitotoksik doz 1500 µM olarak belirlenirken, 48. saatteki ölçümlerde 1000 ve 1500 µM olarak saptanmıştır. Bu sayede MTT analizi ile hücre sayısı da değerlendirilmiştir.

Çalışmalarımızdan elde edilen CAT, SOD ve GSH-Px enzim aktivitesi sonuçları değerlendirildiğinde; kontrol grubunun 0. ve 24. saatlerdeki enzim aktivitesi sonuçları 48 ve/veya 72. saatlerdeki enzim aktivitesi sonuçları ile karşılaştırıldığında ölçülen aktivitede anlamlı artış görülmüştür. 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ve 1500 µM aspirin verilen hücrelerde ölçülen bu üç enzimin aktivitelerindeki zamanla oluşan değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Yalnız 1500 µM aspirin verilen hücrelerdeki CAT aktivitesinde 48 ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı olmayan fakat dikkat çekici bir artış gözlenmiştir. Ayrıca 0, 24, 48 ve 72. saatlerde ölçülen enzim aktiviteleri açısından bakıldığında farklı ilaç dozları verilen gruplar ve kontrol arasında farklılık olmadığı görülmüştür.

Endotel hücre kültüründe zamanla oluşan hücre çoğalması, aynı zamanda ortamdaki serbest radikal miktarını artırmakta ve reaktif olarak antioksidan savunmanın enzimatik göstergeleri olan CAT, SOD ve GSH-Px aktivitelerini artırmaktadır. Bulgularımızda gözlenen aspirin verilmeyen kontrol grubundaki 72 saatteki enzim aktivite artışı bu hipotezle açıklanabilir. 1500 µM aspirin verilen hücrelerin 48 ve 72. saatte CAT aktivitesindeki istatistiksel anlam taşımayan artış, bu

dozun aspirinin beklenen koruyucu etkisinin aksine koruyucu olmayan hatta toksik etkiye yol açan doz olması ile açıklanabilir.

Kontrol gruplarında, enzim aktivitelerindeki zamanla görülen artış, endotel hücrelerinde 1500 µM'ın altında verilen aspirinin koruyucu etkisini düşündürmektedir.

Aspirinin temel etki mekanizması, anahtar enzim siklooksijenazın inaktivasyonu ve sonuçta prostaglandin sentezinin inhibisyonudur. Bu durum analjezik, anti-inflamatuar, antipiretik etkileri ve trombosit agregasyonunun inhibisyonunu açıklamaktadır (Nietsch, 1991). Aspirinin hücre düzeyindeki oksidatif sürece potansiyel faydalı etkilerini gösteren çalışmalarımız, bu süreçle ilişkili klinik düzeyde çok sayıda araştırmayla desteklenmiştir. Grosser ve Henning (2003) çalışmalarında aspirinin NO varlığında endotel hücrelerini oksidatif hasardan koruyarak hücre koruyucu bir görev üstlendiğini gösterirken Taubert ve ark. (2004)'da aspirinin endotel hücrelerinden NO salınımını fazlalaştırdığını bu etkininde süperoksit radikalının dismutasyonunu katalizleyen SOD enziminin aktivitesini arttırdığını belirtmişlerdir.

Bunların yanında aspirinin klasik bilinen platelet inhibisyonuna ek olarak vasküler endotelyumun korunmasını sağladığı, bu nedenle de; oklüzif kardiy ve serebrovasküler hastalıkların önlenmesinde ve aterosklerozun başlangıcında oluşan zararlar üzerinde oldukça etkili olduğu gösterilmiştir (Watala ve Gwozdowski, 1993).

Aspirin, prostaglandin üretimini engellemenin yanı sıra vitamin-K antagonizması, trombin üretimini azaltması ve pıhtılaşma faktörlerini asetillemesiyle kardiyovasküler hastalıkları önlemektedir. Ayrıca, LDL kolesterolün oksidasyonunu önleyerek antioksidan etki gösterir, aterosklerotik plakta inflamasyonu azaltır ve endotel bütünlüğüne katkıda bulunur (Aktürk ve ark., 2005).

Podhaisky ve ark.(1997) çalışmalarında, oksidatif stresin kardiyovasküler risk faktörü ve aterogeneze sırasında endotelial hasarın önemli kaynağı olduğunu ve nötrofil ve monositlerden salınan oksijen radikallerinin direk olarak endotelyuma hasar verdiğini göstermişlerdir. Ayrıca aspirinin endotel bütünlüğünü sağladığını bu nedenle de oksidatif stres altında bulunan endotelin antitrombotik ve antiaterojenik fonksiyonlarını koruduğunu belirtmiştir. Klinik çalışmalar; düşük doz aspirinin vasküler homeostazın temeli olan endotel bağımlı arteriyal relaksasyonu sağladığını göstermiştir (Taubert ve ark., 2004).

Aspirinin metal bağlama özelliği de belirlenmiştir. Bu özelliği ile oksijen radikalleri oluşum bölgesinden demir iyonlarını çekebilir. Bu nedenle hidrojen peroksit bağımlı hücre hasarıyla karşılaştırma yapıldığında aspirin 10 kat daha güçlü hücre koruyucusu gibi davrandığı da öne sürülmüştür (Podhaisky ve ark.,1997).

Hidrojen peroksit maruz kalan endotel hücrelerinin canlılıklarında azalma olmasına dair kanıtlar bulunmaktadır. Aspirin ile ilgili yapılan çalışmalar, aspirinin (3-30 µmol/L) konsantrasyona bağlı olarak hücreleri sitotoksiteden koruduğunu göstermiştir. Bu da aspirinin hidrojen peroksitin zararlı etkisinden endotel hücrelerini koruma kapasitesi ve serbest radikal kovucu özellikleri olduğunu gösterir (Grosser ve Schröder,2003).

Oksijen radikallerinin doymamış lipidlerle reaksiyon gösterip membranlardaki lipid peroksidasyon reaksiyonlarının başlamasına sebep olmaktadır. Serbest radikaller bunun yanında, proteinlerdeki sülfidril gruplarının ve nükleik asitlerdeki iplikçiklerin oksidasyonuna neden olurlar. Serbest oksijen radikallerinin membran lipidleriyle etkileşmesi zincirleme reaksiyonlarla devam eden lipid peroksidasyonunu başlatarak; membran yapısının bozulmasına, permeabilite artışına, hücrenin iyon gradyentinin sürdürülememesine ve doku hasarına yol açabilir (Akpoyraz ve Durak,1995,Chuanyu ve Jackson,2002,Selçuk ve ark.,1996). Lipid peroksidasyonu bir zincir tepkimesi şeklinde başlayıp, daha ileri peroksidasyonu başlatacak serbest radikaller için kesintisiz bir kaynak oluşturur. Kendi kendini devam ettiren bu zincir reaksiyonlarının hücre membranına hasarı geri dönüşümsüzdür. Hücre membranında meydana gelen lipid peroksidasyonu, membran lipoproteinlerinin oksidasyonu ve yapısal bütünlüğün bozulmasına yol açar, anormal iyon girişiyle birlikte hücre ölümüne neden olur. Bu olayın kontrol edilememesi halinde oluşan zincir reaksiyonları ile hücre ölümünün yayılması ortaya çıkar (Tekkes,2006). Sonuçta, hücre membranı yarı geçirgen özelliğini kaybeder. Hücre zarında yer alan ve taşımada görevi bulunan enzim sistemleri görevlerini yapamaz. Böylece, gerek aktif transport gerekse diğer taşıma sistemleri ile hücre içine giren veya hücre dışına çıkan çeşitli bileşikler, inorganik maddeler ve elektrolitlerin hücre içi ve dışı yoğunluğu değişir. Bütün bu olaylar, hücrelerde geriye dönüşümü güç olan hasarlar meydana getirir ve bu durum hücrenin ölümüne kadar gidebilir (Tufan,2008).

Aspirinin antioksidan etkilerle vasküler tonusu azalttığı ve lipid peroksidasyonunu baskıladığı klinik düzeyde gösterilmiştir (Grosser ve Schröder,2003). Bu durumla ilişkili olarak, hücre düzeyinde yapmış olduğumuz

çalışmamızın verilerine göre, kontrol grubunda ve farklı dozlarda aspirin verilen hücrelerde 0, 24, 48 ve 72. saatte ölçülen lipid peroksidaz aktivitesinde farklılık saptanmamıştır. Ayrıca hem kontrol grubunda hem de farklı aspirin dozları verilen hücrelerde lipid peroksidaz aktivitesinde zamana bağlı değişiklik görülmemiştir.

Patolojik durumlarda NO ve oksijen radikallerinin yapımı eş zamanlı olarak gerçekleşir; ya da bir radikal türünün neden olduğu etkiler diğer radikal türün yapımını da hızlandırır (Kılınç ve Kılınç,2003). Oksitleyici özelliği nedeniyle, biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'nin derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan CAT ve GSH-Px enzimleri yerine getirir (Yurdakul,2003,Tekkes,2006).

Endotel hücreleri tarafından sentezlenen NO, difüzyonla düz kas hücrelerine geçerek guanilat siklazı aktive edip, cGMP seviyesini artırır ve düz kaslarda gevşemeyi temin eder. Kalsiyum pompalarının sitoplazmik kalsiyum derişimini düşürmesi ile eNOS aktivasyonu sona ereceğinden; eNOS tarafından kısa sürede ve düşük derişimde NO sentezi sağlanır (Kılınç ve Kılınç,2003). Kültürdeki endotel hücreleri bir fiziksel ve kimyasal stimulasyondan sorumlu NO'ı spontan olarak salarlar. Bununla birlikte NO salınımı asetilkoline karşı değildir, bunda sebebinin asetilkolin reseptörlerinin kaybı veya hücre kültüründe reseptör-efektör etkisinin kaybı olduğu sanılmaktadır (Calver ve ark.,1993).

Kan damarlarında süperoksit radikali konstitütif olarak devamlı sentezlenir. Böylece süperoksit kan damarlarında NO derişimini kontrol ederek onun vazodilatör etkisini düzenler. Kan damarlarında SOD enziminin dietilditiyokarbamat ile inhibe edilmesi durumunda süperoksit derişimi on katına çıkar ve NO bağımlı relaksasyon inhibe olur. Çeşitli vasküler hastalıklarda süperoksit yapımının artması ile SOD enziminin kapasitesi aşılabildiğinden; nitrik oksit, süperoksit tarafından inaktive edilir. Böylece normal seviyelerde üretilen süperoksit NO derişimini, dolayısıyla etkisini kontrol ederken; patolojik durumlardaki yüksek derişimi hem NO'nin fonksiyonlarını önler, hem de oluşan oksidan tür (peroksinitrit) nedeniyle oksidatif hasarlara neden olur (Kılınç ve Kılınç,2003).

Endotel kaynaklı NO farklı organlarda kan basıncı, kan akımı ve vasküler tonusun fizyolojik olarak düzenlenmesinde rol oynar. NO salınımı farklı reseptör bağımlı (asetilkolin, bradikinin, histamin, adenin nükleotidler ve serotonin) ve bağımsız (serbest yağ asitleri) agonistlerce uyarılabilir. Endotel hücreleri dolaşımdaki

kan tarafından endotele oluşturulan fiziksel bası kuvvetini biyokimyasal sinyallere dönüştürür (Gross,1995)

Aspirindeki asetil grubu eNOS'un sentezini ve yararlılığını artırır (Bulckaen ve ark., 2008). Bu da NO ile oluşan hücre korunmasını sağladığını gösterir. Aspirin gibi NO'de endotel hücrelerinin H_2O_2 ve diğer oksidan ajanlara duyarlılığını azaltır. Hem aspirin hem de NO'in endotel hücreleri üzerinde uzun dönem koruyucu etkisi mevcuttur (Grosser ve Schröder,2003).

Çalışmamızda, aspirin verilen ve kontrol olarak belirlenen hücrelerde yapılan analizlerde aktivite azlığı nedeniyle örneklerin önemli bir kısmında kantitatif NO aktivite ölçümü yapılamamıştır. Mevcut ölçümlerden yapılan analizlerde; farklı doz aspirin verilen ve kontrol olarak belirlenen kuyucuklardan 0, 24, 48 ve 72. saatte ölçülen NO değerleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Farklı ilaç dozları verilen ve kontrol örneklerinde yapılan NO aktivite ölçümlerinin farklı zamanlar arasında farklılık gösterip göstermediğinin analizi veri azlığı nedeniyle yapılamamıştır.

Çalışmamızın en önemli kısıtlılığı, NO gibi bazı verilerin değerlendirilmesini ya da beklenen anlamlılık düzeyinin çıkmasını engelleyen özellikle farklı aspirin dozlarına ilişkin örneklerin azlığıdır.

6. SONUÇLAR

1. Aspirin verilmeyen endotel hücrelerde zamanla (48. saatten sonra) hücre sayısının fazlalaşmasından dolayı ortamdaki serbest radikal oluşumunun artmasından kaynaklı antioksidan enzim aktivitesinde artış görülmüştür.
2. 1000 μ M üzerinde aspirin verilmesi hücrelerin sayısında azalmaya sebep olacak düzeyde toksik etki yapmıştır
3. 1000 μ M ve altında aspirin verilmesi zamanla artan reaktif antioksidan enzim aktivitesindeki artışı engellemiştir.
4. Bu sonuç 1000 μ M ve altında aspirin verilmesinin hücre koruyucu etkisi olabileceğini düşündürmüştür.
5. Çalışmada endotel hücrelerinden salınan NO konsantrasyonu miktarının azlığı nedeniyle aspirinin hücrelerden NO salınımı üzerine zamanla etkisi olup olmadığı değerlendirilememiştir.
6. Farklı aspirin dozları ve kontroller arasındaki lipid peroksidaz aktivitesinde fark saptanmamış olup, aspirin verilmesinin lipid peroksidaz aktivitesinde zamanla ilişkili etkisinin olmadığı görülmüştür.

7. KAYNAKLAR

- AKÇAKOYUN, M. 2004. Koroner Arter Hastalığı Olgularında Koroner Risk Faktörleri İle Endotel Fonksiyonları Arasındaki İlişki. Koşuyolu Kalp Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kardiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, İstanbul.
- AKKOÇ, H. 2008. Miyokardiyal İskemi Reperfüzyon Hasarı. Dicle Tıp Dergisi., 35(3);211-215.
- AKKUŞ, İ. 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, 38, Kuzucular Ofset, Konya.
- AKPOYRAZ, M., DURAK, İ. 1995. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri. Ankara Tıp Mecmuası., 48:253-262.
- AKTÜRK, E., TOPAL, E., AKSOY, Y. 2005. Aspirin Direnci. Türk Kardiyoloji Derneği., 33:480-487.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. 2008. Hücrenin Moleküler Biyolojisi. Tuba Yayınları, 4. Baskı, Ankara.
- ANGEL, L, O., MENA, S., ESTRELA, M, S. 2010. Oxidative and Nitrosative Stress in the Metastatic Microenvironment. Cancers., 2(2);274-304.
- ANTMEN, E, Ş. 2005. Beta Talasemide oksidatif Stres. Çukurova Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Adana.
- ARUOMA, I, O. 1998. Free Radicals, Oxidative Stress and Antioxidants in Human Health and Disease. JAOCS., 75(2):199-212.
- ATALIK, E, K., DOĞAN, N. 1997. Nitrik Oksit ve Fizyolojik Etkileri. Genel Tıp Dergisi., 7(3):167-9.

- BALCI, N., 2007. Sürekli Gürültüye Maruz Kalınan Bazı İş Kollarında Çalışan Kişilerde Serum Total Sialik Asit, Ksantin Oksidaz, Malondialdehit, Nitrik Oksit, Arginaz ve Ornitin Değerleri. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş.
- BERKÖZ, M., YALIN, S., GÜLER, G, V., YALÇIN, A. 2008. Akut Lösemililerde Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Enzim Aktivitesi. Erciyes Tıp Dergisi., 30(3):157-162.
- BONETTI, O, P., LERMAN, O, L., LERMAN, A. 2003. Endothelial Dysfunction: A Marker of Atherosclerotic Risk. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology., 23;168-175.
- BULCKAEN, H., PRÉVOST, G., BOULANGER, E., ROBÎTAILLE, G., ROQUET, V., GAXATTE, C., GARÇON, G., CORMAN, B., GOSSET, P., SHİRALİ, P., CREUSY, C., PUISIEUX, F. 2008. Low-Dose Aspirin Prevents Age-Related Endothelial Dysfunction in a Mouse Model of Physiological Aging. AJP- Heart and Circulatory Physiology., 294;1562-1570.
- BURGNER, D., ROCKETT, K., KWIATKOWSKI, D. 1999. Nitric Oxide and Infectious Disease. Arch Dis Child ., 81:185–188.
- CAI, H., HARRISON, G, D. 2000. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. Circulation Research., 87;840-844.
- CALVER, A., COLLIER, J., VALLANCE, P. 1993. Nitric oxide and cardiovascular Control. Experimental Physiology., 78;303-326.
- CANKURTARAN, M., KIYKIM, A. 2002. Sepsiste Renal Hemodinami ve Mediyatörler. Erciyes Tıp Dergisi., 24(4):202-208.
- CHIANG, N., BERMUDEZ, A, E., RIDKER, M, P., HURWITZ, S., SERHAN, N, C. 2004. Aspirin triggers antiinflammatory 15-epi-lipoxin A4 and inhibits thromboxane in a randomized human trial. PNAS., 101(42);15178-15183.

- DAVIGNON, J., GANZ, P. 2004. Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation.*, 109;III-27-III-32.
- DEMİR, M. 2007. Antitrombositer Tedavi. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, Temel Hemostaz Tromboz Kursu.
- DEMİRCAN, G. 2005. Glukoz-İnsülin-Potasyum (GİK) İnfüzyonu Uygulanmış Dilate Kardiyomiyopatili Hastalarda Radikal Süpürücü Enzim Aktivitelerinin Araştırılması. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Samsun.
- DÜNDAR, Y., ASLAN, R. 2000. Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar. Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, 29, Afyon.
- ERNSTER, L., DALLNER, G. 1999. Biochemical, Physiological and Medical Aspects of Ubiquinone Function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA).*, 1271(1):195-204.
- ESPEY, M., MIRANDA, M, K., THOMAS, D, D., XAVIER, S., CITRIN, D., VITEK, P, M., WINK, A, D. 2002. A Chemical Perspective on the Interplay Between NO, Reactive Oxygen Species, and Reactive Nitrogen Oxide Species. *Annual New York Academy of Science.*, 962;195-206.
- FLEMING, I., BUSSE, R. 1999. NO: The Primary EDRF. *Journal Molecular Cell Cardiology.*, 31;5-14.
- FREI, B., STOCKER, R., ENGLAND, L., AMES, BN. 1990. Ascorbate: The Most Effective Antioxidant in Human Blood Plasma. *Advanced Experimental Medicine and Biology.*, 264:155-163.
- FRIDOVICH, I. 1978. The Biology of Oxygen Radicals. *Science.*, 201:875-880.
- GRIENDLING, K, K., SORESCU, D., FUKAI-USHIO, M. 2000. NAD(P)H Oxidase: Role in Cardiovascular Biology and Disease. *Circulation Research.*, 86;494-501.

- GROSS, S, S. 1995. Nitric Oxide: Pathophysiological Mechanism. *Annual Review of Physiology.*, 57;737-769.
- GROSSER, N., SCHRÖDER, H. 2003. Aspirin Protects Endothelial Cells From Oxidant Damage Via The Nitric Oxide-cGMP Pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.*, 23;1345-1351.
- GUTTERIDGE, M, C, J. 1995. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clinical Chemistry.*, 41(12):1819-1828.
- HALLIWELL, B. 1994. Free radicals, Antioxidants and Human Disease: Curiosity, Cause or Consequence?. *The Lancet.*, 344:721-724.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, C, M, J. 1984. Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metals and Disease. *Biochemical Journal.*, 219:1-14.
- HESS, M, L., KRAUSE, S., KONTOS, H, a. 1983. Mediation of Sarcoplasmic Reticulum Disruption in the Ischemic Myocardium: Proposed Mechanism by the Interaction of Hydrogen Ions and Oxygen-Free Radicals. *Adv Exp Med Biol.*, 161;377-389.
- HITOMI, H., KIYOMOTO, H., NISHIYAMA, A. 2007. Angiotensin II ve Oksidatif Stres. *Current Opinion in Cardiology.*, 2(3);150-156.
- KARGIN, F., FİDANCI, R, U. 1997. Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidatif Hasar. *Türk Veteriner Hekimliği Dergisi.*, 9(2):26-28.
- KATUSIC, S, Z. 2007. Mechanism of Endothelial Dysfunction Induced by Aging: Role of Arginase I. *Circulation Research.*, 101;640-641.
- KILIÇ, H. 2006. Aort Kapak Sklerozu ile Sistemik Endotel Disfonksiyonu Arasındaki İlişkinin Araştırılması. Dr. Siyami Ersek Göğüs Kalp ve Damar Cerrahisi Merkezi, Kardiyoloji Uzmanlık Tezi, İstanbul.
- KILINÇ, A., KILINÇ, K. 2003. Nitrik Oksit Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri. Palme Yayıncılık, 245, Ankara.

- KINNULA, L, V., PÄÄKKÖ, P., SOINI, Y. 2004. Antioxidant Enzymes and Redox Regulating Thiol Proteins in Malignancies of Human Lung. FEBS Letters., 569(2004):1-6.
- KIRKPANTUR, A., ALTUN, B. 2006. Endotel Disfonksiyonu ve Hipertansiyon. Türk Kardiyoloji Dergisi., 9:55-61.
- KNAPEN, M, F, C, M., ZUSTERZEEL, P, L, M., PETERS W, H, M., STEEGERS, E, A, P. 1999. Glutathione and Glutathione-Related Enzymes in Reproduction. European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology., 82(2):171-184.
- KOCA, H, B., 2007. Koroner Arter Hastalarında Lipid ve Protein Oksidasyonu ile Selenyum İçeren Antioksidanların Düzeyi. Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Afyonkarahisar.
- KUKREJA, R, C., KONTOS, H, A., HESS, M, L., ELLIS, E, F.1986. PGH Synthase and Lipooxygenase Generate Superoxide in the Presence of NADH or NADPH. Circulation Research.,59;612-619.
- LANDMESSER, U., HORNING, B., DREXLER, H. 2004. Endothelial Function: A Critical Determinant in Atherosclerosis?. Circulation.,109;II-27-II-33.
- LI, CHANYU., JACKSON, M, R. 2002. Reactive Species Mechanisms of Cellular Hypoxiareoxygenation Injury. Am J Physiol Cell Physiol., 282:227-241.
- MACHLIN, J, L., BENDICH, A. 1987. Free Radical Tissue Damage: Protective Role of Antioxidant Nutrients. The FASEB Journal., 1(6):441-445.
- MADAMANCHI, R, N., VENDROV, A., RUNGE, S, M. 2005. Oxidative Stress and Vascular Disease. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology., 25;29-38.
- MATES, M, J., PEREZ-GOMEZ, C., DE CASTRO, N, I. 1999. Antioxidant Enzymes and Human Disease. Clinical Biochemistry., 8:595-603.

- MATES, M, J., SANCHEZ-JIMENEZ, M, F. 1999. Role of Reactive Oxygen Species in Apoptosis: Implications for Cancer Therapy. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology., 32(2000):157-170.
- McGAHON, A, J., MARTIN, S, J., BISSONNETTE, R, P., MAHBOUBI, A., SHI, Y., MOGIL, R, J., NISHIOKA, W, K., GREEN, D, R., 1995. The End of the (cell) Line:Methods for the Study of Apoptosis in vitro, Schwartz, L, M., Osborne, B, A.,(Ed) : Methods in Cell Biology, Cell Death., Academic Press., 49;150-181.
- MEINERTZ, T. Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction:Risk Markers for Future Cardiovascular Events?. The European Cardiologist-Journal By Fax.
- MURRAY, R.K., GRANNER, D.K., MAYES, R.A., RODWELL, V.W. 1996. N. DİKMEN, T. ÖZGÜNEN. Harper'ın Biyokimyası, Yirmidördüncü baskı, Barış Kitabevi, İstanbul.
- NEDELJKOVIC, S, Z., GOKCE, N., LOSCALZO, J. 2003. Mechanism of oxidative stress and vascular dysfunction. Postgrad Med J., 79:195-200.
- NEGORO, M., WAKABAYASHI, I. 2005. Enhancement of Alcohol Dehydrogenase Activity In Vitro By Acetylsalicylic Acid. European Journal Of Pharmacology., 532(1-3);25-28.
- NIETSCH, P. 1991. Aspirinin Terapötik Uygulamaları. Bayer Türk Kimya Sanayi Ltd. Şti., İstanbul.
- ÖZDOĞU, H., İnflamasyonda Bir Baş Aktör: Endotel. Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıklar/Hematoloji Anabilim Dalı., 6. İlk Basamak Kursu, Ankara.
- PODHAISKY, P-H., ABATE, A., POLTE, T., OBERLE, S., SCHRÖDER, H. 1997. Aspirin Protects Endothelial Cells From Oxidative Stress-Possible Synergism With Vitamin E. Federation of European Biochemical Societies., 417:349-351.

- POLAT, M., YALÇIN, A, A. 2008. Anjiyotensin II Reseptör Blokerlerinin Klinik Kullanımı. Güncel İç Hastalıkları Dergisi., 1(1):13-22.
- SAYIN, O., ARSLAN, N., GÜNER, G. 2008. Resveratrol ve Kardiyovasküler Sistem. Türk Biyokimya Dergisi., 33(3);117-121.
- SELÇUK, Y, N., YAKAN, B., SAN, A., BAŞOĞLU, M., TONBUL, Z., KIZILTUNÇ, A., GÜNDOĞDU, C. 1996. Deneysel Sıcak Renal İskemi ve Reperfüzyonda Lipid Peroksidasyonu ve Alpha-Tocopherol Tedavisinin Değerlendirilmesi. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi., 1:5-10.
- SIES, H. 1999. Glutathione and Its Role in Cellular Functions. Free Radical Biology & Medicine., 27(9/10):916-921.
- SIES, H., STAHL, W., SUNDQUIST, R, A. 1992. Antioxidant Functions of Vitamins. Annals New York Academy of Sciences., 669:7-20.
- SINGAL, P, K.,BEAMISH, R, E., DHALLA, N, S. 1983. Potential Oxidative Pathways of Catecholamines in the Formation of Lipid Peroxidase and Genesis of Heart Disease. Adv Exp Med Biol., 161;391-401.
- SINGH, P, R., SHARAD, S., KAPUR, S. 2004. Free Radicals and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Relevance of Dietary Antioxidants. Journal, Indian Academy of Clinical Medicine., 5(3):218-225.
- SINGH, U., JIALAL, I. 2006. Oxidative Stress and Atherosclerosis. Journal Pathophysiology., 13:129-142.
- SÖĞÜT, İ. 2008. Değişik Dozlarda Etanol ve Aspirinin Birlikte Kullanımının Rat Beyin Sinaptozomları Üzerine Olan İn Vitro Etkisi ve Betain'in Olası Koruyucu Rolünün Araştırılması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.
- TAUBERT, D., BERKELS, N., GROSSER, H., SCHRÖDER, D., SCHÖMING, G&E. 2004. Aspirin induces nitric oxide release from vascular endothelium: a novel mechanism of action. British Journal of Pharmacology., 143;159-165.

- TEKKES, Y. 2006. Streptozotosin ile Diabet Oluşturulmuş Farelerde Aspirin ve E Vitamininin Dokularda Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Sisteme Etkisinin Araştırılması. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş.
- TORUN, E., BAYRAM, F. 2004. Endokrin Bir Organ Olarak Endotel ve Endotelinin Hipertansiyondaki Rolü. Erciyes Tıp Dergisi., 26(3):126-131.
- TUFAN, A. 2008. Buzağı Koksidiozisinde Lipid Peroksidasyon Düzeyi ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri. Erciyes Üniversitesi, Veteriner İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Yüksek Lisans tezi, Kayseri.
- VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, T, D, M., MAZUR, M., TELSER, J. 2006. Free Radicals and Antioxidants in normal physiological functions
- VOGIATZI, G., TOUSOULIS, D., STEFANADIS C. 2009. The Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis. Hellenic Journal of Cardiology., 50:402-409.
- WATALA, C., GWOŹDZIŃSKI, K.1993. Effect of Aspirin on Conformation and Dynamics of Membrane Proteins in Platelets and Erythrocytes. Biochemical Pharmacology., 45(6):1343-1349.
- WIGHT, E., NOLL, G., LÜSCHER, F, T. 1997. Regulation of Vascular Tone and Endothelial Function and Its Alterations in Cardiovascular Disease. Bailliere's Clinical Anaesthesiology., 11(4):531-560.
- WOLFE, M, M., LICHTENSTEIN, R, D., SINGH, G. 1999. Gastrointestinal Toxicity of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. The New England Journal of Medicine., 340(24):1888-1899.
- YANBEYİ, S. 1999. Aspirin ve Antioksidant Butylated Hydroxyanisole'ün Tavşanlarda Eritrosit Total Katalaz, Süperoksit Dismutaz ve Glutasyon Peroksidaz Aktiviteleri

Üzerine Etkileri. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Samsun.

YOUNG, S. I., WOODSIDE, V. J. 2001. Antioxidants in Health and Disease. J. Clinical Patholgy., 54:176-186.

YURDAKUL, Z. 2003. Oksijen ve Canlılar. Seminer.

YÜCEL, D., ŞENEŞ, M., TOPKAYA, Ç. B., ZENGİ, O. 2006. Oxidative/Nitrosative Stress in Chronic Heart Failure: A Critical Review. Turkish Journal of Biochemistry., 31(2); 86-95.

ÖZGEÇMİŞ

27.01.1979 tarihinde Almanya-Linz’de doğdum. İlkokulu Samsun Cumhuriyet İlkokulu, ortaokulu Samsun 23 Nisan İlköğretim Okulu, liseyi Samsun yabancı dil ağırlıklı Mithat Paşa Lisesi’nde okudum. 1997 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nü kazandım. 2001 yılında üniversite eğitimimi tamamladım. Aynı yıl Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde yüksek lisans yapma hakkı kazandım. 2002 şubat ayında yüksek lisans öğrenimime başladım. 2001 Aralık – 2004 Temmuz tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji Laboratuvarında biyolog olarak görev yaptım. 2005 Şubat ayında yüksek lisans öğrenimimi tamamlayıp aynı yıl Eylül ayında doktora eğitimime başladım. 2006 Aralık ayında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladım. Halen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktayım. Evliyim, bir kızım ve bir oğlum var.