

**ASKORBİK ASİDİN HÜCRE YAŞLANMASI ÜZERİNE
ETKİSİ**

Nihal ALEM

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HAZİRAN 2007
ANKARA**

Nihal ALEM tarafından hazırlanan ASKORBİK ASİDİN HÜCRE YAŞLANMASI ÜZERİNE ETKİSİ adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylım.



Yrd. Doç. Dr. Barbaros BALABANLI
Tez Yöneticisi

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile BİYOLOJİ Anabilim Dalında Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Nurten TÜRKÖZKAN

Üye : Prof. Dr. Selma ATEŞ

Üye : Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU

Üye : Prof. Dr. Zekiye SULUDERE

Üye : Yrd. Doç. Dr. Barbaros BALABANLI

Tarih : 02/07/2007

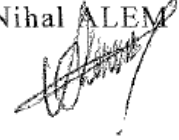
Bu tez, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.



TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Nihal ALEM



ASKORBİK ASİDİN HÜCRE YAŞLANMASI ÜZERİNE ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Nihal ALEM

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2007

ÖZET

Serbest oksijen radikalleri çeşitli hastalıkların patogeneğinde ve yaşlanma sürecinde rol oynayan kararsız, yüksek reaktiviteli moleküllerdir. Serbest oksijen moleküllerinin yanı sıra başta nitrik oksit (NO) olmak üzere reaktif nitrojen türleri de hücrelerin lipit, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederek hücrelerin yapı ve işlevlerini bozmaktadırlar. Lipit peroksidasyonu, hücrelerde ve dokularda serbest radikallerin meydana getirdiği oksidatif stresin bir göstergesidir. Lipit peroksidasyonu seviyelerinin ölçülmesinde bir peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA) kullanılmaktadır. Serbest radikallerin hücrelerde meydana getirdiği bu değişiklikler, hücre yaşlanmasındaki önemli faktörlerden biridir. Askorbik asit (AA) ise özellikle süperoksit ve hidroksil radikalleri ile reaksiyona girerek serbest radikallerin hücrelerde oluşturduğu hasarı önleyebilen güçlü bir antioksidandır.

Bu çalışmada farklı AA konsantrasyonlarının hücre metabolizması üzerindeki etkisinin ve hücre yaşlanmasına yol açan oksidatif stresle mücadelede AA'nın rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçlar doğrultusunda fibroblast hücre kültürlerine (L-929 cell line) 100-1000 µM arasında değişen farklı konsantrasyonlarda AA, 100 nM bir NO inhibitörü olan N-Nitro-L-Arjinin Metil Ester (L-NAME) ve 1 mM H₂O₂ uygulanmış ve bu hücre kültürlerinde NO düzeyleri spektrofotometrik olarak, AA ve MDA seviyeleri ise HPLC'de ölçülmüştür.

Sonuç olarak AA, oluşturulan tüm gruplarda doz bağımsız olarak NO miktarını azaltmıştır. AA ve L-NAME birlikte uygulandığında bu iki bileşimin birbirlerinin etkilerini sadece düşük dozlarda antagonize ettiği tespit edilmiştir. H₂O₂'nin ise MDA seviyelerini arttırdığı, oksidatif stresi önlemeye çalışan AA seviyelerini ise azalttığı saptanmıştır.

Bilim Kodu:203.1.020

Anahtar Kelimeler:Nitrik oksit, Askorbik asit, MDA,Hücre kültürü

Sayfa Adeti:59

Tez Yöneticisi:Yrd.Doç.Dr.K.Barbaros BALABANLI

**THE EFFECT OF ASCORBIC ACID ON CELL AGING
(M.Sc.Thesis)**

Nihal ALEM

**GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

June 2007

ABSTRACT

Free oxygen radicals are highly reactive and unstable molecules which play role in aging and pathogenesis of various diseases. Free radicals and reactive nitrogen species especially nitric oxide (NO) effect to all important cell compounds such as lipids, DNA, proteins, enzymes and these species impair cell structure and function. These changes that are occurred by free radicals are very important factors for cell aging.

Ascorbic acid (AA) is a powerful antioxidant that reacts with especially superoxide and hydroxyl radicals and prevents the formation of free radicals in cell. In this study, it is aimed to research the metabolism of AA on cells in various concentrations and the role of AA on preventing oxidative stres which causes cell aging.

In this direction, L-929 fibroblast cell cultures were applied different concentrations of AA, a NO inhibitor N ω -Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and H₂O₂. NO levels were measured by

spectrophotometer, AA and MDA levels were measured by HPLC in these cell cultures.

As a result, AA decreased the amounts of NO in a dose-independent manner in all groups. We determined that when AA and L-NAME were applied together, these two compounds antagonised the effects of each other only in low doses. H₂O₂ increased MDA levels and decreased AA.

Science Code: 203.1.020

Key Words: Nitric oxide, Ascorbic acid, MDA, Cell culture

Page Number: 59

Adviser: Ass. Professor K. Barbaros BALABANLI

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren hocam Yrd.Doç.Dr.K.Barbaros BALABANLI'ya, ayrıca yardım ve desteklerini esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma teőekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Serbest Radikaller.....	3
2.1.1. Serbest radikal türleri.....	4
2.1.2. Serbest radikallerin kaynakları.....	8
2.1.3. Hücrelerde serbest radikal üretimi.....	9
2.1.4. Serbest radikallerin biyolojik etkileri.....	12
2.2. Lipit Peroksidasyonu.....	14
2.3. Nitrik Oksit.....	15
2.3.1. Nitrik oksidin biyosentezi ve nitrik oksit sentaz enzimleri.....	16
2.3.2. Nitrik oksidin tepkimeleri.....	18
2.3.3. Nitrik oksidin biyolojik fonksiyonlara etkileri.....	18
2.4. Hücre Döngüsü.....	20

Sayfa

2.5. Yaşlanma.....	22
2.5.1. Serbest radikaller ve yaşlanma.....	23
2.5.2. Mitokondrial DNA’da oksidatif hasar ve yaşlanma.....	24
2.5.3. Telomer uzunluğu ve yaşlanma arasındaki ilişki.....	25
2.6. Hücre Ölümü.....	26
2.6.1. Apoptoz.....	26
2.6.2. Nekroz.....	30
2.6.3. Apoptoz ile nekroz arasındaki farklar.....	30
2.7. Askorbik Asit.....	31
2.7.1. Askorbik asidin kimyasal yapısı.....	31
2.7.2. Askorbik asidin biyosentezi	33
2.7.3. Askorbik asidin kaynakları.....	34
2.7.4. Askorbik asidin absorpsiyon ve transportu.....	35
2.7.5. Askorbik asidin metabolizması.....	36
2.7.6. Askorbik asidin katabolizması.....	37
2.7.7. Askorbik asidin fonksiyonları.....	37
2.7.8. Askorbik asidin eksikliği.....	41
3. MATERYAL VE METOD.....	42
3.1. Hücre Kültürü.....	42
3.2. Hücre kültürlerinde MDA, AA ve NO tayini.....	43
3.2.1. MDA düzeyinin tayini.....	43
3.2.2. AA düzeyinin tayini.....	45
3.2.3. NO düzeyinin tayini.....	46

	Sayfa
4. BULGULAR.....	47
4.1. AA Grubu.....	47
4.2. L-NAME Grubu.....	48
4.3. H ₂ O ₂ Grubu.....	49
5. SONUÇ.....	51
KAYNAKLAR.....	54
ÖZGEÇMİŞ.....	59

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.6. Apoptoz ile nekroz arasındaki farklar.....	31
Çizelge 3.1. MDA tayininde HPLC'ye ait sistem parametreleri ve çalışma koşulları.....	44
Çizelge 3.2. AA tayininde HPLC'ye ait sistem parametreleri ve çalışma koşulları.....	45
Çizelge 4.1. AA grubu.....	47
Çizelge 4.2. L-NAME grubu.....	48
Çizelge 4.3. H ₂ O ₂ grubu.....	50

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1 Nitrik oksit sentezi.....	16
Şekil 2.2. Hücre döngüsü.....	22
Şekil 2.3. Askorbik asidin yapısı.....	32
Şekil 2.4. Dehidroaskorbik asit.....	32
Şekil 2.5. Askorbik asidin biyosentezi.....	34
Şekil 3.1. MDA standart eğrisi.....	44
Şekil 3.2. Askorbik asidin standart eğrisi.....	45
Şekil 4.1. Askorbik aside ait HPLC kromatogramı.....	48
Şekil 4.2. MDA'ya ait HPLC kromatogramı.....	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
·OH ⁻	Hidoksil radikali
·O ₂ ⁻	Süperoksit radikali
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
Kısaltmalar	Açıklama
AA	Askorbik asit
DHAA	Dehidroaskorbik asit
EDRF	Endotel Kaynaklı Gevşeme Faktörü
GMP	Guanozin Monofosfat
GTP	Guanozin Trifosfat
L-NAME	N-Nitro L- Arginin Metil Ester
MDA	Malondialdehit
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
SOD	Süperoksit Dismutaz

1.GİRİŞ

Atomlar ve kimyasal bileşikler, içerdikleri elektronları, her bir orbitalde ikişer tane olmak üzere zıt yönlü taşırlar. Orbitalerin bu şekilde zıt yönlü doyurulması atom ve moleküllerin stabilitesini arttırır, reaktivitelerini azaltır. Herhangi bir atomun veya molekülün dış orbitalinde bir veya daha fazla paylaşılmamış elektron bulunması, söz konusu kimyasal türün reaktivitesini artırır. Dış orbitalde paylaşılmamış elektron içeren türler Serbest Radikal olarak adlandırılır [1].

Biyolojik sistemlerde en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan serbest radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikalidir [2].

Nitrik oksit (NO), serbest radikal özelliğine sahip bir moleküldür. Diğer radikal türlerle kıyaslandığında nitrik oksidin reaktivitesi oldukça düşüktür. Bunun sebebi paylaşılmamış elektronun azot ve oksijen atomları üzerinde lokalize olmamış bir şekilde bulunmasıdır. Nitrik oksit paylaşılmamış elektron taşıyan yüksüz bir molekül olması bakımından önemlidir. Çünkü yüksüz olduğu için membranlardan kolayca geçebilir ve hızla reaksiyona girebilir. Nitrik oksit büyük bir ilgi ile organik yapılarıdaki metal merkezlere bağlanır. Nitrik oksidin biyolojik moleküllerle en önemli tepkimeleri, kendiliğinden oksidasyonu sırasında oluşan Reaktif Nitrojen Türleri aracılığı ile gerçekleşir [1].

Serbest oksijen radikallerinin yanı sıra başta nitrik oksit olmak üzere reaktif nitrojen türleri, hücrelerin lipit, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederek hücrelerin yapı ve işlevlerini bozmaktadırlar [1].

Biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları serbest radikallerden etkilenirler. Fakat bu biyomoleküller arasında en hassas olanları lipitlerdir. Membranlardaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif

yıkımı lipit peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerlemektedir. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür [1].

Lipit peroksidasyonun en önemli ürünü malondialdehit (MDA)'tir. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda MDA meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur [1].

Yaşlanma, hücrelerden organlara kadar tüm yapılarda fonksiyonların giderek azaldığı karmaşık bir süreçtir. Yaşlanma sürecini açıklamak için birçok teori geliştirilmiştir. Bunlardan en önemlisi hücresel yaşlanmayı açıklayan serbest radikal teorisidir. Serbest radikaller hücrelerin yapı ve bileşenlerine zarar vererek hücrelerin fonksiyonlarını bozmaktadır. İşlevlerini yerine getiremeyen hücreler yaşlanma sürecine girmekte ve sonuçta ölmektedirler [3].

Askorbik asit (AA) suda çözünebilen çok kuvveli indirgeyici özelliği olan bir vitamindir. İnsanlar, birçok bitki ve hayvan gibi askorbik asidi sentezleyemez. Bunun sebebi insanlarda, askorbik asit biyosentezinin son reaksiyonunu katalizleyen gulonolakton oksidaz enziminin bulunmamasıdır. Bu yüzden insanlarda, askorbik asidin dışarıdan alınması zorunludur. Askorbik asidin organizmada pek çok önemli görevi bulunmaktadır. Askorbik asidin en önemli işlevlerinden bir tanesi de suda çözünen süperoksit, hidroksil radikalleri ve singlet oksijen ile direkt olarak reaksiyona girebilen ve bu serbest radikallerin oluşturduğu hasarları önleyebilen bir antioksidan olmasıdır [4].

Tüm bu bilgiler doğrultusunda, L-929 fibroblast hücre kültürlerinde nitrik oksit seviyelerini, malondialdehit düzeylerini ve hücre yaşlanmasına yol açan oksidatif stresle mücadelede askorbik asidin rolünü araştırmayı planladık.

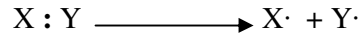
2.GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller

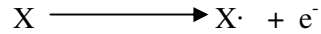
Serbest radikaller, bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektron içeren atom veya moleküllerdir. Bu tip maddeler, çiftleşmemiş elektronlarından dolayı oldukça aktiftirler.

Serbest radikaller başlıca 3 temel mekanizma ile oluşurlar:

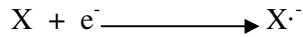
1)Kovalent bağların homolitik kırılması: Bir molekülü oluşturan kovalent bağın homolitik yıkılması sonucu, bağı oluşturan iki elektronun her birinin ayrı atomlar üzerinde kalması ile serbest radikaller meydana gelmektedir.



2)Bir molekülün elektron kaybetmesi: Radikal özelliği bulunmayan bir molekülün yapısındaki atomlardan birisinden elektron uzaklaştırılması sonucu oluşmaktadır.



3)Bir moleküle elektron transferi: Bir molekül yapısına elektron eklenmesi sonucu reaktif özellik taşıyan yapılar oluşmaktadır.



Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucunda meydana gelirler [1].

2.1.1. Serbest radikal türleri

En önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metalleri iyonları ve hidroksil radikalleridir.

Süperoksit radikali

Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucunda, süperoksit anyon radikali meydana gelir. Süperoksit bir serbest radikalse de özellikle hasar oluşturacak bir tür değildir. Bunun nedeni yarı ömrünün uzun olmasına karşın bulunduğu yerden uzaklaşma yeteneğinin az olmasıdır.

Süperoksidin asıl önemi hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır [1].

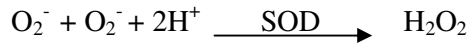


Canlılarda süperoksit başlıca şu mekanizmalarla üretilmektedir:

- 1) İndirgeyici özellikteki biyomoleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksit radikali oluşur. Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler, indirgenmiş nükleotitler gibi biyolojik moleküller 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 taşıyıcılarından oksijene elektron kaçağının olmasıdır.

4) Aktive edilen fagositik lökositler bol miktarda süperoksit üreterek buldukları ortama verirler. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal yapımı, daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatır.

Hücre sel 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 olduğu için tercih edilmez. Aerobik canlılarda süperoksitlerin hidrojen perokside çevrilmesi, katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenir.



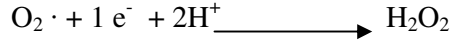
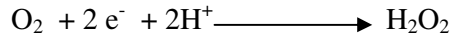
SOD tarafından katalizlenen bu tepkime dismutasyon tepkimesi olarak adlandırılır. Süperoksit, özellikle hafif asidik koşullarda SOD olmadan kendiliğinden dismutasyonla da H_2O_2 'e çevrilebilir.

SOD enziminin yüksek katalitik etkisi nedeniyle hücrelerde süperoksit birikimine izin verilmez. Ancak çeşitli patolojik durumlarda süperoksit yapımının artmasıyla süperokside özgü tepkimeler görülmeye başlanır.

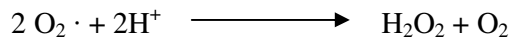
Süperoksit, metal iyonlarını indirgeyerek bağlı olduğu proteinlerden salınımına neden olur. Kofaktörlerin oksidasyon düzeylerini bozar ve metal iyonlarının katıldığı hidroksil radikali yapım tepkimelerini hızlandırır [5].

Hidrojen Peroksit

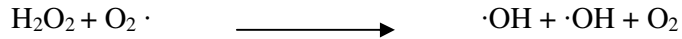
Membrandan kolayca geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır. Zayıf bir indirgeyici ajandır. Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksit radikaline bir elektron ilave edilmesiyle hidrojen peroksit oluşur [2].



Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi süperoksidin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar [2].



Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal kimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü süperoksit ile reaksiyona girerek, en aktif ve en zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir [2,5].



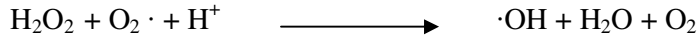
Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Oksitleyici özelliği nedeniyle, biyolojik sistemlerde oluşan hidrojen peroksidin derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri yerine getirir [2,5].

Hidroksil Radikali

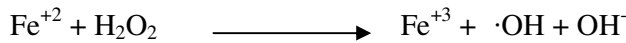
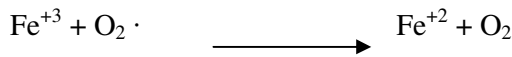
Hidrojen peroksit bir elektron eklenirse hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) ve hidroksil anyonu (OH^-) oluşur.



En reaktif ve toksik etkili radikal olan hidroksil radikali, hidrojen peroksidin süperoksit ile reaksiyona girdiği Haber-Weiss tepkimesi ile oluşur.



Aynı reaksiyon geçiş metalleri aracılığı ile Fenton tepkimesiyle de gerçekleşmektedir. Fenton tepkimesini katalizleyen en reaktif metal iyonları demir ve bakırdır.



Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan hidroksil radikali, su dahil ortamda rastladığı her biyomolekülle tepkimeye girer. Hidroksil radikalının tepkimeleri başlıca:

- a) Elektron transfer tepkimeleri
- b) Hidrojen çıkarma tepkimeleri
- c) Katılma tepkimeleri'dir.

Bütün bu tepkimeler, hidroksil radikalının paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır. Katılma tepkimeleri, özellikle elektronca zengin moleküllerle (pürin ve pirimidin bazları, aromatik amino asitler) gerçekleşir. Hidroksil radikalının organik moleküllerden hidrojen atomu alarak suya indirgendiğinde tepkime, hidrojen çıkarma tepkimesi olarak bilinir. Hidroksil radikali ile oluşan en iyi tanımlanmış biyolojik hasar, lipit peroksidasyonu olarak bilinen zincir reaksiyonudur [2,5].

Singlet Oksijen

Özellikle oksijen serbest radikalleriyle sıkça birlikte anılan bir diğer nonradikaldir. Eşlenmemiş elektron taşımamaktadır. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana

gelebildiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olmaktadır. Oksijenin elektronlarından birinin enerjisi alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle oluşur. Oksijenin bu enerji alan reaksiyonu sonucunda iki tip singlet oksijen üretilir:

- a) Sigma singlet oksijen: Enerjisi daha fazladır ve çok kısa ömürlüdür.
- b) Delta singlet oksijen: Daha uzun ömürlüdür ve gözlenen kimyasal reaksiyonlardan esas sorumlu form olduğu kabul edilmektedir.

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 peroksil radikalini oluşturur ve hidroksil radikali kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir [2,5].

Peroksil Radikali

Karbon merkezli radikaller lipid, nükleik asit, karbonhidrat veya protein gibi biyolojik moleküllerle okside edici hidroksil radikalinin reaksiyonu ile oluşur. Bunlar çok hızlı bir şekilde peroksil radikalini ($ROO\cdot$) oluşturur. Peroksil radikali lipid peroksidasyonunu başlatır. Bu peroksil radikalinden alkoksil ($RO\cdot$) radikalleri de oluşabilir. Sülfür atomu serbest radikal merkezinde olursa tiyil radikali ($RS\cdot$) olarak adlandırılır [2,5].

2.1.2. Serbest radikallerin kaynakları

Biyolojik Kaynakları

- ✓ Aktive olmuş fagositler
- ✓ Radyasyon
- ✓ Alışkanlık yapan maddeler
- ✓ Antineoplastik ajanlar

- ✓ Çevresel ajanlar (Hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, hiperoksi, pestisitler, sigara dumanı, solventler, anestezikler, aromatik hidrokarbonlar)
- ✓ Stres

İntrasellüler Kaynakları

- ✓ Mitokondriyal Elektron Transportu
- ✓ Endoplazmik Elektron Transportu
- ✓ Mikrozomal Elektron Transportu
- ✓ Küçük Moleküllerin Otooksidasyonu

Oksidan Enzimler

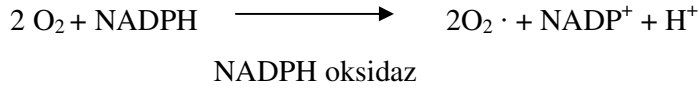
- ✓ Ksantin Oksidaz
- ✓ Siklooksijenaz
- ✓ Lipooksijenaz
- ✓ Galaktoz Oksidaz
- ✓ Monoamino Oksidaz

2.1.3. Hücrelerde serbest radikal üretimi

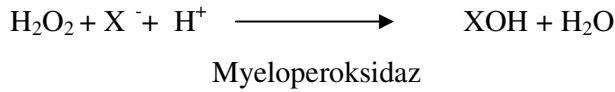
İyonize radyasyonun etkisi gibi nadir durumlar dışında serbest radikaller hücrelerde genellikle elektron transfer reaksiyonlarıyla üretilir. Bu reaksiyonlar ya enzimin etkisiyle ya da geçiş metal iyonlarının redoks reaksiyonuna girmesiyle nonenzimatik olarak gerçekleşir Normal şartlar altında hücrelerdeki esas serbest radikal kaynağı elektron transport zincirinden elektron sızıntısıdır. Mitokondri iç zarına yerleşmiş olan oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondriyal süperoksit üretimi artar. Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda ise serbest radikal üretimi membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır. Birçok enzimin katalitik siklusları sırasında da serbest radikaller açığa çıkar. Bu enzimlerden biri ksantin oksidaz olup normalde NAD bağımlı dehidrogenaz olarak etki eder ve herhangi bir serbest radikal üretimine neden

olmaz. Fakat in vivo olarak oluşturulan iskemi, enzimin dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüşmesine ve süperoksit radikalinin üretimine sebep olur. Aldehit oksidaz yapı itibariyle ksantin oksidaza benzer ve substratlarının çoğu aynı olup, süperoksit radikali üretir. Benzer şekilde dihidroorotat dehidrogenaz, flavoprotein dehidrogenaz, aminoasit oksidaz ve triptofan dioksijenaz gibi enzimler de radikal oluşmasına sebep olurlar.

Aktive olmuş fagositler, bakterisidal rollerinin sonucu olarak plazma membranlarındaki NAD(P)H oksidaz ile süperoksit üretirler. Fagositik hücrelerin uyarılması sonucu oluşan yabancı partikülleri tanıma ve reaksiyon serisi solunumsal patlama olarak adlandırılır. Solunumsal patlama hedef hücrelerin yıkımı için hücreye okside edici ajanlar sağlar. NADPH oksidaz enzimi aktive olduğunda plazma membranı veya dış yüzeyde oksijen elektronlarını alır ve süperoksit radikali oluşturur.



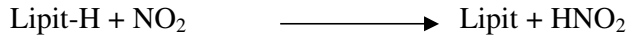
Daha sonra süperoksit, süperoksit dismutaz ile hidrojen perokside dönüştürülür. Nötrofil ve monositler primer lizozomal granüllerde bir hem enzimi olan myeloperoksidaz içerirler. Hidrojen peroksidin myeloperoksidaz ve bir halit iyonu (klorür, iyodür, bromür) ile tepkimesi güçlü antimikrobiyal etki gösteren hipohalöz asitleri (XOH) oluşturur.



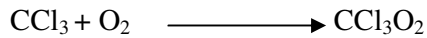
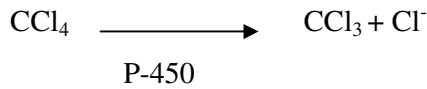
Peroksizomlar çok önemli hücre içi hidrojen peroksit kaynaklarıdır. Bu organeldeki D amino asit oksidaz, urat oksidaz, L-hidroksi asit oksidaz ve yağ asidi açıl-CoA oksidaz gibi oksidazlar süperoksit üretmeden bol miktarda hidrojen peroksit üretimine neden olurlar. Ancak peroksizomlarda katalaz aktivitesi çok yüksek olduğundan hidrojen peroksit büyük ölçüde elimine edilir. Hayvan hücrelerindeki

süperoksidin bir başka kaynağı da askorbik asit, tiyoller, adrenalin ve flavin koenzimleri gibi bazı bileşiklerin otooksidasyonudur. Hücrelerdeki serbest radikal üretimi, bazı yabancı toksik maddeler tarafından da büyük oranda arttırılabilir. Bu maddeler ya doğrudan serbest radikal üretir ya da antioksidan aktiviteyi düşürürler. Bu tip maddeler 4 grupta toplanırlar:

1) Toksinin kendisi bir serbest radikaldir. Kirli havanın koyu rengini veren azot dioksit gazı (NO_2) buna bir örnektir. Bu radikal iyi bir lipit peroksidasyonu başlatıcısıdır.



2) Toksin bir serbest radikale metabolize olur. Mesela bir toksik madde olan karbon tetra klorür karaciğerde sitokrom P-450 tarafından triklorometil serbest radikale dönüşür.



Böylece reaktif serbest radikal üretimi, karaciğerde antioksidan savunmaları aşar. Bu da hücrel membranların oksidatif yıkımı ve ciddi doku hasarı ile sonuçlanır.

3) Toksinin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelir. Bunun tipik bir örneği paraquat'tır. Özellikle karaciğerde biriken paraquat, bir serbest radikale indirgendikten sonra tekrar yükseltgenerek rejenere edilirken beraberinde oksijen indirgenir. Böylece bol miktarda süperoksit üretilmiş olur.

4) Toksin antioksidan aktiviteyi düşürür. Mesela parasetamolün karaciğerde sitokrom P-450 tarafından metabolizması sonucu glutatyonla reaksiyona giren ve glutatyonun miktarını azaltan bir ürün meydana gelir.

Bir hem proteini olan sitokrom P-450 bir çok endojen bileşimin ve ksenobiyotiğin hidroksilasyonunu katalizler. Bu reaksiyonlarda oksijen kaynağı olarak moleküler oksijeni kullandığı gibi peroksitleri de kullanabilir. Böylece bir peroksidaz gibi etki eder. Ancak alkol ve asetonla indüksiyonunda olduğu gibi bazı hallerde sitokrom P-450 aşırı miktarda süperoksit üreten bir izoenzime dönüşür.

Araşidonik asit metabolizması da reaktif oksijen metabolitlerinin önemli bir kaynağıdır. Fagositik hücrelerin uyarılması fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna ve plazma membranında araşidonik asit salınımına yol açar. Araşidonik asidin enzimatik oksidasyonu da çeşitli radikal ara ürünleri meydana gelir [5,6].

2.1.4. Serbest radikallerin biyolojik etkileri

Organizmada oluşan serbest radikaller doğal antioksidan sistemlerle ortadan kaldırılamazlarsa hücreler için toksik etki gösterirler. Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Mitokondrideki aerobik solunumu ve kapiller permeabilityyi bozar, hücrelerin potasyum kaybını ve trombosit agregasyonunu arttırlar. Proteaz, fosfolipaz, elastaz, siklooksijenaz, ksantin oksidaz, lipooksijenaz gibi litik enzimleri aktifleştirirken, alfa-1 antitripsin gibi bazı savunma sistemlerini inaktive ederler.

Proteinler Üzerine Etkileri

Proteinlerin serbest radikallerden etkilenme dereceleri amino asit bileşimlerine bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallere karşı oldukça duyarlıdır. Özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana gelir. Bu reaksiyonlar sonucu immünoglobulin G ve albümin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozular.

Serbest radikaller amino asitlerin oksidasyonunun yanında peptit bağlarının hidrolizine ve çapraz bağların oluşumuna sebep olabilir. Bunun sonucunda enzimler fonksiyon kaybına uğrayabilirler. Örneğin Ca^{++} ATPaz ve Na-K ATPaz, tiyol gruplarının oksidasyonu ile aktivite kaybına uğrarlar. Böylece hücre içi ve hücre dışı iyon dağılımı bozulur. Proteinler üzerindeki hasarın artması hücre canlılığını etkiler [6,7].

Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Etkileri

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Sitotoksiste, büyük oranda nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar.

Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Bu yüzden DNA, serbest radikallerden kolayca zarar görebilen önemli bir hedeftir.

Karbonhidratlar Üzerine Etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelirler. Okzoaldehitler; DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar. Karbonhidrat oksidasyonunun bir ürünü olan gliokzalın da hücre bölünmesini inhibe ettiği bildirilmiştir [1,7].

2.2. Lipit Peroksidasyonu

Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranda oluştukları zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları serbest radikaller tarafından etkilenirler, fakat lipitler en hassas olanlarıdır. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipit peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür.

Lipit peroksidasyonu, organizmada oluşan bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Bunun sonucu yağ asidi bir lipit radikali niteliği kazanır. Oluşan lipit radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipit radikalının moleküler oksijenle etkileşmesi sonucunda lipit peroksil radikali meydana gelir. Lipit peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksitlerine dönüşürler. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder.

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

Plazma membranı ve organel lipit peroksidasyonu, serbest radikal kaynaklarının hepsiyle stimüle edilebilir ve metallerin varlığında artar. Bu metaller redoks katalizörü olarak görev yaparlar ve süperoksit ve hidrojen peroksitin daha güçlü oksidanlara dönüşümünü katalizlerler [1,8].

Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan lipit hidroperoksitlerinin yıkımı, geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Lipit hidroperoksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşurlar. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler

ya da başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiobarbütirik asitle ölçülebilen malondialdehit meydana gelir. MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir fakat lipit peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir.

Lipit peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehytler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olur. Lipit radikallerinin hidrofobik yapıda olması yüzünden reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerle meydana gelir. Membran permeabilitesi ve mikroviskositesi ciddi şekilde etkilenir. Peroksidasyonla oluşan malondialdehit, membran bileşenlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler, malondialdehitin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olmasını açıklar [8,9,10].

2.3. Nitrik Oksit

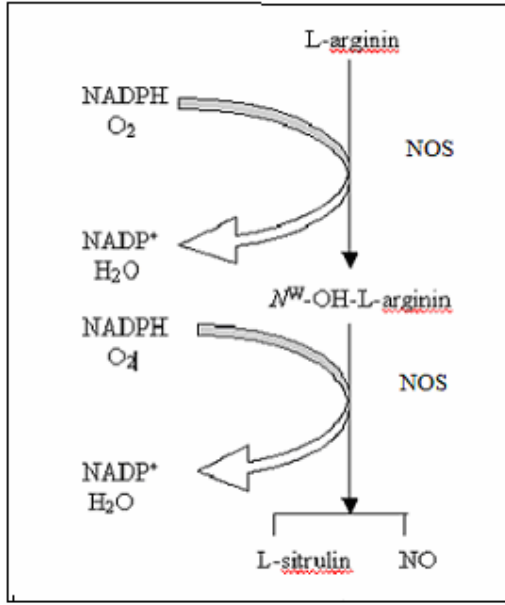
Nitrik oksit, renksiz bir gaz olup, serbest radikal özelliğine sahip basit bir moleküldür. Radikallerin en önemli özelliği, paylaşılmamış elektron içeriği nedeniyle çok reaktif olmalarıdır. Oysa paylaşılmamış elektron içermesine rağmen diğer radikal türlerle kıyaslandığında, NO'nin reaktivitesi oldukça düşüktür. Bunun başlıca nedeni paylaşılmamış elektronun N veya O atomları üzerinde lokalize olmaması fakat iki atom üzerinde delokalize olmuş bir durumda bulunmasıdır.

İlk olarak Furchgott ve Zawadzki tarafından 1980 yılında tavşan aort halkasında sağlam endotelde asetil kolin etkisiyle gevşeme yanıtı oluşturan bir maddenin varlığı fark edilmiştir. Bu maddeye endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDFR) adı verilmiştir. Daha sonra bu maddenin Nitrik Oksit olduğu anlaşılmıştır.

Nitrik Oksit eşlenmemiş bir elektron taşıyan yüksüz bir molekül olması bakımından önemlidir. Çünkü yüksüz olduğu için membranlardan kolayca geçebilir ve eşleşmemiş elektrona sahip olması nedeni ile de hızla reaksiyona girer. Yarı ömrü 20-30 sn'dir [1,11].

2.3.1. Nitrik oksit biyosentezi ve Nitrik oksit sentaz enzimleri

Nitrik oksit sentezi için kullanılan öncül biyomolekül arjinin amino asitidir. Nitrik oksidin sentezi, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi üzerinde iki basamakta gerçekleşir. Tepkimenin ilk basamağında N-Hidroksi Arjinin (N-OH-Arjinin) oluşur. Bu ara ürün oldukça stabildir ve istenirse tepkime ortamından izole edilebilir. Enzime sıkı bağlı olan ara ürün ikinci aşamada sitrulin ve nitrik oksite çevrilir.



Şekil 2.1. Nitrik oksit sentezi [13]

Bu reaksiyon için ortamda oksijen, NADPH, FAD, FMN ve tetrahydrobiopteridin bulunması gerekir. Enzimatik nitrik oksit sentezi, birer monooksijenaz aktivitesi sayesinde gerçekleşir. nitrik oksit sentaz enzimi tarafından 1 mol arjinden 1 mol nitrik oksit sentezi için, 2 mol oksijen ile 1,5 mol NADPH kullanılır [12,13].

Arjininden NO sentezi sadece insanlara özgü bir olay değildir. İnsan dışında, bütün memeliler dahil olmak üzere çok çeşitli canlı türleri NO sentezlemekte ve çeşitli biyolojik etkileri için kullanılmaktadır. Arjininden kaynak alan NO sentazın kuşlar, balıklar, omurgasızlar ve hatta bitkiler ve bakterilerde de bulunduğu gösterilmiştir.

Nitrik oksit sentezleyen NOS enziminin 3 izoformu vardır. Bunlar;

1. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz (e-NOS)
2. Nöronal Nitrik Oksit Sentaz (n-NOS)
3. İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (i-NOS)

Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz zarsal bir enzimdir. İlgili geni 7.kromozom üzerinde bulunmaktadır. Endotel kaynaklı gevşeme faktörünün sentezinden sorumludur. Aktivitesi Ca^{++} /kalmodulin bağımlıdır. Kısa süreli NO sentezini katalizler. Aktivitesi düşüktür. Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz; mast hücreleri, plateletler, pankreasın beta adacıklarında, vasküler düz kas hücrelerinde bulunur.

Nöronal Nitrik Oksit Sentaz, ise merkezi sinir sistemi ve nöronlarda haberci molekül olarak kullanılan NO'in üretiminden sorumludur. İlgili geni 12.kromozom üzerinde bulunmaktadır. Aktivitesi Ca^{++} /kalmodulin bağımlıdır. Düşük miktarlarda nitrik oksit üretebilir [13,14].

NOS enziminin indüklenebilir olan izoformu ise alt birim olarak kalmoduline ihtiyaç duyar. Aktivitesi için hücre içi kalsiyum derişiminin artması gerekli değildir. İlgili geni 17.kromozom üzerinde bulunmaktadır. iNOS sitoplazmik bir enzimdir. Uzun süreli NO sentezini katalizlerler. Enzim aktivitesi yüksektir. Bu izoform ilk olarak makrofajlardan saflaştırılmıştır. iNOS enziminin sentezini lipopolisakkaritler gibi çeşitli bakteriyel ürünler ile inflamatuvar sitokinler (interferon gama, IL-1, IL-2, TNF- α gibi) indükler. iNOS sadece fagositik lökositlere özgü olmayıp; uygun indüksiyon sağlandığında bütün çekirdekli hücreler bu enzimi sentezleme yeteneğine sahiptir [13,14].

2.3.2. Nitrik oksidin tepkimeleri

Reaktif özelliği nedeniyle, üretildiği andan itibaren NO'nin tepkimeleri ve difüzyonu eş zamanlı olarak gerçekleşir. Üretilen NO hedef moleküllere bağlanabilir veya oksijen ve süperoksit ile tepkimeye girerek reaktif nitrojen oksit türevlerini (NO) oluşturabilir. Difüzyonla etkisini gösterebileceği gibi komşu hücrelere veya dolaşıma da geçebilir. Alyuvarlara ulaşabilen NO, oksihemoglobin ile tepkimeye girerek nitrata oksitlenir. Bu tepkime NO'ü ortamdan uzaklaştıran en etkili mekanizmadır. Nitrik oksit aerobik ortamda oksitlenerek kendi derişimini azaltır. Oluşan yeni nitrojen oksit türlerinin biyomoleküllerle tepkimesi çok hızlıdır ve bu türler sonunda nitrit ve nitrat gibi daha stabil ürünler oluştururlar. NO derişimi arttıkça oksidasyon tepkimeleri de hızlandığından NO'nin yarı ömrü ve difüzyonu da azalır. Ancak oksidasyon tepkimeleri ile oluşan reaktif türleri biyomoleküllerle tepkimeye girdiğinden, NO üretimindeki artış onun sitotoksik etkilerini de arttırır [15].

2.3.3. Nitrik oksidin biyolojik fonksiyonlara etkileri

Nitrik oksitin ilk keşfedildiği 1980'lerin başından bu yana geçen kısa sürede çok önemli gelişmeler olmuş ve bu maddenin memelilerde oldukça önemli biyolojik etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalara göre nitrik oksit vücutta endojen olarak üretilmekte ve hem fizyolojik hem de patolojik birçok süreçte etkin olarak rol almaktadır [11].

Nitrik oksidin düzenleyici etkileri

Sinir sistemindeki nörotransmitör fonksiyonunda ve düz kasların gevşemesinde, lökositlerin endotel hücrelerine yapışmaları ve inflamasyonda olduğu dokuya göç etmesinde, trombositlerin hücre yüzeyine yapışma ve tutunmalarının inhibisyonunda, damar geçirgenliğinin kontrolünde, penis ereksiyonunda, immün sisteminin kontrolünde, barsak ve böbreklerde tuz ve su emiliminde de nitrik oksitin regülatör fonksiyonlara sahip olduğu gösterilmiştir [15].

Nitrik oksidin koruyucu etkileri

Antiinflamatuvar etkisi vardır. Doku ve hücreleri çeşitli bileşiklerin sitotoksik etkilerine karşı korur. Bu koruyucu etkisini, lökositlerin hücre yüzeyine tutunmaları ve yapışmalarını inhibe ederek gösterir. TNF toksisitesine karşı hücreleri koruyucu etkiye sahiptir. Çiğneme, tükürük ve mide asit artışı ile mideden NO salınımı uyarılır. NO, histamin salgısını inhibe ederek asit salgısını baskılar. Aynı zamanda mukozal kan akımını arttırarak koruyucu bir rol oynar [16].

Nitrik oksidin sitotoksik etkileri

Normal fizyolojik homeostatik kontrolde görev alan nitrik oksit, çeşitli inflamatuvar olaylar ve hastalıklarda sentezi artar ve sonuçta doku hasarlarına katkıda bulunur. Ateroskleroz, artrit, doku enfeksiyonları, dejeneratif nöronal hastalıklar, diyabet ve pek çok diğer hastalıklarda nitrik oksit sentezi artar ve üretilen nitrik oksit doku hasarlarına doğrudan katkıda bulunur. Nitrik oksitten kaynaklanan reaktif azot türleri; enzim fonksiyonlarının inhibisyonlarına, DNA parçalanmalarına, zar lipidlerinin oksidatif yıkımına, hücrel antioksidanların tüketimine, radyasyon, alkilleyici ajanlar ve toksik metallere duyarlılığın artmasına neden olur [15,16].

Nitrik Oksidin doğrudan ve dolaylı etkileri

Doğrudan Etkileri

Nitrik oksitin düşük derişimlerinde ($1\mu\text{M}$ 'ın altında) gözlenen etkileri "Doğrudan Etkileri" olarak adlandırılır. Nitrik oksitin doğrudan etkilerini, bu molekülün in vivo koşullarda biyomoleküllerle tepkimeye girerek neden olduğu etkiler oluşturur. Koruyucu ve düzenleyici etkileri NO'in doğrudan etkileridir. Düşük derişimdeki NO daha uzun ömürlüdür ve oksijen ile tepkimeleri daha yavaştır.

Dolaylı Etkileri

Nitrik oksitin fizyolojik fonksiyonları için gerekli olan derişimin üstündeki yüksek derişimdeki (1 μ M'ın üstünde) görülen etkileri ise “Dolaylı Etkileri”dir. NO'in derişiminin artması ile O₂ ile tepkimeleri hızlanır. Ancak NO'in oksijenli ortamda oksidasyonu ile reaktif türler oluşur. Bu reaktif türler biyolojik moleküllerle tepkimeye girerek dolaylı etkilerinin ortaya çıkmasına neden olurlar [17,18].

Nitrik oksidin damarlar üzerine etkileri

NO'nun düz kas hücresindeki guanilat siklaz enziminin demir içeren hem molekülündeki demir atomuna bağlanmakta, molekülün üç boyutlu konfigürasyonunu değiştirerek, enzimin aktif hale gelmesini sağlamaktadır. Aktifleşen enzim de guanozil tri fosfat'tan (GTP) siklik guanozil mono fosfat (cGMP) yapımını artırmakta ve bu maddenin fizyolojik etkisiyle düz kas hücresinde gevşeme meydana gelmektedir. Bu mekanizmayla oluşan düz kas gevşemesi damarlarda genişlemeye yol açmaktadır [31,34]. Endotelial NO sisteminin ateroskleroz, hiperkolesterolemi, hipertansiyon, diyabet ve sigara içimine bağlı olarak gerilediği ve bu patofizyolojik süreçler sonunda NO'in organizmadaki olumlu damarsal etkilerinin azaldığı bildirilmiştir [19,20].

2.4. Hücre Döngüsü

Eşeyli çoğalan organizmaların eşey hücrelerinin dışındaki tüm somatik hücreleri mitozla bölünerek oluşur. Mitotik bölünme tam bir organizmayı oluşturmak ve yaşlanan, hasar gören ya da ölen hücrelerin yerini almak amacıyla yapılır. Mitotik hücre döngüsünün tek hedefi bir öncül hücreden bir bölünmeyle genetik benzerliği olan iki hücreyi oluşturmaktır. Hücre döngüsünün süresi organizma türüne göre değişir. Örneğin bakteriler 20 dakika, maya hücresi 1,5-2 saat, memeli hücresi ise 24 saatte bölünür. Hücre döngüsü iki evrede gerçekleşir;

1. Bölünme için döngüyü başlatmaya karar verme ve hazırlanma (interfaz)

2.Hücre bölünmesi (mitotik ve sitoplazmik bölünme)

Hücre döngüsünde bu olayların gerçekleşmesi, aşamalara karar verilmesi ve bu aşamaların kontrolüne bağlıdır. Döngünün aşamaları:

G1 evresi: Büyüme için hazırlık evresidir. DNA'da hasar varsa onarımı yapılır. Hücreler için gerekli RNA ve proteinler sentezlenir.

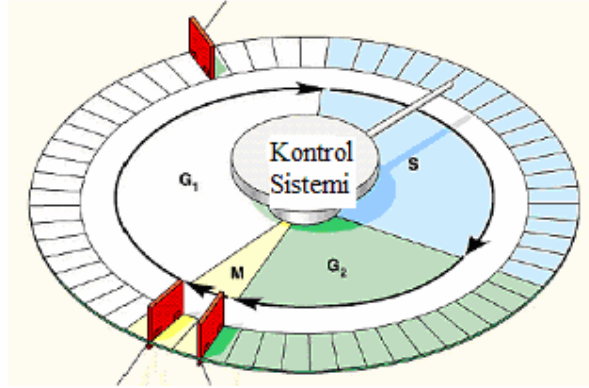
S evresi: DNA sentezinin başladığı evredir. DNA sentezi yapılarak DNA miktarı iki katına çıkar.

G2 evresi: Kromozomal yoğunlaşmanın görüldüğü evredir.

Son olarak da mitotik bölünmeyi (M) kapsar. İnterfaz sonrası mitotik bölünme, çekirdek bölünmesi ve ardından sitoplazma bölünmesi olaylarını içerir. Bu aşamaların kapıları bazı moleküler zamanlama ve kontrol olaylarının oluşumuna göre açılır ya da kapanır. Hücre döngüsünün süresini asıl olarak G1 (12 saat) ve biraz da G2 evresi (3-4 saat) belirler. İki bölünme arasındaki süre hücrenin hangi amaç için, ne zaman ve ne kadar hızla bölünmesi gerektiğiyle bağlantılıdır. Örneğin, zigottan sonraki embriyoyu oluşturacak ilk hücreler G1'de beklemeksizin DNA sentezi ve ardından mitotik bölünme ve tekrar DNA sentezi ve tekrar bölünme şeklinde hızlı bir hücre döngü sürecine girer. Bölünmenin yapılmayacağı ileriki dönemlerde hücreler G1 içinde, Go olarak bilinen bir bekleme dönemine (restriction point) girer. Örneğin, yeterli sayıda ve farklılaşmasını tamamlamış kas, sinir ya da karaciğer hücreleri Go'da bekler. Bunlardan karaciğer hücresi uyarıyı aldığı anda bölünmeyi başlatır ve çok uzun bir süre sonunda da olsa bölünmeyi tamamlar. Kas ve sinir hücreleri ise hep Go'da kalır. Kanser hücreleri bu evreye hemen hemen hiç takılmaz.

G1 sonrası ökaryotlarda yaklaşık 8-9 saatlik bir sürede (S evresinde) DNA sentezi yapılır, sentriol çifti dublike olur. Bu sürenin bitiminde G2 başlar. G2 kontrol noktası, sentezi tamamlanmamış ya da hasarlı DNA'ya çok duyarlıdır. DNA

bölgelerinde sentezi yapılamamış ya da hatalı sentez varsa onarılır ve mitoz bölünme için hazırlık yapılır [21].



Şekil 2.2. Hücre döngüsü [21]

2.5. Yaşlanma

Yaşlanma her canlıda görülen, tüm işlevlerde azalmaya neden olan ve süregelen bir süreçtir. Organizmanın molekül, hücre, doku, organ ve sistemler düzeyinde, zamanın ilerlemesi ile ortaya çıkan, geriye dönüşü olmayan yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin tümüdür.

Yaşlanmaya özgü değişikliklerle ilgili moleküler düzeyden organ sistemlerinin fonksiyonlarına kadar birçok teori üretilmiştir;

1-Somatik mutasyon teorisi: Somatik hücrelerde yaşam boyu biriken mutasyonlar birçok hastalığa neden olur. Örneğin onkojenik mutasyonların somatik hücrelerde yaşam boyu birikmesi kanser görülme oranını yaş ilerledikçe artırır. Somatik mutasyon teorisi mitokondrial DNA mutasyonlarını da kapsayacak şekilde genişletilmiştir.

2-Serbest radikal teorisi: Bu teoriye göre endojen olarak üretilen yüksek reaktivitedeki serbest radikaller somatik mutasyonlara ve protein hasarına yol açar. Serbest radikallerden olan oksidatif değişiklikler yaşlılığın dejeneratif hastalıklarında artan bir öneme sahiptir.

3-Hücre yaşlanması teorisi: Hücre proliferasyonunu kontrol eden genler klonal yaşlanmanın sebeplerindedir. Hücre yaşlanması kromozom uçlarında telomer bölgesindeki DNA kayıplarını da kapsar. Programlı hücre ölümü yani apoptoz da yaşlanma ile ilgilidir. Hücre ölümü ayrıca iskemi ya da toksinler gibi nedenlerle de olabilir. Buna "nekrotik hücre ölümü" denir.

4-İmmünolojik teori: Bu teoriye göre yaşlanmanın nedeni yaşla birlikte bağışıklık sistemindeki zayıflamadır. Yaşlanma ile birlikte görülen primer immün yanıt zayıflaması vücudu infeksiyonlara duyarlı kılar. Ayrıca yaşlanma ile birlikte düşük seviyede otoimmün ve inflamatuvar prosesin artışı söz konusudur.

5-Endokrin teorisi: Menopoz olayı over foliküllerinin ve oositlerin kısıtlı depolarının bitmesi ile meydana gelir. Geniş kapsamlı fizyolojik değişiklikleri içerir.

6-Nöroendokrin teorisi: Hipofiz bezindeki değişikliklerin yaşlanmada rol oynadığı görüşü vardır. Ayrıca otonomik sinir sisteminde ve metabolizmadaki birçok değişiklikler beyin merkezlerindeki yavaşlama ile açıklanmaktadır [22,23].

2.5.1. Serbest radikaller ve yaşlanma

Yaşlanmanın serbest radikal teorisi 1956 yılında Harman tarafından ortaya atılmıştır. Bu teoriye göre yaşlanma, normal hayat süresince meydana gelen serbest radikallerin, dokularda ve hücrelerde oluşturduğu oksidatif hasar birikiminin sonucu olarak meydana gelir. Buna göre metabolizması hızlı, fazla oksijen tüketen ve böylece serbest radikal üretimi fazla olan canlılar daha kısa ömürlü olacaktır.

Burada antioksidan savunma sistemleri de önemli rol oynar. Yaşam süresince serbest radikallerin ve reaktif türlerin makro moleküller üzerindeki etkisi giderilmeye çalışılır. Hücreler, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimleriyle ve dışarıdan aldığı C vitamini, E vitamini ve karotenoid gibi diğer antioksidanlarla oksidatif stresin yarattığı yıkıcı etkileri önlemeye çalışırlar. Uzun ömürlü hayvan türlerinde antioksidan sistemler daha etkilidir ve kısa ömürlülere göre karaciğer SOD aktivitesi daha yüksektir.

Serbest radikal oluşumunu artıran iyonize radyasyon, yaşlanmaya benzer bir tablo meydana getirerek yaşam süresini kısaltır. Dokuların spontan otooksidasyona karşı olan direncinin yaşla birlikte azaldığı kaydedilmiştir. Doku antioksidan konsantrasyonu ile uzun yaş arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur.

Lipit peroksitlerinin parçalanma ürünleri yaşla birlikte artar. Bu ürünlerin klasik örneği “lipofüsin” ve “cerid”dir. Bunlara “kromolipitler” veya ‘yaş pigmentleri’ adı verilir. Lipit peroksidasyon ürünlerinin amino asit, protein, fosfolipit ve DNA’daki primer amino grupları ile reaksiyonu sonucu meydana gelirler.

Yaşla birlikte lipofüsin sentezi artar ve memelilerde özellikle sinir sistemi, kalp ve kas lifleri gibi bölünmeyen hücrelerde birikir. Öte yandan yaşla birlikte hücrelerdeki glutatyon, melatonin miktarında da azalma görülmektedir [24-26].

2.5.2. Mitokondriyal DNA’da oksidatif hasar ve yaşlanma

Mitokondriyal DNA’da (mtDNA) oksidatif hasar ve bu hasara bağlı mutasyonların yaşlanma sürecinde önemli olduğu Miquel ve ark. tarafından 1980’de açıklanmıştır [27]. Mitokondriyal disfonksiyona bağlı olarak membran potansiyeli azalır, reaktif oksijen türlerinin oluşumu artar. ATP sentezinde de azalma olur. Oksidatif hasara bağlı mutasyonel yük artarken, koruyucu ve onarıcı proteinlerin azalması veya hasarlanması mitokondrilerin hasar ve mutasyona yatkınlığını artırır ve dolayısı ile hücrel yaşlanmayı hızlandırır [28].

Mitokondriyal elektron transport zincirinden elektron kaçağı sonucu oluşan serbest radikaller, önce mitokondride ve sonra hücrede hasar oluşturmaktadır. Hasar reaktif oksijen türlerinin oluşumunu daha da arttırmaktadır. Bu kısır döngü belli bir yaştan sonra ölüm hızında görülen büyük artışı açıklamaktadır [29-31].

2.5.3. Telomer uzunluğu ve yaşlanma arasındaki ilişki

Telomerler, ökaryotik organizmalarda lineer kromozomların uçlarında bulunan özelleşmiş DNA tekrar dizilerinden oluşan heterokromatik bölgelerdir [32,33]. Telomerik DNA dizileri diğer DNA dizilerinden yapı ve işlev olarak farklıdır, ayrıca temel biyolojik bir işleve de sahiptir. Replikasyon sırasında lineer kromozomal DNA molekülünün son kısmının tamamlanmasında rol oynar. Kromozomun son kısmını rekombinasyon, yıkım ve füzyon gibi anormal durumlara karşı korur. Kromozomların bütünlüğünü ve stabilitesini sağlar. Kromozomların nükleus zarına tutunarak belirli bir pozisyonu korumasını sağlar [32-34].

Replikatif yaşlanma ve bunun hücrel yaşlanma ile ilişkisini, kültüre alınmış insan fibroblastları ile çalışan Hayflick ve Moor-head tanımlamıştır [35]. Normal memeli somatik hücreleri, *in vitro* koşullarda belli sayıda bölünebilir. Bu maksimum bölünme sayısına "Hayflick Limiti" denir. Proliferasyon limiti, 'mitotik saat' olarak da adlandırılabilir. Replikatif yaşlanma, toplam hücre bölünme sayısına bağlıyken kronolojik ya da metabolik zamana bağlı değildir. Olovnikov, DNA replikasyonu sonucunda bütün kromozomların fiziksel olarak sonlarında bir eksilme olduğunu, belli sayıda bölünme yapabildiğini, kritik bir eksilme noktasından sonra hücrenin ölümüne neden olduğunu göstermiştir [36]. Germ-line hücrelerinde telomeraz aktivitesi sürekli olarak vardır. Bu yüzden germ-line hücreleri mutasyona uğrayabilir fakat yaşlanmazlar. Çok hücreli hayvanların evriminde somatik (nongermline) hücrelerin programlı yaşlanması selektif bir avantaja sahiptir. Hücrel ölüm ve düzenli büyüme kurallarına uygun olarak gerçekleşir ve kanser olma riski azalır.

Genel olarak incelendiğinde insan hücrelerinde yaşlanma ve ölüm iki evrede gerçekleşir:

M1 evresi: Telomer tek dalının önemli miktarda kısalması sonucu ortaya çıkar. Bu kısalık kritik bir noktaya ulaşıncaya hücre bölünmesi durur ve yaşlanma başlar. Bu noktadaki telomer boyu korunabilirse hücre yaşlı olarak hayatını sürdürür. Siklin bağımlı kinazların (Cyclin Dependent Kinase- CDK) oluşumu engellenir ve hücrenin

G0 ya da G1'den S fazına geçişi durdurulur. Böylece hücre bölünemez ve yaşlanır. Yaşlanma programını uyararak farklı etmenler vardır. Telomer kısalması, yaşlanma programı için en iyi tanımlanmış fizyolojik uyarıcıdır. Bu olayın yaşlanma açısından merkezi rolü tanımlanmıştır.

M2 evresi: Bu evre, M1 evresini aşan hücrelere aittir. Bir hücrenin M1 evresini aşarak M2 evresine geçebilmesi için, M1 evresinde bekleyen hücrenin p53 ve Rb benzeri proteinleri, viral onkoproteinlerce (viral onkogenler kullanılarak) bozulur. Böylece bu proteinler, G1 evresinde görev yapamayacağından hücre siklusu, G2'den S fazına atlar ve hücre bölünmesi devam eder. Fakat böyle bir durumdaki soma hücrelerinde, telomeraz enzim aktivitesi yok denecek kadar azaldığından, telomer boyu giderek kısalır. Telomer boyu aşırı kısalan hücreler M2 noktasında ölür. Eğer M2 noktasında hücrenin telomer boyu stabil bir halde kalırsa, hücre M2 noktasını aşarak ölümsüzleşir ve bölünmeye devam eder. Bu olay, telomeraz enziminin regülasyonu ya da yeniden aktifleşmesi sonucu ortaya çıkar. Kanser hücreleri, M2 evresini aşabilen bu tip hücrelerdir [32,34].

2.6. Hücre Ölümü

Organizmanın gelişimi sırasında görülen hızlı hücre çoğalmasının yanı sıra birçok hücre de ölmektedir. Hücreler fizyolojik, patolojik olaylar ve yaşlanma sonucu ölürlür. Hücre ölümünde iki farklı yol bulunmaktadır. Bunlar; apoptoz ve nekrozdur.

2.6.1. Apoptoz

Multisellüler organizmalarda hücre sayısının kontrolü, hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki dengenin devamı ile sağlanır. Apoptoz programlı ve fizyolojik bir ölüm şekli olması nedeniyle bu dengenin sürdürülmesinde önemli rol oynar [37].

Apoptoz gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin bir gereği olarak, gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlı ölümüdür. Embriyo döneminden başlayarak tüm yaşam boyunca apoptotik

mekanizma ve programlı hücre ölümü vardır [38].

Bütün yüksek canlılarda apoptoz embriyogenez, gelişme, hemostaz, rejenerasyon ve tamir olaylarında, organların büyüklüklerinin korunması ve organların patofizyolojisinde kritik bir öneme sahiptir [39].

Apoptotik Hücre Ölümünün Aşamaları

Apoptoz hücre içinden veya dışından gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini takip eden olaylar zinciri olarak seyreder. Sonuçta hücrenin ölümü ile sona erer. Apoptozda şu aşamalar vardır:

- 1.Apoptozun başlatılması
- 2.Hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu
- 3.Hücrede çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşturulması
- 4.Fagositoz [37].

1. Apoptozun başlatılması

Bir hücrede apoptozun başlaması için öncelikle genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir hücre içi veya hücre dışı sinyal gelmelidir. Hücreler için gerekli olan çevre hücrelerden ve ekstrasellüler matriksten gelen yaşam sinyalleri ve büyüme faktörleri düzenli ve yeterli miktarda olmazsa hücreler apoptoza giderler. Ayrıca bu sinyal ve faktör eksiklikleri ve ölüm reseptörlerinin aktivasyonu dışında hipoksi, ısı, anti kanser ilaçlar, radyasyon, gamma ve ultraviyole ışınları gibi dış etkenler de DNA hasarı oluşturarak apoptoz oluştururlar [39].

Apoptotik sinyal, hücrenin kendisinden de gelebilir. Bu sinyallerin hücrenin kendinden gelmesinin sebepleri şunlar olabilir:

- A)Hücre kimyasal bir madde ile etkileşir ve bu kimyasal madde DNA hasarına sebep olabilir. Giderilemeyen hasar sonucu hücre apoptoz kararı alabilir.
- B)Kimyasal madde mitokondri hasarına sebep olabilir. Böylece sistein-proteaz

enzimleri uyarılır ve apoptoz kaskadı başlatılabilir.

C)Hücresinin enerji metabolizmasının bozulması ya da enerji gereksiniminin karşılanamaması hücreye ölüm kararı aldirabilir.

D)Hücresinin antioksidan sistemi hasarlanmış olabilir.

E)Yaşlanma ile ilgili gen ekspresyonu uyarılmış olabilir [40].

2. Hücre içi proteazların aktivasyonu

İç ve dış sinyallerle bir grup proteaz aktive olur. Bu proteazlara kaspaz (caspase=cysteine-containing aspartate specific proteases) adı verilmektedir. Kaspazlar başlatıcı ve sonlandırıcı olmak üzere ikiye ayrılır. Ölüm reseptörleri adaptör proteinler aracılığıyla, iç sinyaller ise mitokondri aracılığıyla başlatıcı kaspazları, aktive olan başlatıcı kaspazlar ise zincirleme olarak diğer kaspazları aktive ederler.

3. Hücrede oluşan biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler

Biyokimyasal değişiklikler

Sonlandırıcı kaspazlar aktive olduktan sonra sitoplazmada ve çekirdek içinde hedef proteinleri yıkarlar.

DNA kırıklarının oluşumu

Hedef proteinlerden biri, DNA endonükleaz ile çapraz bağ yapan bir proteindir. Kaspazlar bu proteini yıkararak endonükleazı serbestleştirirler. Çekirdek içine giren $Ca^{++}Mg^{++}$ bağımlı endonükleaz, DNA kırıklarını oluşturur. Kırıklar nükleozomların arasından mono veya oligo nükleozomal olarak meydana gelir. 180 baz çifti ve katları şeklinde kırılmalar oluşur.

Hücre iskeletinin yıkılması

Kaspazların aktifleştirdiği bir başka protein ise hücre iskeletinin ana bileşenlerinden

olan aktini yıkan proteinlerdir. Aktin iplik yıkımı ile lerinin hücre normal şeklini kaybeder.

Hücre membran değişiklikler

Kaspazların etkisiyle hücre zarının asimetrisi bozular. Plazma zarının iç yüzündeki fosfaditilserin yer değiştirerek zarın dış yüzüne yerleşir. Bu membran değişiklikleri apoptotik hücrelerin çevre fagositler tarafından fark edilip fagositozlarını sağlamaktadır.

Morfolojik değişiklikler

Apoptozda ana morfolojik olay, nükleusun kondensasyonu ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır. Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılrken, apoptozda yaklaşık 300.000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz.

Apoptozda; hücre yoğunluğu artar. Buna bağlı olarak hücre zarı düzgün halini kaybeder. Endoplazmik retikulum genişler ve hücre zarı ile birleşir. Sitolde organeller bir araya toplanır fakat normal yapılarını korurlar. Mikroவில்ulluslar kaybolur, hücreler arası desmozom bağları kopar ve komşu hücrelerden ayrılır. Nükleus küçülür, nüklear kromatin yoğunlaşır. Bunun sonucunda nükleus membranında kep şeklinde görüntüler oluşur ve nükleus zarı dalgalı bir hal alır. Bu arada nükleus zarı porları da kaybolur. Nükleus parçalanır. Sonunda hücre zarında tomurcuklanma başlar ve hücre apoptotik cisimcikler halinde parçalanır. Apoptotik cisimciklerde organeller ve kromatin parçacıklar bulunur. Tomurcuklanma sırasında hücre içeriği, hücre dışına sızmaz.

4. Fagositoz

Apoptotik cisimler çevredeki parenkim hücreleri ve fagositler tarafından fagosite edilerek dokudan temizlenirler [41,42].

2.6.2. Nekroz

Nekroz patolojik bir nedenden dolayı hücrenin zarar görerek, kendi katılımı olmaksızın meydana gelen hücre ölümüdür. Nekroz hücrenin enerji kaynaklarında bir azalmayı, hücresel çözünmeyi ve bunları izleyen içsel homeostazın yıkımını içerir. Nekroz irreversible ve ağır bir hücre zedelenmesinin sonucudur.

Nekrozdaki değişiklikleri başlatan iki temel olay vardır:

- a) Hücrelerin enzimatik sindirimi
- b) Proteinlerin denatürasyonu

Nekrozun morfolojisi

Sitoplazmadaki değişiklikler

Hücre normal hücreye göre daha camsı homojen görünüşte olabilir. Enzimler sitoplazmik organelleri sindirdiğinde, sitoplazma vakuollü ve dişlenmiş görünümündedir. Son olarak ölü hücrede kalsifikasyon meydana gelir.

Nükleer değişiklikler

DNA'nın yıkılmasına bağlı olarak nükleusun bazofilisi kaybolabilir ve nükleus parçalanabilir.

2.6.3. Apoptoz ile nekroz arasındaki farklar

Nekroz fiziksel ve kimyasal zararları takiben ortaya çıkan patolojik bir ölüm şeklidir. Başta mitokondri olmak üzere sitoplazmik organeller hasarlanır. Hücre membranı selektif permeabilitesini kaybeder ve şişerek rüptüre olur. Hücre içeriği çevre dokuya yayılarak inflamatuvar bir cevaba neden olur.

Apoptotik hücrede nekrozun aksine en çarpıcı değişiklik çekirdekte meydana gelir. Hücre küçülür, yüzeyinde sitoplazmik çıkıntılar meydana gelir. Sitoplazmada yoğunlaşma, hücre dansitesinde artma ve çekirdek membranına yakın bölgelerden başlayarak kromatinde yoğunlaşma görülür. Daha sonra tüm çekirdek kondanse olur ve DNA'nın fragmantasyonu meydana gelir. Hücre her biri membranla kaplı birçok apoptotik patiküle ayrılır. Komşu hücreler ya da fagositik hücrelerden tarafından bu apoptotik partiküller fagosite edilerek dokudan uzaklaştırılır [41,42].

Çizelge 2.6. Apoptoz ile Nekroz arasındaki farklar [42]

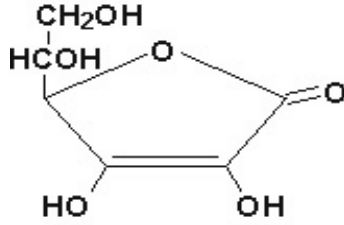
Özellik	Apoptoz	Nekroz
Dağılım	Dokuda tek tek dağılmış hücrelerde ölüm	Komşu hücre gruplarının ölümü
Nedenler	Fizyolojik veya patolojik	Her zaman patolojik
İnflamasyon	Yok	Genellikle vardır.
Işık mikroskobu	Kresentrik görünüm Eozinofilik partikül	Çekirdekte piknoz, karyolizis
Elektron mikroskobu	Volüm kaybı, apoptotik cisimcikler	Hücrede şişme, membranda yırtılma, kromatinde erime, kayıp
Fagositoz	Komşu ve fagositik hücreler	Mononükleer hücreler
Mekanizma	Makromolekül sentezini gerektiren aktif hücresel yıkım	Kimyasal ya da yapısal parçalanma

2.7. Askorbik Asit

2.7.1. Askorbik asidin kimyasal yapısı

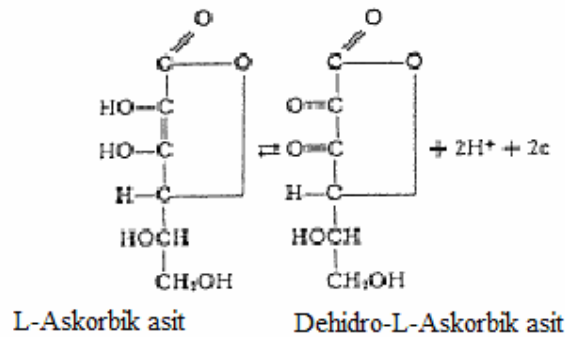
Askorbik asit olarak bilinen C vitamininin yaşam için gerekliliği 17.yy başından beri bilinmektedir. Askorbik asit yetersizliğinin yol açtığı skorbüte benzer bir hastalık ilk olarak eski Mısırlılar tarafından bulunmuştur. Szent-Georgy ve King, 1932 yılında spesifik antiskorbütik faktör olarak askorbik asidi tanımlamışlardır [43].

Askorbik asit, kapalı formülü $C_6H_8O_6$ olan bir ketolaktondur. Kimyasal yapısı monosakkaritlere benzer. L-askorbik asit ve D- askorbik asit olmak üzere iki şekli vardır. D-askorbik asit inaktiftir. L izomeri ise biyolojik olarak aktif formudur. C vitamini denildiği zaman aktif olan L-askorbik asit anlaşılır [43,44].



Şekil 2.3. L- Askorbik Asidin yapısı [44]

Askorbik asit, kuvvetli indirgen bir bileşiktir. Bu özellik enediol (C-2, C-3) hidroksil gruplarından hidrojen atomlarının ayrışmasına bağlıdır. Oksitlenmenin ilk ve reversible ürünü, dehidroaskorbik asittir. Askorbik asit oksitlenmekle iki hidrojen atomunu yitirir ve dehidroaskorbik asit oluşur. Bu reaksiyon geri dönüşümlü olduğundan uygun koşullar altında dehidroaskorbik asidin redüksiyona uğramasıyla yeniden askorbik asit oluşur. Her iki şekilde fizyolojik olarak aktiftir. Hem askorbik asit hem de dehidroaskorbik asit vücut doku ve sıvılarında bulunur.

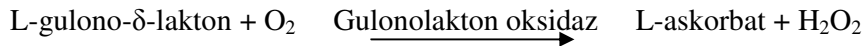


Şekil 2.4. Dehidroaskorbik Asit [44].

Dehidroaskorbik asidin ileri oksidasyonu ile di-ketoglukonik asit, okzalik ve treonik asit oluşur. Bu son ürünler geri dönüşümlü değildir. Bu son ürünlerden, eritorbik asit

haricindekilerin, C vitaminine benzer etkisi yoktur. Eritorbik asit L-askorbik asidin epimeridir, yiyeceklerde koruyucu olarak yaygın şekilde kullanılır. Çok etkili bir indirgen olan C vitamini beyaz-çok açık sarı renkte kristal bir maddedir. Bu vitaminin çok hafif özel bir kokusu vardır. Ekşi tatta ve asit reaksiyondadır. C vitamininin asit özelliği enol grubundaki hidrojen atomlarından birinin dissosiasyonundan ileri gelir. Optikçe aktiftir. Kristal C vitamini oldukça dayanıklıdır. Sulu solüsyonlarında ise havanın ve özellikle ışığın etkisiyle bozulabilmektedir. Ortamın asit olması askorbik asidin dayanıklılığını artırır. Oksidatif bozulmayı bazı metaller özellikle bakır ve demir hızlandırır. Isıya ve havaya maruz kalma vitamini olumsuz etkiler. Donmanın ise bu vitamin üzerinde bozucu etkisi yoktur [43].

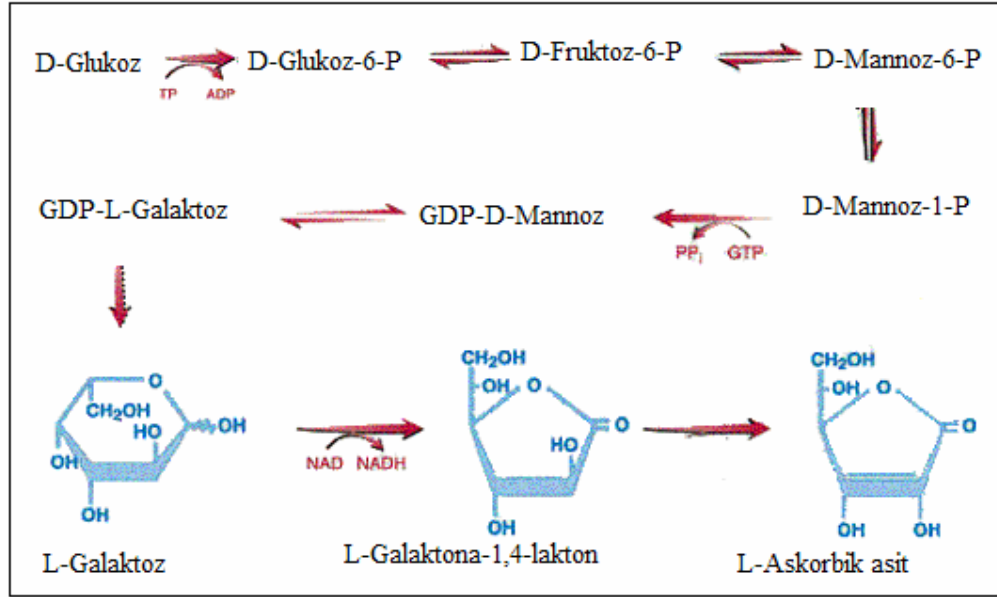
Askorbik asit bitkilerde ve hayvanlarda sentezlenebilir. Fakat insanlar, primatlar, kobaylar, yarasalar ve bazı balık türlerinde sentezlenemez. Bunun sebebi bunlarda askorbik asit biyosentezinin son reaksiyonunu katalizleyen gulonolakton oksidaz enziminin olmayışıdır. Bu yüzden insanlarda C vitaminin dışarıdan alınması zorunludur [44,45].



Hayvanlardaki gulonolakton oksidazın kaybı rastgele bir mutasyon sonucu olabilir. Çünkü diyetle C vitamini alımı bir dezavantaj değildir. Hatta H₂O₂ üreten bir enzim olan gulonolakton oksidazın olmaması bir avantaj olabilir.

2.7.2. Askorbik asidin biyosentezi

C vitamini sentezi, glukozdan türevlenen glukonik asit veya galaktonik asit üzerinden yürür. Bu metabolik yol ile glukronik asitten C vitamini sentezi için 3 enzime gereksinimi vardır. Bu enzimler karaciğer mikrozomal fraksiyonlarından izole edilmiştir [46,47].



Şekil 2.5. Askorbik asidin biyosentezi [45]

Askorbat amfibialarda, sürüngenlerde ve kuşların filogenetik olarak eski türlerinde böbrekte sentezlenirken, memelilerde ve gelişmiş kuşlarda karaciğerde sentezlenir [48].

2.7.3. Askorbik asidin kaynakları

Suda eriyen vitaminlerden olan askorbik asit özellikle yeşil renkli taze sebze, meyve ve turunçgillerde bol miktarda bulunur. Meyveler arasında en çok C vitamini içerenler, portakal, limon, greyfurt, domates, ananas, çilek ve frenk üzümüdür. Bunlara kıyasla C vitaminini daha az miktarda elma, kiraz, armut ve erik içermektedir. Bu meyvelerin özellikle turunçgillerin ve domatesin iç kısımlarından daha çok kabuk kısımları C vitamini bakımından daha zengindir. Sebzelerden ise özellikle taze yaban gülü, karnıbahar, lahana, ıspanak, kuru soğan, biber, tere, maydanoz ve yer elması C vitamini bakımından en zengin kaynaklardır. C vitamini, korus luteum ve adrenal kortekste çok fazla bulunmasına karşın bunların besinlerle alınımı söz konusu değildir. Bu vitamin az miktarda karaciğer ve çeşitli hayvansal kaynaklı etlerde (domuz, sığır, koyun, dana) bulunmaktadır. Bazı tür

balıklarda, özellikle de pisi balığında C vitamini miktarı oldukça fazladır. Sütteki C vitamini miktarı çok azdır. Anne sütünde inek sütüne göre yaklaşık olarak iki misli daha fazladır.

Sebze ve meyvelerin de çoğunda C oksidaz denilen C vitamininin oksidasyonunu hızlandıran bir enzim vardır. Bu enzimin etkisiyle birçok sebze ve meyvedeki vitamin kolaylıkla oksidasyona uğrayarak bozular. Oysa hayvansal organizmalarda önemli derecede C vitamini kaybı olmaz. Çünkü proteinler, amino asitler ve glutasyon, askorbik asidi oksidasyondan koruyucu etki yapar [50].

2.7.4. Askorbik asidin absorpsiyon ve transportu

Askorbik asit ince bağırsaktan kolayca absorbe olur. Buradan alınan askorbik asit kan dolaşımına ve buradan da çeşitli doku ve organlara gider. İnsanlarda absorpsiyonun maksimum olduğu yer jejunum, kobaylarda ise ileumdur. İnsanda askorbik asit gastrointestinal sistemde enerji gerektiren sodyum (Na^+) bağımlı aktif transport mekanizması ile absorbe olur. Sıçan ve hamsterlarda ise sodyum bağımsız intestinal absorpsiyonla alınır [46-48].

Hem askorbat hem de dehidroaskorbat ağızdaki mukozal hücrelerden de taşıyıcı aracılıklı pasif difüzyonla absorbe olur. Mukozal konsantrasyon 6mmol/L 'den büyük olduğu zaman askorbik asit emiliminde doygunluk meydana gelir. Bu durum askorbik asidin artmış alımına karşın emilimindeki azalmayı açıklar. Aşırı askorbik asit alımı osmotik diyareye sebep olur. Dehidroaskorbik asit, askorbik asitten daha kolay absorblanır. Böylece askorbik asitten dehidroaskorbik asite dönüşüm izlenebilir ve bağırsaktan emildikten sonra dehidroaskorbik asit tekrar askorbik asite indirgenir.

Vücuttaki dağılışı dokuların metabolik aktivitelerine göre değişmektedir. Adrenal bez, hipofiz, korpus luteum, timus bezleri ve barsak duvarında askorbik asit yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Buralarda toplanan askorbik asit daha çok dokuların gereksinimini karşılar. İnsanlarda yaygın alımda diyet askorbatının % 80-90'ı

absorbe edilmektedir (100 mg/gün'e kadar). Günde 75 mg ve daha yüksek dozlarda C vitamini verildiğinde vücut bu vitamin bakımından doygun hale gelir. Doygunluk halinde plazmadaki C vitamini konsantrasyonu yaklaşık 1,4 mg/100ml kadardır. Eritrositlerde plazma seviyesinin 1-2 katı lökositlerde ise 10-80 katı askorbik asit bulunur [49].

Askorbik asidin büyük bölümü plazmada serbest olarak bir kısmı da albumine bağlı olarak taşınır. Askorbik asidin %5'lik bölümü dehidroaskorbik asit formunda bulunur. Hücrelerdeki askorbik asit konsantrasyonu, kandaki düzeyinden 3-10 kat daha yüksektir. Nötrofil ve fibroblastlarda askorbik asit ve dehidroaskorbik asit iki farklı mekanizma ile taşınır. Dehidroaskorbik asidin taşınımı glukoz taşıyıcılarını içeren kolaylaştırılmış mekanizma ile ilişkilidir fakat sodyum bağımlı değildir. Askorbik asit taşınımı sodyum-askorbik asit aracılı taşıyıcılarla olur.

Diyabetik hiperglisemide görülen yüksek glukoz konsantrasyonları, askorbik asit kullanımını belirgin şekilde inhibe etmektedir. Çoğu dokuda, plazmadan alınıp için tercih edilen form askorbattır. Fakat eritrositlerde ve beyaz kan hücrelerinde tercih edilen form dehidroaskorbik asittir. Lökositlerde redüksiyon NADPH bağımlı iken, eritrositlerde dehidroaskorbat glutasyon bağımlı dehidroksiaskorbat redüktaz tarafından askorbata redüklenmektedir. Lökositler, askorbata konsantre etme yeteneğine sahiptir. Lökosit hücre askorbik asit içeriği, C vitamininin besinsel durum indeksi olarak kullanılmaktadır [50,51].

2.7.5. Askorbik asidin metabolizması

Askorbat, glukuronik asit metabolizmasını gulonolakton yolağında bir ara üründür. Dehidroaskorbat hidrasyona uğrayarak dioksoglutanata dönüşebilmekte ve ksilozo dekarboksile olabilmektedir. Böylece pentoz fosfat yolağı ile merkezi karbonhidrat metabolik yollarına giriş için bir yol sağlanmaktadır.

2.7.6. Askorbik asidin katabolizması

İnsanlarda idrarla atılan askorbik asidin son ürünü ya değişmemiş askorbik asit ya da dehidroaskorbat ve dioksoglutanattır. Askorbat ve dehidroaskorbat sodyum-bağımsız kolaylaştırılmış difüzyon ile glomerulustan süzülmekte, sonra reabsorbe edilmektedir. Reabsorbe edilen dehidroaskorbat, böbrekte askorbata redüklenmektedir. Radyoaktif bulgulara göre dışarıdan verilen askorbik asidin bir kısmının serbest kalmasına karşılık önemli bir kısmının da proteinlere bağlanarak depolandığı kabul edilmektedir. Karaciğerdeki askorbik asidin yaklaşık %20'sinin oldukça dayanıklı bir bileşen olan askorbik asit-2-sülfat bileşiminde olduğu saptanmıştır. Bunun karaciğerde ve belki de başka dokularda bir yedeklenme şekli ve askorbik asidin aktif bir metaboliti olabileceği düşünülmektedir. Nitekim farelerin karaciğerinde, dalakta ve böbrek üstünde hatta insan idrarında bile var olduğu gösterilmiştir. Alınan askorbatın %25 kadarı normal olarak okzalit şeklinde % 40'luk kısmından sorumlu bulunmaktadır.

Vitamin C en çok idrar ile daha az miktarlarda ise feçes, ter ve sütle atılır. Böbreklerden itrahi için tıpkı glukoz için olduğu gibi eşik değeri söz konusudur ve bu eşik değer doygunluk konsantrasyonuna aşağı yukarı eşittir. Vücut içinde bulunan normal C vitamini depoları hızla tüketilemez. Normal durumda vücuttaki yarılanma ömrü yaklaşık 16 gün olarak hesaplanmıştır. Fare ve kobaylarda ise radyoaktif askorbik asidin yarılanma süresi 3-4 gün olarak bulunmuştur. İdrarla atılan C vitamini miktarı, dokuların bu vitamin ile doymuşluk dereceleri hakkında fikir verebilmektedir [51,52].

2.7.7. Askorbik asidin fonksiyonları

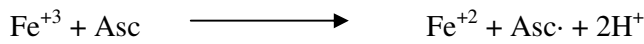
Vitaminlerin insan sağlığı ve beslenme açısından önemi hücrelerde yürüyen metabolik reaksiyonlarla ilişkisinden kaynaklanmaktadır. C vitamini birçok biyolojik fonksiyona sahiptir.

Askorbik asit güçlü bir indirgeyicidir. Dehidroaskorbik asit ile bir redoks sistem oluşturur. Standart şartlarda oksidan ve redüktan kapasite eşittir. Ancak fizyolojik şartlarda bu eşitlik sağlanamadığı için askorbik asit elektron vericisi olarak görev yapar. Bu özelliğinden dolayı biyolojik sistemlerde askorbik asidin en önemli fonksiyonu hidrojen taşıyıcısı olarak rol oynamasıdır.

Askorbik asit suda çözünen süperoksit, hidroksil radikalleri ve singlet oksijen ile direkt olarak reaksiyona giren zincir kıran bir antioksidandır [53,54].

Askorbat, sulu peroksil radikalleri ve aktif polimorfonükleer lökositlerden salınan oksidanlarca indüklenen peroksidatif hasarı önleme yeteneğine sahiptir. Plazma diğer antioksidanlara sahip olsa bile askorbik asitten yoksunsa lipitlerde oksidatif hasar meydana gelir.

Askorbik asidin diğer bir özelliği, antioksidan etkisi yanında prooksidan etki de göstermesidir. Askorbik asit metal iyonları varlığında prooksidan gibi rol oynar. Askorbik asit, ferri demiri (Fe^{+3}) ferro demire (Fe^{+2}) indirgeyen süperoksit radikali dışındaki tek sellüler ajandır. Bu yolla askorbat, proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan indirgeyerek fenton reaksiyonunda hidrojen peroksitle etkileşmeye uygun olan ferro demire dönüştürür. Yani süperoksit üretimine katkıda bulunur. Bu özelliğinden dolayı askorbik asit serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalizörü veya bir prooksidan olarak değerlendirilir [55].



Askorbik asit, E vitamini yenilenmesinde görev almaktadır. Askorbat radikali (semidehidroaskorbik asit) NAD tarafından enzimatik olarak yeniden redüksiyona uğratarak askorbik aside dönüşür. Bu mekanizmayla E vitaminin antioksidan fonksiyonları sürekli hale getirilir [56].

Glutasyon (GSH) birçok hücrel olayda önemli rol oynayan bir tripeptittir. Hücrelerin serbest oksijen radikallerine karşı korunması hücre içi GSH sistemine bağlıdır. Askorbik asit, E vitaminini redükte forma çevirirken kendisinde oksitlenerek DHA şekline çevrilir. GSH, DHA'yı rejenere ederek askorbik asidin yenilenmesini sağlar. Bu nedenle GSH ile DHA arasında non-enzimatik bir etkileşim olduğu ileri sürülmekte ve bir redoks potansiyeli düşünülmektedir. GSH ve DHA arasındaki spontan non-enzimatik reaksiyonlar askorbik asidin hücrel konsantrasyonunun sağlanmasında önemlidir ve olasılıkla antioksidan reaksiyonlara katılan askorbik asidin tüketimini engellemektedir [59].

Askorbik asit organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. Kollojen sentezinde lizin ve prolinin hidroksilasyonu için gereklidir. Kemiğin organik matriksi kollojen içerdiğinden kemik oluşumu için askorbik asidin varlığı önemlidir. Kapiller damar çeperinin temel yapı taşında kollojen yer aldığından C vitamini eksikliği frajiliteye de yol açar [59].

Askorbik asit, tirozinden epinefrin sentezinin dopamin β hidroksilaz basamağında ve lizinden karnitin sentezinde rol alır. Katekolamin sentezinde dopamin β -monooksijenaz reaksiyonunda kofaktör olarak etkilidir [56].

Askorbik asit kan merkezlerini uyararak alyuvarların yapım ve olgunlaşmasında etkilidir [57].

Demirin emiliminde enzimatik olmayan bir yol ile indirgeyici bir rol oynar. Midede ferri demiri ferro demire indirgeyerek emiliminde görev alır. Askorbik asit yalnız demirin emilimini değil aynı zamanda demirin kan yapımına katılmasını da kolaylaştırır. İmmünite ve yara iyileşmesinde de etkilidir [59].

Askorbik asidin önemli fonksiyonlarından biri de infeksiyon hastalıklarına karşı organizmanın direncini artırıcı rolü bulunmasıdır. Bu nedenle bu vitamine antienfeksiyöz vitamin de denmiştir. Bu vitamin antienfeksiyöz etkisini toksinleri inaktive etmek, antikorların yapımını kolaylaştırmak ve lökositlerin bakterileri

fagosit etme yeteneklerini artırarak yapar. Bundan başka bazı bakterilerin (boğmaca, difteri) etkilerini engelleyici veya yok edici etkisi de vardır [59].

Askorbik asidin fagositoz için de önemli olduğu gösterilmiştir. Solunumsal patlama sırasında nötrofiller C vitamini alırlar ve aktivasyonu takiben C vitamini konsantrasyonları azalır. Solunumsal patlama sırasında, reaktif moleküllerin çevreye yayılarak mutasyonlara, hücre hasarına, inflamasyona sebep olurlar. Askorbik asit reaktif bakterisidal moleküllerin intrasellüler konsantrasyonlarında azalmaya sebep olmadan oksidatif parçalanma ürünlerinin zarar verici etkilerini engeller.

Askorbatın sinir sisteminde antioksidan rolü vardır. Yapılan çalışmalarda diyet ile yüksek miktarda C vitamini alınımı ve kanda yüksek düzeyde askorbat bulunmasının felçten ölüm riskini azalttığı tespit edilmiştir. Askorbat, insan BOS'undaki temel antioksidan parametredir. Spinal kord hasarı sonunda, spinal dokudaki askorbat konsantrasyonu azalır. Beyin askorbat düzeyi hiperoksi, iskemi ve iskemi-reperfüzyon sonrası büyük miktarda ve akut bir şekilde düşer. İskemiden sonra askorbat DHAA'ya okside olur ve infarktüs dokusunda DHAA konsantrasyonu azalır. DHAA sitotoksik özellikle nörotoksiktir. Askorbat iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan beyin hasarını azaltır. İnsandaki beyin ödemi tedavisinde hipertonic askorbat solusyonu başarı ile kullanılmıştır. Oksidatif streste beyin mitokondrisinde ilk tüketilen antioksidan askorbattır [54-60].

Arterioskleroz, hiperkolesterolemi, hipertansiyon gibi koroner ve periferel arterlerdeki endotelial işlev kaybına sebep olan hastalıklarda endoteldeki nitrik oksit türlerinin azalması, endotelial kaynaklı daralmaya neden olur. Akut veya kronik askorbik asit alımı bu hastalardaki hasarlı endotel kaynaklı daralmayı iyileştirir. Askorbik asidin bu mekanizması bilinmemektedir. Buna rağmen askorbik asidin antioksidan etkiyle nitrik oksitin sentezini artırdığı veya tüketilmesini azalttığı düşünülmektedir. C vitamini çeşitli hastalıklarda anormal damar duvarındaki lokal skorbüt etkiyi geri çevirir ve endotelial işlev kaybında endotel bağımlı vasodilatasyonu kolaylaştırır [49].

2.1.8. Askorbik asit eksikliği

İnsan ve hayvanlarda askorbik asit yetmezliğine ilişkin belirtiler görülebilir. Bu vitamin eksikliğinde insan ve bazı hayvanlarda skorbüt denilen hastalık ortaya çıkar. Bu hastalık diş eti kanaması, yaralar, süngerimsi diş etleri, diş kaybı, kan duvarlarının kolay zedelenmesi, eklemlerde şişme ve anemiyle karakterize edilir. Bu belirtilerin çoğu bağ dokusunda zayıflıkla sonuçlanan kollajenin hidroksilasyonundaki eksiklikle açıklanabilir.

Süt çocuklarında görülen skorbüte, Möller-Barlow hastalığı denir. Bu hastalık süt çocuklarında daha çok 6. aydan sonra görülebilir. En belirgin belirtisi bacaklarda ağrı ve duyarlılıktır. Erişkin skorbütü ise artık çok seyrek görülmektedir. Skorbüt ya yeter derecede C vitamini alınmamasından ya da organizmanın bu vitamene olan gereksiniminin harcama nedeniyle çok artmasından ileri gelir [4,59].

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Hücre Kültürü

Çalışmamızda L-929 fibroblast hücre kültürü kullanılmıştır.

Kullanılan Malzemeler

Hücre kültürü için; RPMI 1640 medium (Biological industries), L-glutamin solüsyonu (Biological industries), Penicilin-streptomycin solüsyonu (Biological industries), Trypsin-EDTA solüsyonu (Biological industries), 25 cm²'lik flasklar (Greiner), L-929 cell line (ATCC CCL 1) kullanılmıştır.

Hücre kültür ekiminde kullanılan medyumun hazırlanması

RPMI 1640 mediumun içine 2 ml L-glutamin, 1 ml penicilin-streptomycin solüsyonu konulup ve hafifçe çalkalanarak homojenize olması sağlandı.

Hücre kültürünün yapılması

Hücreler çözüldükten sonra 25 cm²'lik flasklara alındı ve üzerine hazırlanan hücre kültür medyumundan 3 ml ilave edilerek hafifçe çalkalandı. Hücre kültürleri %5'lik CO₂ içeren etüvde 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Invert mikroskop altında hazırlanan kültür ortamı kontrol edildi. Hücre kültür ekimini takiben invert mikroskopta 24 saat sonra hücrelerin canlılık durumu takip edildi. Sonraki günlerde ise kolonizasyon durumları izlendi. Üreyen hücreler flask zeminin yaklaşık %70-80'ini doldurduğunda pasaj denilen alt kültürleri oluşturma işlemi yapıldı. 72 adet alt kültür oluşturuldu.

3.2. Hücre kültürlerinde MDA, AA ve NO tayini

Hücre kültürleri AA, L-NAME ve H₂O₂ uygulanmak üzere 3 gruba ayrıldı. AA grubunda, hücre kültürlerine 1'er ml, 100, 500, 1000 µM konsantrasyonlarda (final konsantrasyon) AA verildikten sonra hücre kültürleri 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. L-NAME grubunda önce ortama 100, 500, 1000 µM konsantrasyonlarda AA eklendi ve 6 saat inkübasyona bırakıldı. Bu hücre kültürlerine 1 ml, 100 nM L-NAME eklendikten sonra 18 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Yine H₂O₂ grubuna önce AA uygulanarak 6 saat bekletildi. Daha sonra bu gruba 1 ml, 1mM H₂O₂ uygulanarak 18 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Tüm parametreler bakılmadan önce hücre kültürleri ön işleme tabi tutulup, süpernatantlar elde edildi.

Ön İşlem

Önce kültür ortamındaki medyum döküldü. Sonra hücreler tripsin-EDTA ile süspanse edildi. Her numune yaklaşık 1dk sonike edildikten sonra 18.000 g'de + 4°C'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatantlar elde edildi.

3.2.1. MDA düzeyinin tayini

Reaktifler

6M NaOH

2M HCl içinde 5 mM DNPH (Dinitrofenilhidrazin)

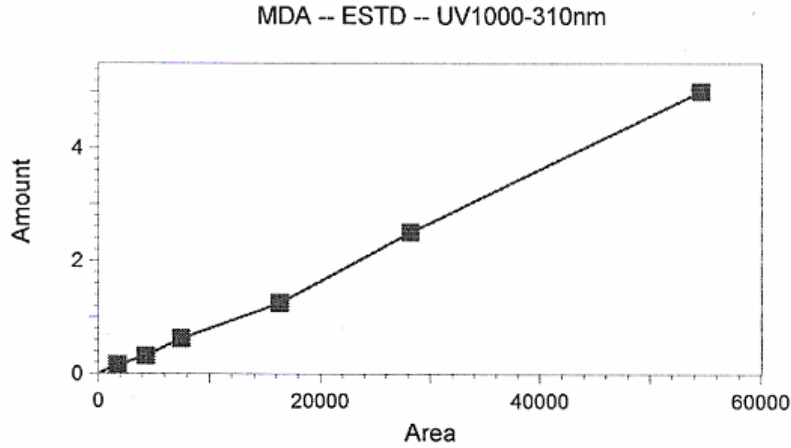
Numunelerin Hazırlanması ve Deneyin Yapılışı

Süpernatantlardan 1 ml alınıp, üzerine MDA'ya bağlı proteinlerin alkalın hidrolizi için 200µl 6 M NaOH eklendi. Numuneler sıcak su banyosunda 60°C'de 45 dk inkübasyona bırakıldı. Buradan 1 ml alınıp, proteinleri çöktürmek için üzerlerine 1ml asetonitril ilave edildi. 30 sn vortekslendikten sonra 15.000 g'de 10 dk santrifüj edildi. 250 µl berrak süpernatandan alınarak, üzerine 25µl DNPH eklendi. 0.2 µm'lik

filtrelerden süzildükten sonra sisteme verildi. Thermo Finnigan markalı HPLC’de, Asetonitril–Distile su–Asetik asitten oluşan (38:62:0.2, v/v/v) mobil fazda, UV dedektör kullanılarak 310 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Standart eğrinin çiziminde 0.15625, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5 ve 5 nmol/ml’lik konsantrasyonlarda standartlar kullanıldı. MDA miktarı, hazırlanan standart eğrisine göre hesaplandı [61].

Çizelge 3.1. MDA tayininde HPLC’ye ait sistem parametreleri ve çalışma koşulları

HPLC Modeli	Thermo Finnigan
Dedektör	UV
Mobil Faz	Asetonitril-Distile Su-Asetik Asit (38:62:0.2, v/v/v)
Analitik Kolon	ODS C18 125 x 4 mm RP/5µm PS
Dalga Boyu	310 nm
Enjeksiyon hacmi	20µL
Akış Hızı	1 ml/dk



Şekil 3.1. MDA standart eğrisi (nmol/mL)

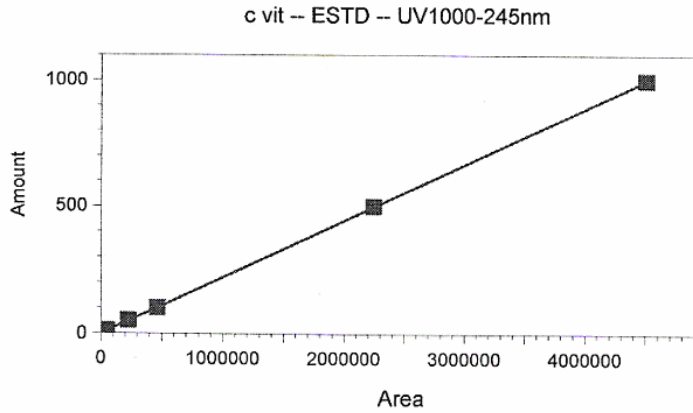
3.2.2. AA düzeyinin tayini

Numunelerin Hazırlanması ve Deneyin Yapılışı

Süpernatantlar ön işlemden sonra 0.2 µm'lik filtrelerden süzülerek sisteme verildi. Mobil fazı 0.2 M KH₂PO₄, 0.2 mM EDTA, meta fosforik asit (pH: 3.0) olan U.V dedektörlü HPLC'de 245 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Standart eğrisinin çiziminde 5, 10, 50 ve 100, 500 ve 1000 µmol/L'lik AA standartları kullanıldı. Ölçülen AA miktarı hazırlanan standart eğrisine göre hesaplandı [57].

Çizelge 3.2. AA tayininde HPLC'ye ait sistem parametreleri ve çalışma koşulları

HPLC Modeli	Thermo Finnigan
Dedektör	UV
Mobil Faz	0.2 M KH ₂ PO ₄ , 0.2 mM EDTA, meta fosforik asit (pH: 3.0)
Analitik Kolon	ODS C18 250 x 46 mm RP/5µm PS
Dalga Boyu	245 nm
Enjeksiyon hacmi	10µL
Akış Hızı	1 ml/dk



Şekil 3.2. AA standart eğrisi (µmol/L)

3.2.3. NO düzeyinin tayini

Reaktifler

- 0.1M'lık sodyum fosfat tamponu
- 1M HCl içinde 400 mg VCl₃
- % 0.2'lik NEDD (Griess I)
- % 10'luk fosforik asit içinde %2'lik sülfanilamid (Griess II)
- 6.4 mM'lık stok sodyum nitrit standartı günlük olarak 1/50 oranında dilüe edildi.

Numunelerin Hazırlanması ve NO Tayini

Ön işlemden elde edilen süpernatantlar 3500 RPM'de 15 dk santrifüj edildi. 200 µl süpernatana eşit hacimde VCl₃ eklenip nitrat nitrite indirildi ve 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Daha sonra tampon ve eşit hacimlerde karıştırılmış Griess I, II reaktifleri eklendi. Numunelerin optik dansitesi spektrofotometrede 540 nm'de, köre karşı okundu [66].

4. BULGULAR

Bu çalışmada L-929 fibroblast hücre kültürlerine AA, L-NAME ve H₂O₂ uygulanarak 3 farklı grup oluşturulmuştur

4.1. AA Grubu

Askorbik asit uygulanan hücre kültürü grubunda, spektrofotometrede ölçülen NO ve HPLC'de ölçülen AA ve MDA konsantrasyonları Çizelge 4.1'de, 10 μ M'lık AA standartını gösteren HPLC kromatogramı ise Şekil 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. AA grupları

	NO (μ M/10 ⁶ hücre)	MDA (μ M/10 ⁶ hücre)	AA (μ M/10 ⁶ hücre)
Kontrol	12.5 \pm 1.705	*	0.13 \pm 0.030
100 μ M C vitamini	6.24 \pm 1.330 ^a	*	0.17 \pm 0.026 ^a
500 μ M C vitamini	5.50 \pm 1.638 ^a	*	0.2 \pm 0.036 ^{a,b}
1000 μ M C vitamini	6.24 \pm 0.972 ^a	*	35.508 \pm 2.526 ^{a,b,c}

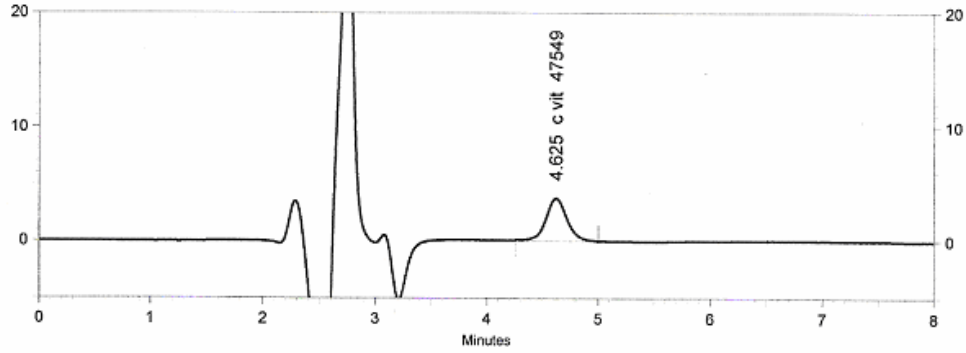
* Ölçüm sınırlarının altında

^ap<0.05, kontrol grubunun aynı değeriyle karşılaştırıldığında

^bp<0.05, 100 μ M C vitamini grubunun aynı değeriyle karşılaştırıldığında

^cp<0.05, 500 μ M C vitamini grubunun aynı değeriyle karşılaştırıldığında

Uygulanan 100-500 ve 1000 μ M konsantrasyonlardaki AA'nın nitrik oksit miktarını azalttığı, AA miktarını artırdığı bulunmuştur.



Şekil 4.1. AA'ya ait HPLC kromatogramı

4.2. L-NAME Grubu

Nitrik oksit inhibitörü olan L-NAME ve bu bileşikle birlikte AA uygulanan hücre kültürü grubunda ölçülen NO, MDA ve AA düzeyleri Çizelge-2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. L-NAME grupları

	NO ($\mu\text{M}/10^6$ hücre)	MDA ($\mu\text{M}/10^6$ hücre)	AA ($\mu\text{M}/10^6$ hücre)
Kontrol	12.5 ± 1.705	*	0.13 ± 0.030
100 nM L-NAME	8.75 ± 1.640^a	0.02 ± 0.009^a	* a
100 μM C vitamini + L-NAME	$16.42 \pm 1.344^{a,b}$	$0.10 \pm 0.024^{a,b}$	* a
500 μM C vitamini + L-NAME	$7.2 \pm 1.240^{a,c}$	* b,c	* a
1000 μM C vitamini + L-NAME	$12.02 \pm 1.328^{b,c,d}$	$0.108 \pm 0.026^{a,b,d}$	* a

* Ölçüm sınırlarının altında

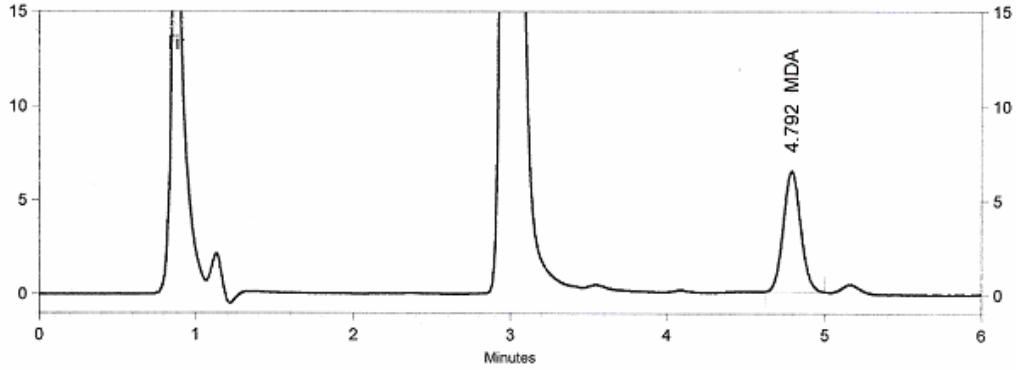
^ap<0.05, kontrol grubunun aynı değeriyle karşılaştırıldığında

^bp<0.05, 100 nM L-NAME grubunun aynı değeriyle karşılaştırıldığında

^cp<0.05, 100 μM C vitamini + L-NAME grubunun aynı değeriyle karşılaştırıldığında

^dp<0.05, 500 μM C vitamini + L-NAME grubunun aynı değeriyle karşılaştırıldığında

Hücre kültürlerine, 100nM L-NAME uygulandığında, NO miktarının azaldığı, MDA seviyelerinin yükseldiği saptanmıştır. Hücre kültürlerine 100µM AA ile 100nM L-NAME birlikte verildiğinde NO miktarının arttığı tespit edilmiş, 1000µM AA ile birlikte 100nM L-NAME uygulandığında ise MDA seviyelerinin arttığı görülmüştür. 5 nmol'lık MDA standartını gösteren HPLC kromatogramı Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. MDA'ya ait HPLC kromatogramı

4.3. H₂O₂ Grubu

H₂O₂ verilerek oksidatif strese maruz bırakılan bu grupta ölçülen MDA, NO ve AA seviyeleri Çizelge 4.3'te değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.3. H₂O₂ grupları

	NO ($\mu\text{M}/10^6$ hücre)	MDA ($\mu\text{M}/10^6$ hücre)	AA ($\mu\text{M}/10^6$ hücre)
Kontrol	12.5 \pm 1.705	*	0.13 \pm 0.030
1mM H ₂ O ₂	6.51 \pm 1.428 ^a	0.17 \pm 0.028 ^a	* ^a
100 μM C vitamini + H ₂ O ₂	5.0 \pm 1,320 ^a	0.05 \pm 0.023 ^b	* ^a
500 μM C vitamini + H ₂ O ₂	6.76 \pm 1.523 ^a	0.06 \pm 0.034 ^{a,b}	* ^a
1000 μM C vitamini + H ₂ O ₂	10.27 \pm 1.149 ^{b,c,d}	0.18 \pm 0,03 ^{a,c,}	10.50 \pm 1.371 ^{a,b,c,d}

* Ölçüm sınırlarının altında

^ap<0.05, kontrol grubunun aynı değeriyle karşılaştırıldığında

^bp<0.05, H₂O₂ grubunun aynı değeriyle karşılaştırıldığında

^cp<0.05, 100 μM C vitamini + H₂O₂ grubunun aynı değeriyle karşılaştırıldığında

^dp<0.05, 500 μM C vitamini + H₂O₂ grubunun aynı değeriyle karşılaştırıldığında

L-929 fibroblast hücre kültürlerine hem 1mM H₂O₂ uygulandığında hem de 500 μM AA ile 1mM H₂O₂ birlikte uygulandığında MDA seviyesi artmış, AA seviyesi azalmıştır. 1000 μM AA ile 1mM H₂O₂ birlikte verildiğinde AA'nın arttığı görülmüştür.

5. SONUÇ

Bu çalışmada farklı askorbik asit konsantrasyonlarının hücredeki metabolizması ve hücre yaşlanmasına yol açan oksidatif stresle mücadelede askorbik asidin rolünün araştırılması için L-929 fibroblast hücre kültürlerine askorbik asit, L-NAME ve H₂O₂ uygulanarak üç grup oluşturulmuş, bu hücre kültürlerinde NO, MDA ve AA düzeylerine bakılmıştır.

Nitrik oksit serbest radikal özelliğine sahip basit bir moleküldür. Reaktif özelliği nedeniyle NO, ortamda bulunan diğer serbest radikallerle tepkimeye girerek reaktif azot türlerini oluşturur. Oluşan bu yeni nitrojen oksit türleri de biyomoleküllerle etkileşerek hücrelerde oksidatif stres meydana getirirler [13,14].

Çalışmamızda uygulanan değişik konsantrasyonlardaki askorbik asidin doz bağımsız olarak nitrik oksit miktarını azalttığı bulunmuştur.

May ve ark.'ları endotel hücreler üzerinde yaptıkları bir çalışmada yüksek konsantrasyonlardaki NO'in oksidatif strese yol açtığını ve hücrelerdeki askorbik asit miktarını azalttığını görmüşlerdir. Buradan yola çıkarak yüksek konsantrasyonlardaki NO'in meydana getirdiği oksidan hasarın, askorbik asit uygulamasıyla önenebileceği sonucuna varmışlardır [62].

Polidori ve ark.'ları yaptıkları çalışmada uzun ve kısa süreli askorbik asit uygulamasının plazma C vitamini konsantrasyonlarını artırdığını bulmuşlardır [63]. Bu çalışma ile uyumlu olarak 100 ve 500µM askorbik asit uyguladığımız hücre kültürlerindeki askorbat miktarının arttığı, 1000µM askorbik asit uygulanan grupta ise kullanılamayan aşırı C vitamininin ortamda kaldığı saptanmıştır.

Çalışmamızda hücre kültürlerine, 100nM bir nitrik oksit sentaz inhibitörü olan L-NAME uygulandığında, L-NAME'in NOS'ı inhibe edici etkisini göstererek NO miktarını azalttığı, kimyasal bir madde olarak etki ederek de hücrelerde lipid peroksidasyonunu indükleyip, MDA seviyelerini yükselttiği tespit edilmiştir.

Nadeem ve ark.'ları ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada oksidatif hasarın, NO sentezini engelleyen L-NAME gibi NOS inhibitörleri ve antioksidan uygulamasıyla onarılabilineceğinden bahsetmişlerdir [64].

Hücre kültürlerine 100µM AA ile 100nM L-NAME birlikte uygulandığında nitrik oksit miktarının arttığı görülmüştür. Bunun düşük dozlarda L-NAME ile askorbik asidin birbirlerinin etkilerini antagonize etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. 1000µM AA ile birlikte 100nM L-NAME uygulandığında lipit peroksidasyonun bir ürünü olan MDA seviyelerinin arttığı görülmüş, bu sonucun C vitamininin prooksidan etkisinden kaynaklandığı tespit edilmiştir.

Paolini ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yapmış olduğu çalışmada yüksek doz C vitamini uygulamasının, prooksidan etki yaratarak oksidatif strese neden olduğunu göstermişlerdir [55].

H₂O₂ membrandan kolayca geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır. Serbest radikal olmadığı halde reaktif türler içinde yer alır. Lipit peroksidasyonunu başlatabilen en zararlı ve reaktif tür olan hidroksil radikalini oluşturabilme özelliğine sahiptir.

L-929 fibroblast hücre kültürlerine 1mM hidrojen peroksit uygulandığında, hidrojen peroksidin serbest radikal etkisinden dolayı lipit peroksidasyonu meydana gelmiş ve MDA seviyelerinin arttığı saptanmıştır. AA seviyelerinin ise güçlü bir antioksidan olarak lipit peroksidasyonunu önlemeye çalıştığı için düşmüştür. 500 µM AA ile 1mM H₂O₂ birlikte uygulandığında MDA seviyesi artmış, bu da askorbik asidin bir prooksidan olarak lipit peroksidasyonunu arttırdığını göstermiştir.

Van der Loo ve ark. genç ve yaşlı ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada C vitamininin lipit peroksidasyonun artmasına bağlı olarak azaldığını ve MDA miktarının ise arttığını bulmuşlardır [65].

Yaşlanma hücrelerden organlara kadar tüm yapılarda fonksiyonların azalmasıyla karakterize edilen karmaşık bir süreçtir. Yaşlanma sürecini açıklamada en yaygın

şekilde kabul görmüş teori, hücrenin yapı ve fonksiyonlarında hasara sebep olarak hücreyi yaşlanma sürecine götürdüğü ileri sürülen serbest radikal teorisi. Serbest oksijen radikalleri ve reaktif nitrojen türleri, hücrenin lipit, DNA ve protein gibi önemli bileşenlerine zarar vererek, hücrelerin yapı ve işlevlerini bozmakta ve hücrenel yaşlanmaya sebep olmaktadır [24,3].

Van der Loo ve ark. ile pek çok araştırmacının yapmış olduğu çalışmalarda yaşlanma sürecinin oksidatif stresle ilişkili olduğu belirtilip, C vitamini uygulamasının yaşlanmaya bağlı oksidan stresin önlenmesinde yararlı olabildiğini bildirmişlerdir [65].

Sonuç olarak serbest oksijen radikalleri ile reaktif nitrojen türleri hücrelerde oksidatif stres oluşturmaktadırlar. Oluşan stres, hücrelerin yapı ve işlevlerini bozarak hücrelerin yaşlanma sürecine girmelerine neden olmaktadır. Hücrelere güçlü bir antioksidan olan askorbik asit uygulaması, oksidatif strese bağlı hücre yaşlanmasını yavaşlatabilir. Ancak hücre yaşlanmasını tetikleyen birçok faktör olduğundan yaşlanma sürecinin tam olarak anlaşılabilmesi ve yavaşlatılabilmesi için ileri çalışmalara gerek duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Kılınç, A., Kılınç, K., “Nitrik oksitin biyolojik fonksiyonları ve toksik etkileri”, *Palme Yayıncılık*, Ankara, 1-9 (2003).
2. Akkuş, İ., “Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri”, *Mimoza Yayınevi*, Konya, 1-77 (1995).
3. Junqueira, V.C., Barros, S.M., Chan, S.S., Rodrigues, L., Giavarotti, L., “Aging and oxidative stress”, *Mol. Aspect Med.*, 25(1-2): 5-16 (2004).
4. Padayatty, S., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H., Corpe, C., Dutta, C.C., Levine, M., “Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention”, *J. Am. Coll. Nutr.*, 22(1): 18-35 (2003).
5. Aydın, A., Sosyal, A., İşimer, A., “Serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemi”, *Gata Basımevi*, Ankara, 48-87 (2001).
6. Cheeseman, K.H., Slater, T.F., “An introduction to free radical biochemistry”, *Br. Med. Bull.*, 49(3): 481-493 (1993).
7. Halliwell, B., “Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human”, *Am. J. Med.*, 91(3C): 14S-22S (1991).
8. Romero, F.J., BoschMorell, F., Romero, M.J., Janero, E.J., Romero, B., Marin, N., Roma, J., “Lipid peroxidation product and antioxidants in human disease”, *Environ. Health Perspect*, 106: 1229-1234 (1998).
9. Draper, H.H., Hadley, M.A., “Review of recent studies on metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde”, *Xenobiotica*, 20(9): 901-907 (1990).
10. Clifford, D.P., Repine, J.E., “Measurement of oxidizing radicals by polymorphonuclear leucocytes”, *Method. Enzymol.*, 105: 393-398 (1984).
11. Yılmaz, N., Solmaz, S., Kaya, M., “Nitrik oksidin insan organizmasındaki önemi”, *Arşiv*, 10: 178-184 (2001).
12. Özkan, M., Yüksekol, İ., “Nitrik oksit ve akciğerler”, *Toraks Dergisi*, 4(1): 88-94 (2003).
13. Moncada, S., Higgs, A., “The-arginine-nitric oxide pathway”, *N. Engl. J. Med.*, 329(27): 2002-2012 (1993).
14. Robbins, R.A., Grisham, M.B., “Molecules in focus nitric oxide”, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29: 857-860 (1993).

15. Snyder, S.H., "Biological roles of nitric oxide", *Sci. Am.*, 266(5): 68-71 (1992).
16. Erbaş, D., "Nitrik oksit: Fizyolojik önemi ve çeşitli hastalıklardaki rolü", *Klinik Gelişim*, 11: 376-380 (1998).
17. Yamamoto, T., Bing, R.J., "Nitric oxide donors", *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 225(3): 200-206 (2000).
18. Kiechle, F.L., Malinski, T., "Nitric oxide biochemistry, pathophysiology and detection", *Am. J. Clin. Pathol.*, 100(5): 567-575 (1993).
19. Haendeler, J., "Nitric oxide and endothelial cell aging", *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 62: 137-140 (2005).
20. Somers, M.S., Harrison, D.G. "Reactive oxygen species and control of vasomotor tone", *Curr. Hypertens. Rep.*, 1(1): 102-108 (1999).
21. Güneş, H.V., "Moleküler hücre biyolojisi", *Palme Yayınevi*, Ankara., 359-386 (2006).
22. Cutler, R.G., "Antioxidants and aging", *Am. J. Clin. Nutr.*, 53(1): 373S-379S (1991).
23. Artur, Y., Herbeth, B., Guemori, L., Leconte, L., Jeandel, E., Siest, G., "Age-related various of enzymatic defences against free radicals and peroxides", *Exs.*, 62: 359-367 (1992).
24. Beckman, K.B., Ames, B.N., "The free radical theory of aging matures", *Physiol. Rev.*, 78(2): 547-581 (1998).
25. Kasapoğlu, M., Özben, T., "Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging", *Exp. Gerontol.*, 36: 209-220 (2001).
26. Droge, W., "The free radical in regulation of physiological function", *Physiol. Rev.*, 82(1): 47-95 (2002).
27. Miquel, J., Economos, C., Fleming, J., Johnson, J.E. "Mitochondrial role in cell aging". *Exp. Gerontol.*, 15(6): 575-591 (1980).
28. Liang, F.Q., Godley, B.F., Oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: A possible mechanism for RPE aging and age-related macular degeneration", *Exp. Eye Res.*, 76(4): 397-403 (2003).
29. Sastre, J., Pallardo, F.V, Vina, J., "The role of mitochondrial oxidative stress in aging", *Free Radical Bio. Med.*, 35(1): 1-8 (2003).

30. Barja, G., "Endogenous oxidative stress: Relationship to aging, longevity and caloric restriction", *Ageing Res. Rev.*, 1(3): 397-411 (2002).
31. Burçak, G., Andican, G., "Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma", *Cerrahpaşa J. Med.*, 35: 159-169 (2004).
32. Başaran, A., "Telomer-telomeraz ve hücre yaşlanması", *Tıbbi Biyoloji Kongresi Özet Kitabı*, Denizli, 40-41 (2000).
33. Blackburn, E.H., "Telomerase", *Annu. Rev. Biochem.*, 53: 113-129 (1984).
34. Atlı, K., Bozcuk, N., "Telomer ve hücre yaşlanması", *Turkish Journal of Geriatrics.*, 5: 111-114 (2004).
35. Hayflick, L., "Aging under glass", *Mutat. Res.*, 256(2-6): 69-80 (1991).
36. Olovnikov, A.M., "A theory of marginotomy", *J. Theor. Biol.*, 41(1): 181-190 (1973).
37. Öztürk, F., "Apoptosis", *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 9: 143-148 (2002).
38. Öktem, S., Özhan, M., Özol, D., "Apoptosisin önemi", *Toraks Dergisi*, 2(1): 91-95 (2001).
39. Turgut, B., Demir, T., Çeliker, Ü., "Oftalmolojide apoptoz" *Fırat Tıp Dergisi*, 11(1): 6-11 (2006).
40. Kinloch, R.A., Treherme, J.M., Furness, L.M., "The pharmacology of apoptosis", *Trends Pharmacol. Sci.*, 20 (1): 35-42 (1999).
41. Thompson, C.B., "Apoptosis in fundamental immunology", *Lippincott Raven Publishers*, 22-26 (1999).
42. Hekim, N., "Apoptosis", *Kalıtımsal Hastalıklara Moleküler Tıp Açısından Bakış Sempozyumu*, 115-140 (2003).
43. Aras, K., Erse, G., Karalan, S., "Vitaminler", *Ankara Üniversitesi Basımevi*, Ankara, 96-100 (1976).
44. Decker, E.A., Clarkson, P.M., "Dietary sources and bioavailability of essential and antioxidants", *Amsterdam*, 334-337 (1999).
45. Levine, M., "New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid.", *New Engl. Med.*, 314: 892-902 (1986).

46. Sungurluoğlu, K., Ağca, M., “Kansere karşı hasta direncinin artırılmasında askorbik asidin etkileri”, *Optimal Tıp Dergisi*, 2:134-136 (1989).
47. Nelson, E.W., “Demonstration of saturation kinetics in the intestinal absorption of vitamin C in man and guinea pig”, *J. Clin. Pharm.*, 18 (7): 325-335 (1978).
48. Stevenson, N.R., “Active transport of L-ascorbic acid kinetics in the human ileum”, *Gastroenterology*, 67 (5): 952-956 (1974).
49. May, J.M., “How does ascorbic acid prevent endothelial dysfunction?”, *Free Radical Bio. Med.*, 28(9): 1421-1429 (2000).
50. Sauberlich, H.E., “Pharmacology of vitamin C”, *Annu. Rev. Nutr.*, 14: 371-391 (1994).
51. Niki, E., “Vitamin C an antioxidant”, *World Rev. Nutr. Diet*, 64: 1-30 (1991).
52. Niki, E., “Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals”, *Ann. J. Clin. Nutr.*, 54: 195-245 (1991).
53. Asard, H., May, J.M., Smirnoff, N., “Vitamin C Function and Biochemistry in animals and plants”, *Free Radical Bio. Med.*, 173-220 (2004).
54. Combs, G.F., “Vitamin C: Fundamental aspects in nutrition and health”, *Academic Press*, New York, 245-275 (1998).
55. Paolini, M., Pozetti, L., Pedulli, G.F., Marchesi, E., “The nature of prooxidant activity of vitamin C”, *Life Sci.*, 64(23): 273-278 (1999).
56. Aksoy, N., Vural, H., Sabuncu, T., Arslan, O., Aksoy, S., “Beneficial effect of vitamins C and E against oxidative stress in diabetic rats”, *Nutr. Res.*, 25: 625-630 (2005).
57. Emadi-Konjin, P., Verjee, Z., Levin, A.V., Adeli, K., “Measurement of intracellular vitamin C levels in human lymphocytes by reverse phase high performance liquid chromatography”, *Clin. Biochem.*, 38(5): 450-456 (2005).
58. Lykkesfelt, J., Moos, T., “Age-dependent change in vitamin C status: A phenomenon of maturation rather than of aging”, *Mech. Ageing Dev.*, 327-346 (2005).
59. Iqbal, K., Khan, A., “Biological significance of ascorbic acid in human health”, *Pakistan J. Nutr.*, 3: 5-13 (2004).

60. Michels, A.J., Joiser, N., Hagen, M.T., “Age-related decline of sodium-dependent ascorbic acid transport in isolated rat hepatocytes”, *Arch. Biochem. Biophys.*, 410: 112-120 (2003).
61. Türközkan, N., Erdamar, H., Seven, I., “Measurement of total malondialdehyde in plasma and tissues by high-performance liquid chromatography and thiobarbituric acid assay”, *Fırat Tıp Dergisi*, 11(2): 88-92 (2006).
62. May, J.M., Qu, Z., “Nitric oxide-induced oxidant stress in endothelial cells: amelioration by ascorbic acid”, *Arch. Biochem. Biophys.*, 429(1): 106-113 (2004).
63. Polidori, C.M., Mecocci, P., Levine, M., Frei, B., “Short-term and long-term Vitamin C supplementation in humans dose-dependently increases the resistance of plasma to ex vivo lipid peroxidation”, *Arch. Biochem. Biophys.*, 423(1): 109-115 (2004).
64. Nadeem, A., Masood, A., Giliani, R., Shah, Z.A., “Immobilization stress causes extra-cellular oxidant-antioxidant imbalance in rats: Restoration by L-NAME and vitamin E”, *Eur. Neuropharmacol.*, 16(4): 260-267 (2005).
65. Van Der Loo, B., Bachschmid, M., Spitzer, V., Brey, L., Ullrich, V., Lüscher, T.F., “Decreased plasma and tissue levels of vitamin C in rat model of aging: implications for antioxidative defense”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 303(2): 483-487 (2003).
66. Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok J.S. and Tannenbaum S.R., “Analyses of nitrate, nitrite and nitrate in biological fluids”, *Anal. Biochem.*, 126(1): 131-138 (1982).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : ALEM, Nihal
Uyruđu : TC
Dođum Yeri ve Tarihi : 09.08.1981. KIRKLARELİ
Medeni Hali : Bekar
Telefon : 0 (312) 268 07 71
e-mail : nihalalem@mynet.com

Eđitim

Derece	Eđitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Gazi Üniversitesi /Biyoloji	2004
Lise	Mehmetçik Lisesi	1999

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

Kitap okumak, müzik dinlemek.