



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ÇİNKO VE SELENYUMUN ANTİOKSİDAN
ÖZELLİKLERİNİN, OKSİDATİF STRES
İNDÜKLÜ DNA RADİKALLERİNİN
İMMÜN-SPİN YAKALAMA YÖNTEMİ
KULLANILARAK İNCELENMESİ

Vedia DELETİOĞLU

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Belma TURAN

2015 ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇİNKO VE SELENYUMUN ANTIOKSİDAN
ÖZELLİKLERİNİN, OKSİDATİF STRES
İNDÜKLÜ DNA RADİKALLERİNİN
İMMÜN-SPİN YAKALAMA YÖNTEMİ
KULLANILARAK İNCELENMESİ

Vedia DELETİOĞLU

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Belma TURAN

2015 ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyofizik Yüksek Lisans **Programı**
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans **Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 14/01/2015

Prof. Dr. Kamil Can AKÇALI
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Belma TURAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı

Prof. Dr. Arif Tanju ÖZÇELİKAY
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay Sayfası	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller ve Çizelgeler	viii
1.GİRİŞ	1
1.1. Serbest radikaller ve oksidatif stres	1
1.2. Serbest radikal oluşturan başlıca mekanizmalar	4
1.3. Oksijen radikallerinin reaktifliği	6
1.4. Oksidanların hücrel hasara etki mekanizmaları	10
1.5. Oksidatif stres ve kalp fonksiyonları ile ilişkisi	13
1.6. Oksidatif stres ve diyabet ile ilişkisi	17
1.7. Redoks sistemleri ve antioksidan enzimler	19
1.8. Serbest radikal tespit ve ölçme yöntemleri	21
1.9. Çinkonun biyolojik moleküllerle etkileşimi	27
1.10. Selenyumun biyolojik sistemlerdeki önemi	31
1.11. Hücrelerde hiperglisemi altında oto-oksidasyon ve süperoksit üretimi	34
1.12. Çalışmanın amacı	35
2. GEREÇ VE YÖNTEM	37
2.1. DNA-nitron bileşiklerinin <i>in vitro</i> oluşturulması	37
2.2. Çinko varlığında <i>in vitro</i> DNA-nitron bileşiklerinin oluşturulması ve gözlemlenmesi	38
2.3. Sıçanlarda metabolik sendrom oluşturulması	40
2.4. Kalp dokusundan protein elde edilmesi	41
2.5. Kontrol ve metabolik sendromlu sıçanlardan elde edilen kalp proteinlerinde oksidatif hasar oluşturulması	41

2.6. Hasar oluşturulmuş kalp proteinlerinin protein-nitron bileşiklerinin Western blotlama yöntemi ile görüntülenmesi	43
2.7. İstatiksel analizler	44
2.8. Kullanılan kimyasallar	44
3. BULGULAR	46
3.1. Hidrojen peroksit varlığında DNA-nitron bileşiği oluşümünün İmmuno-spin yakalama tekniği ile gösterilmesi	46
3.2. Çinko varlığında oluşturulan DNA-nitron bileşiklerine ait lüminesens yanıtlarının karşılaştırılması	48
3.3. Selenyum varlığında oluşturulan DNA-nitron bileşiklerine ait lüminesens yanıtlarının karşılaştırılması	51
3.4. Protein-nitron bileşikleri ile gerçekleştirilen Western blotlama bulguları	52
3.4.1. Sıçan kardiyomiyositlerinden izole edilen toplam proteinlerde protein-nitron oluşümünün Western blotlama ile gösterilmesi	53
3.4.2. $Zn_3(PO_4)_2$ varlığında oluşturulan protein-nitron bileşiklerine ait Western blotlama sonuçlarının değerlendirilmesi	56
3.4.3. Na_2SeO_3 varlığında oluşturulan protein-nitron bileşiklerine ait Western blotlama sonuçlarının değerlendirilmesi	57
4. TARTIŞMA	60
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	68
ÖZET	71
SUMMARY	73
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ	90

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının danışmanlığını üstlenen ve çalışmalarım için gerekli olan her türlü ilgi ve desteği büyük sabır ile gösteren sayın hocam Prof. Dr. Belma TURAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tanıdığım ilk andan itibaren bana kapısını her daim açık tutan, maddi ve manevi hiçbir zaman desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Kamil Can AKÇALI'ya, eğitimim sürecinde emeği geçen saygı değer hocam Prof. Dr. Mehmet UĞUR'a ayrıca teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, ERASMUS programı ile laboratuvarında çalışma olanağı bulduğum Doç. Dr. Mustafa ATALAY'a (Finlandiya-UEF) her türlü katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tez deneylerimde bana kendi çalışmalarından kaynak sağlayan ve her daim bütün sorularıma sabırla cevap veren sevgili çalışma arkadaşım Esmâ Nur Okatan'a, yüksek lisans eğitimim süresince güler yüzleri ve her daim bana birer abla ve ağabeylik yapan çalışma arkadaşlarım, Öğr. Gör. Figen Amber Çiçek, Dr. Erkan Tuncay, Seda Uysal ve Arş.Gör.Ayşegül Toy ve Dr. Gaye Hafez'e, ayrıca pozitif enerjisi ve güleryüzü ile engin bilgilerini benden asla sakınmayan Dr. Zeynep Tokçaaer Keskin'e çok teşekkür ederim.

Eğitim sürecimi güzel anılar ile doldurmamı sağlayan Biyofizik Anabilim Dalı çalışanları Havva Tavukçu, Mehmet Ali Özkul ve Süleyman Ergin Tuştaş'a sevgilerini ve anlayışlarını esirgemedikleri için teşekkürü borç bilirim.

Ailem, fiziken yanımda bulunamamaları da, aynı şehirdeymişiz ve her gün yanımdalar gibi sevgilerini hissettirdikleri ve verdikleri destek, sabır ve güç için minnettarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AGE	İleri glikasyon son ürünü
AME	Akut miyokardiyal enfarktüsü
AP-I	Aktivatör protein I
ATP	Adenozin trifosfat
BFB	Bromofenol mavisi
BSA	Bovine serum albumin
CAT	Katalaz
CoQ	Ubiquinol (Coenzim Q)
DMPO	5-5-dimetil-1-pirolin-N-oksit
dsDNA	Çift iplikli DNA
DTPA	Dietilen triamin penta asetik asit
DTT	DL-dithiothreitol
ESR , EPR	Elektron spin rezonans, Elektron paramagnetik rezonans
ETS	Elektron transfer sistemi
GSH	Glutatyon
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
GSH-redüktaz	Glutatyon redüktaz
HPLC	Yüksek performanslı likit kromatografi
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz
IST	Immuno-spin yakalama
KAH	Koroner arter hastalığı
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
MMP	Metalloproteinaz
MRI	Manyetik rezonans görüntüleme
MS	Mass spektrofotometri
MS/MS	Ard arda mass spektrofotometri
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NF-kB	Nükleer faktör kB
NMR	Nükleer manyetik rezonans

NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik asit sentetaz
OA	Oktanoik asit
OVA	Ovalbümin
PKC	Protein kinaz C
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri
PVDF	Poliviniliden florid
ROS	Reaktif oksijen türleri
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Se	Selenyum
ssDNA	Tek iplikli DNA
SOD	Süperoksit dismutaz
TBS	Tris-buffer-salin
TBS-T	Tris-buffer-salin+ Tween 20

ŞEKİLLER ve ÇİZELGELER

Şekil 1.1. Elektron transfer reaksiyonları ile oluşturulan oksidanları formasyonları şekilde (I) verilmiştir. (II) Süperoksit anyon radikali oluşum mekanizması, (III) moleküler oksijenden iki elektron azalması ve (IV) süperoksit anyon radikalinden bir elektron azalması sonucu H₂O₂ oluşum mekanizması, (V) moleküler oksijen, süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit arasındaki ilişki verilmektedir. 3

Şekil 1.2. Hidroksil radikal saldırısının DNA’da gerçekleştirdiği reaksiyonlar, (I) Cu⁺ katalizörlüğünde DNA’dan hidrojen çıkarma reaksiyonları sonucu DNA bağ kırıklarının oluşması; (II) Deoksi-guanozine hidrojen eklenmesi sonucu 8-hidroksi-deoksiguanozin oluşumu; (III) Hidroksil radikal saldırısının sonuçları (Cadenas, 2013). 8

Şekil 1.3. Mitokondrideki biyokimyasal reaksiyon sonucu serbest radikal oluşum şeması. 9

Şekil 1.4. Hidroksil radikallerinin oluşum şeması. 10

Şekil 1.5. Nitron bileşiklerinin tespit edilmesinde kullanılan metodlar. 26

Şekil 3.1. ELISA kullanılarak immuno-spin yakalama tekniği ile Cu²⁺ katalizörlüğünde farklı hidrojen peroksit (H₂O₂) konsantrasyonlarında (50, 100, 200 ve 400 µM) gerçekleştirilen DNA–nitron bileşiği sonuçlarının luminesens değişimi olarak gösterilmesi. 47

Şekil 3.2. ELISA kullanılarak immuno-spin yakalama tekniği ile Cu²⁺ katalizörlüğünde farklı hidrojen peroksit (H₂O₂) konsantrasyonlarında (50, 100, 200 ve 400 µM) gerçekleştirilen DNA–nitron bileşiği sonuçlarının ortalama (±SEM) değişim grafiği. 48

Şekil 3.3. İmmuno-spin yakalama tekniği kullanılarak çinko sülfatın [Zn₃(PO₄)₂] Cu²⁺ katalizörlüğünde 200 µM hidrojen peroksit (H₂O₂) konsantrasyonunda elde edilen DNA-nitron bileşiği üzerindeki etkilerinin (oksidant ve antioksidant) gösterilmesi. 49

Şekil 3.4. İmmuno-spin yakalama tekniği kullanılarak çinko sülfatın [Zn₃(PO₄)₂] Cu²⁺ katalizörlüğünde 200 µM hidrojen peroksit (H₂O₂) konsantrasyonunda elde edilen DNA-nitron bileşiği üzerindeki etkilerinin (oksidant ve antioksidant) ortalama (±SEM) luminesens değişimi olarak gösterilmesi. 50

Şekil 3.5. Immuno-spin yakalama tekniği kullanılarak sodyum selenitin [Na_2SeO_3] Cu^{2+} katalizörlüğünde 200 μM hidrojen peroksit (H_2O_2) konsantrasyonunda elde edilen DNA-nitron bileşiği üzerindeki etkilerinin (oksidant ve antioksidant) gösterilmesi. 51

Şekil 3.6. Immuno-spin yakalama tekniği kullanılarak sodyum selenitin [Na_2SeO_3] Cu^{2+} katalizörlüğünde 200 μM hidrojen peroksit (H_2O_2) konsantrasyonunda elde edilen DNA-nitron bileşiği üzerindeki etkilerinin (oksidan ve antioksidan) ortalama ($\pm\text{SEM}$) lüminesens değişimi olarak gösterilmesi. 52

Şekil 3.7. Kontrol ve metabolik sendromlu sıçan kalplerinden elde edilen proteinlerinde H_2O_2 'nin 50, 100, 200 μM konsantrasyonları ile oluşturulan protein-nitron bileşiklerinin immuno-spin yakalama yöntemi ile tespit edilmesi. 55

Şekil 3.8. Kontrol ve metabolik sendromlu sıçan kalplerinden elde edilen proteinlerinde 200 μM H_2O_2 ile oluşturulan protein-nitron bileşiklerinin $\text{Zn}_2(\text{PO}_4)_3$ bileşiğinin 50,100, 200 μM konsantrasyonları uygulandığında verdiği yanıtın immuno-spin yakalama yöntemi ile tespit edilmesi. 58

Şekil 3.9. Kontrol ve metabolik sendromlu sıçan kalplerinden elde edilen proteinlerinde 200 μM H_2O_2 ile oluşturulan protein-nitron bileşiklerinin Na_2SeO_3 bileşiğinin 50,100, 200 nM konsantrasyonları uygulandığında verdiği yanıtın immuno-spin yakalama yöntemi ile tespit edilmesi. 59

Tablo 1. DNA-nitron bileşikleri oluşumu esnasında hazırlanan örnekler. 39

Tablo 2. Çinko varlığında DNA-nitron bileşikleri oluşturmak amaçlı hazırlanan örnekler. 39

Tablo 3. Selenyum varlığında DNA-nitron bileşikleri oluşturmak amaçlı hazırlanan örnekler. 40

Tablo 4. Kontrol grubu protein-nitron bileşiklerini oluşturmak amaçlı hazırlanan bileşiklere ait konsantrasyon ve hacim tablosu. 42

Tablo 5. Çinko grubu protein-nitron bileşiklerini oluşturmak amaçlı hazırlanan bileşiklere ait konsantrasyon ve hacim tablosu. 42

Tablo 6. Selenyum grubu protein-nitron bileşiklerini oluşturmak amaçlı hazırlanan bileşiklere ait konsantrasyon ve hacim tablosu. 43

1. GİRİŞ

1.1. Serbest radikaller ve oksidatif stres

Genel tanım olarak serbest radikaller, bir elektronunu kaybetmiş bir oksijen atomu içeren moleküllerdir. Bu durum bu moleküllerin kararsız ve reaktif olmalarına neden olur. Yani, bu moleküller etraflarındaki diğer moleküllerin elektronlarına yüksek ilginlik (affinity) gösterirler. Örneğin, bu moleküller DNA ile etkileşerek fonksiyon bozukluğu, mutasyon ve kansere yol açabilmektedirler (Yerer ve Aydoğan, 2000). Ayrıca, serbest radikaller enzimler ve proteinlerle de etkileşerek, normal hücresel faaliyetleri bozabilmektedirler. Örneğin, kan damarlarında bulunan endotel hücrelerin zarlarında meydana gelen bu tür bir oluşum, atardamarların sertleşmesine, kalınlaşmasına ve sonucunda kalp krizi ve inme yol açabilmektedir (Halliwell ve ark., 1993). Serbest radikallerin kollejendeki proteinlerle etkileşmesi ise, protein molekülleri arasında çapraz bağlar oluşmasına ve dokularda sertleşmeye neden olabilmektedir (Ferrari, 1991). Hücreler karmaşık bir yapıya, işleve ve bir dizi metabolik sürece sahiptir. Bunların her birisi farklı radikaller üretebilir. Bu nedenle, tek bir hücre bile çok çeşitli serbest radikaller üretebilir.

Oksidatif stres olarak tanımlanan durum, canlı organizmalarda normalde oluşan ve belirli bir dozun üzerinde artması ile tehlikeli olabilen patolojik bir süreçtir. Bu patolojiye neden serbest radikal denilen moleküllerdir. Bir başka açıklama yolu ise, serbest radikallerin artması ve hücrelerde antioksidan seviyenin azalması veya her ikisi birden oluştuğunda ortaya çıkan ve hücreler için zararlı bir durum olan oksidatif stres (Akkuş,İ., 1995; Young,I.S., 2001; Halliwell,B., 1994), kısaca fizyolojik süreçlerin fizyopatolojik süreçlere dönüşmesi ile gözlenen bir durumdur. Oksidatif stres böylece, reaktif oksijen türlerinin üretilmesiyle biyolojik

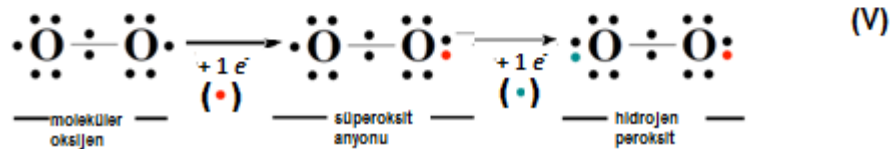
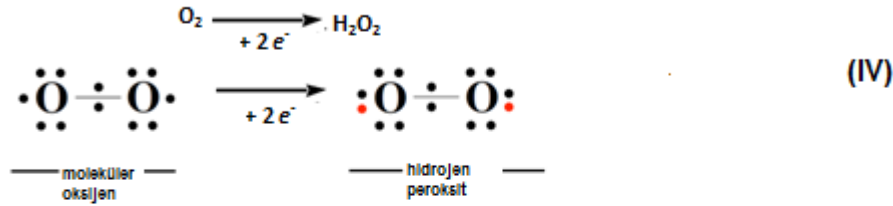
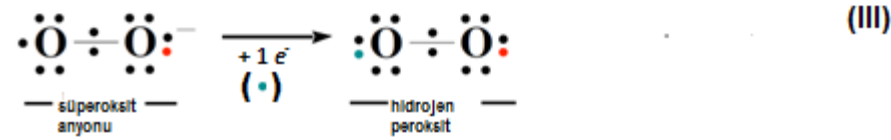
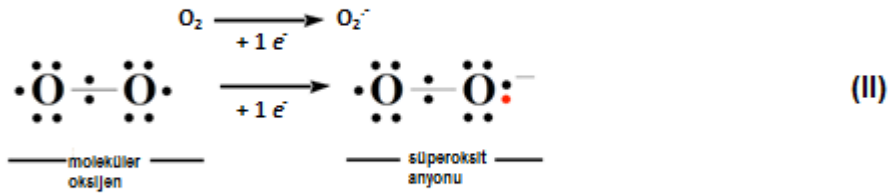
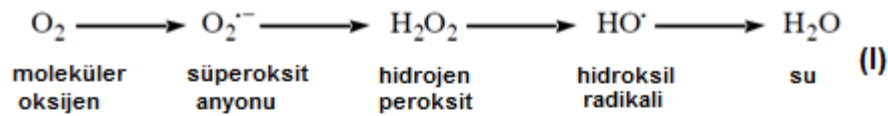
bir sistemin reaktif ara ürünleri kolayca detoksifiye etme (zehirsiz hale getirme) ya da oluşan hasarı onarma yeteneği arasındaki bir dengesizliği belirtir. Dokuların normal redoks (yükseltgenme-indirgenme) safhasındaki bozukluklar, peroksitlerin ve serbest radikallerin üretilmesiyle toksik etkilere neden olabilir (Nawar 1996).

Serbest radikallere ek olarak, hücrelerde meydana gelen reaktif oksijen türleri (ROS) de DNA, protein, karbonhidrat ve lipidler gibi biyolojik açıdan önemli moleküllere zarar verebilmektedir (Diplock 1998; Sabuncuoğlu ve Özgüneş, 2011). Serbest radikaller vücut dışından gelebileceği gibi insan metabolizmasının doğal bir sonucu olarak da oluşabilmektedir. Serbest radikallerin endojen olarak üretimi farklı yollarla gerçekleşmektedir (Koca ve Karadeniz, 2003). Buna karşılık, canlı organizmalar serbest radikallerin potansiyel yıkıcı etkilerine karşı kendilerini korumak için çeşitli mekanizmalara sahiptir. İnsanlarda oksidatif stres, akut veya kronik olmak üzere, birçok hastalıkla ilişkilidir. Örneğin, orak hücre anemisi, aterosklerosis (damar sertliği), Parkinson hastalığı, kalp yetmezliği, miyokard enfarktüsü, Alzheimer hastalığı, şizofreni, bipolar bozukluk, kırılğan X sendromu, kronik yorgunluk sendromu bunlar arasında yer almaktadır (Özdemir, G. 1993; Reilly ve ark.,1996; Vigue ve ark.,1993; Ferrari, R., 1991; Steinberg, D. 1991; Erenel ve ark., 1992). Fizyolojik şartlarda gerçekleşen pek çok hücrenel aktivite oksidan oluşumuna yol açmaktadır. Mitokondride gerçekleşmekte olan O₂'li solunum sırasında elektron transfer sistemi (ETS)'de, katabolik ve anabolik reaksiyonlar sırasında, endoplazmik retikulumda sitokrom P450 sisteminde meydana gelen elektron kayıpları sonucu oksidanlar oluşmaktadır (Cochrone, G.G., 1991; Bast, A. ve ark. 1991).

Serbest radikaller, pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötr olabilmektedirler. Serbest radikallerin oluşumları biyolojik sistemlerde en çok elektron transferi ile gerçekleşmektedir (Akkuş, 1995). Oksijen radikalleri veya reaktif oksijen türleri başlıca; (a) elektron transfer reaksiyonları, (b) enerji transfer reaksiyonlar vasıtası ile gerçekleşebilmektedir. Her iki tip reaksiyon da biyolojik çevre için çok önemli

olmakla birlikte farklı tipteki hücre hasarları ve toksisitenin bir parçası olarak bilinmektedir (Cadenas, 1989).

Süperoksit anyon radikali, çok reaktif bir tür olmamakla birlikte, kimyasal aktivitesi de hücrenin hangi kısmında bulunduğuna bağlıdır, daha güçlü bir oksidan olabilmesi protonlanıp perihidroksil radikali oluşturması ile mümkündür (Cadenas, 1989). Reaksiyon başlıca aşağıdaki basamaklarla gerçekleşmektedir:



Şekil 1.1. Elektron transfer reaksiyonları ile oluşturulan oksidanların formasyonları şekilde (I) verilmiştir. (II) Süperoksit anyon radikali oluşum mekanizması, (III) moleküler oksijenden iki elektron azalması ve (IV) süperoksit anyon radikalinden bir elektron azalması sonucu H_2O_2 oluşum mekanizması, (V) moleküler oksijen, süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit arasındaki ilişki verilmektedir (Cadenas, 1987).

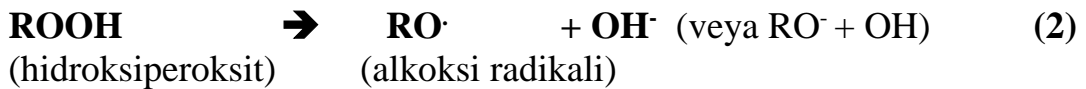
1.2. Serbest radikal oluşturan başlıca mekanizmalar

Serbest radikal oluşumu başlıca 3 mekanizma ile gerçekleşmekte olup bunlardan ilki olan otooksidasyon, atmosferik oksijenin katalizlediği tipik bir serbest radikal zincir reaksiyonudur (Nawar, 1996). Serbest radikallerin oksijenle reaksiyonu oldukça hızlı gerçekleşmektedir ve bu reaksiyonların başlangıcı için birçok mekanizma tanımlanmıştır. Özellikle çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) ve fosfolipidler otooksidasyona eğilim göstermektedir. Otooksidasyonda ilk oluşan ana ürünlerin hidroksiperoksit (ROOH) ürünleri olduğu gösterilmiştir (Porter, 1985). Hidroksiperoksitlerin bir zincir reaksiyonunu başlatabilmesi için üç temel mekanizma önerilmiştir (Foote, 1985);

(A) Hidroksiperoksit zincir reaksiyona katılabilecek bir peroksi radikalini (ROO·) oluşturmak üzere bazı kaynaklardan gelen başlatıcı bir radikal (X·) ile reaksiyona girebilmektedir. Bu reaksiyon başlıca aşağıdaki şekilde gerçekleşmektedir.



(B) Hidroksiperoksit bir metal iyonu veya farklı bir indirgenle alkoksi (RO·) radikalini (veya daha az olasılıkla hidroksi (·OH) radikalini) oluşturmak üzere indirgenebilmektedir:



(C) Diğer mekanizmalara göre daha az önemli olmakla birlikte, yüksek sıcaklıklardan daha ziyada oda sıcaklıklarında hidroksiperoksitteki O-O bağı parçalanarak alkoksi ve hidroksi radikallerine dönüşebilmektedir :



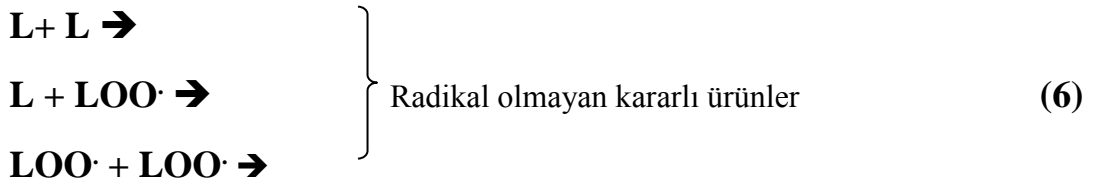
Serbest radikal oluşumunu gerçekleştiren önemli mekanizmalardan bir diğeri olan lipid oksidasyonu, aşağıdaki şemada belirtildiği üzere başlangıç, ilerleme ve sonuç aşamalarından oluşmaktadır (Porter, 1985):



Başlangıç aşamasında başlatıcı bir radikal (X) ile yağ asiti (LH) substratının reaksiyonu sonucu H atomu transferi yoluyla bir lipid radikali (L) oluşmaktadır.



İlerleme aşamasında, oluşan L' radikaline oksijen eklenmesi ile birlikte peroksi radikali (LOO·) meydana gelmekte ve bu peroksi radikali diğeri bir yağ asidi molekülünden ayrılan bir hidrojen atomu ile birleşerek tekrar hidroksiperoksitlere ve yeni lipid radikallerine dönüşmektedir.



Sonuç aşamasında, oluşan radikaller birbirleriyle reaksiyona girerek radikal olmayan ester, eter, aldehit, keton ve alkol gibi kararlı bozunma ürünlerine dönüşmektedir (Porter, 1985).

1.3. Oksijen radikalinin reaktivitesi

Çeşitli reaktif türlerin kimyasal reaktivitesi, serbest radikal karakterinde olup olmaması durumlarına bakılmaksızın büyük ölçüde değişiklik göstermekte ve lipidler, nükleik asitler, proteinler ve karbonhidratlardan oluşan tüm hücre bileşenleri içerisinde yer alıp; oksijen, nitrojen, karbon ve sülfür merkezli reaktif türleri ile hasara neden olabilmektedir. Serbest radikal oluşumunun artması durumu oksidatif stresi tetiklemektedir (Berk ve ark. 2008). Bu durumda oksidatif stres, biyolojik sistemlerde pro-oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dengenin pro-oksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanmaktadır.

Hücreler fizyolojik koşullarda, antioksidan savunma sistemi aracılığı ile hafif oksidatif stresi tolere edebilmektedir. Yani, tüm biyolojik hücreler, normal koşullar altında tolere edilebilir seviyede oksidatif stres altındadır. Ancak, hücre içi savunma sistemlerinin yeterli olmadığı durumlarda, oksidatif stresin tanımında da belirtildiği üzere reaktif oksijen türleri (ROS) ile antioksidanlar arasındaki dengenin bozulmasına ve böylece hücrelerde makromoleküller zarar görmektedir. (Gutteridge,1994; Zadak ve ark., 2009; Berger, 2005; Halliwell ve Whiteman, 2004; Halliwell ve Gutteridge, 1989; Wildburger ve ark., 2009; Sabuncuoğlu ve ark., 2011)

Bilindiği gibi, hidrojen peroksit molekülü bir serbest radikal olmamasına karşın, oksidan olarak davranabilmektedir. Bunun nedeni, hidrojen peroksidin reaktivitesi biyolojik sistemlerde membranları geçerek uzun mesafe ilerleyebilme kabiliyetine ve oldukça yüksek reaktiviteye sahip olan hidroksil radikaline (HO \cdot) dönüşüp homolitik klavaj yolu ile geçiş metalleriyle reaksiyona girme özelliğine bağlıdır.

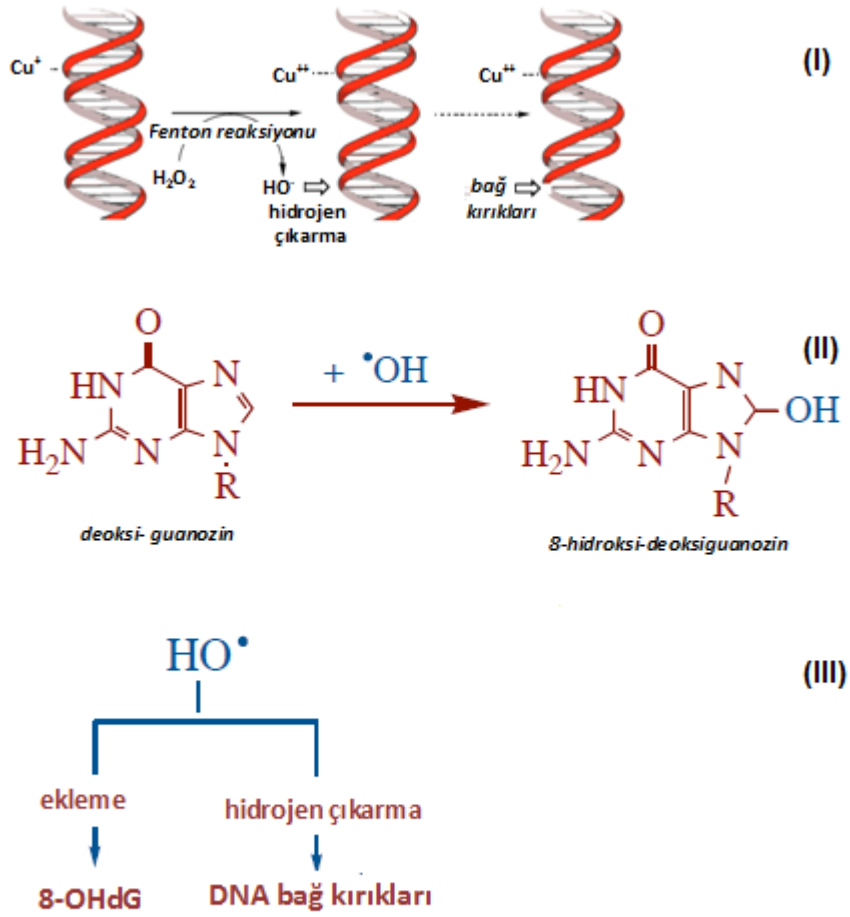
En güçlü oksidan olarak kabul edilen hidroksil radikali (HO \cdot), tüm biyolojik bileşenler ile reaksiyona girebilmekte ve bu özelliğinden dolayı radikal bulunduğu bölgeyi direk etkilemektedir. Hidroksil radikalının hücre içerisinde bir kere

oluşması durumunda hücrede karşılaştığı ilk moleküle büyük zarar vermesine sebep olmaktadır.

Hidroksil radikali ($\text{HO}\cdot$) yüksek reaktivitesinden dolayı hidrojen çıkarma reaksiyonu ile poliansatüre yağ asitleri, DNA, glutatyon ve kararlı aminoasitler gibi pek çok molekülde hasar meydana getirmektedir. Ayrıca reaktif oksijen türleri bir çok reaksiyon vasıtasıyla DNA'da 20'den fazla oksidatif baz hasar türlerinin oluşmasına yol açmaktadır (Dizdaroğlu, 1998). Hidroksil radikali ($\text{HO}\cdot$) ile ilgili en önemli ek reaksiyonlardan biri olan 8-hidroksi-desoksiguanozin (8-OHdG) oluşumu, yukarıda belirtilen oksidatif baz hasar ürünlerine örnek olarak verilebilir. Bu baz, oldukça duyarlı olup en sık karşılaşılan oksidatif DNA hasarında moleküller üzerindeki serbest radikal atağı için parmak izi olarak belirtilmiştir (De Martinis ve De Lourdes Pires Bianchi,2002). Guanin, DNA bileşenleri içerisinde en düşük iyonizasyon potansiyeline sahip olan ve oksidasyona en yatkın olan baz olarak bilinmektedir (Mc Dorman ve ark. 2005).

Modifiye bir baz olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin, reaktif oksijen türlerinin DNA'da yaptığı 20'den fazla oksidatif baz hasar ürününden biri olup guaninin 8.ci karbon atomuna hidroksil radikali atakları sonucu oluşan, oksidatif DNA hasarının duyarlı bir göstergesidir. ROS'un DNA'da yaptığı bu baz hasar ürünlerinden en sık karşılaşılan ve mutasyon yapma yetisi en iyi bilinen 8-OHdG'dir. Bu ürün, normal oksidatif metabolizma sırasında üretilen endojen ROS veya ekzojen kaynaklı ROS tarafından DNA'da şekillenen bir mutajendir. OH radikali, guaninin 4., 5. ve 8.ci pozisyonlarındaki karbon atomları ile reaksiyona girer ve DNA ürün radikallerini oluşturur. OH- radikalinin C-8'e katılması ile oluşan katılma ürünü radikali (C8-OH) bir elektron ve proton kaybederek 8-OHGua'e okside olmaktadır (De Martinis ve De Lourdes Pires Bianchi,2002; Yokuş ve Çakır, 2002).

DNA replikasyonu sırasında G-C'den (guanin-sitozin), A-T (adenin-timin)'ye dönüşüme neden olarak mutasyona eğilimi artırır (Mc Dorman ve ark. 2005).

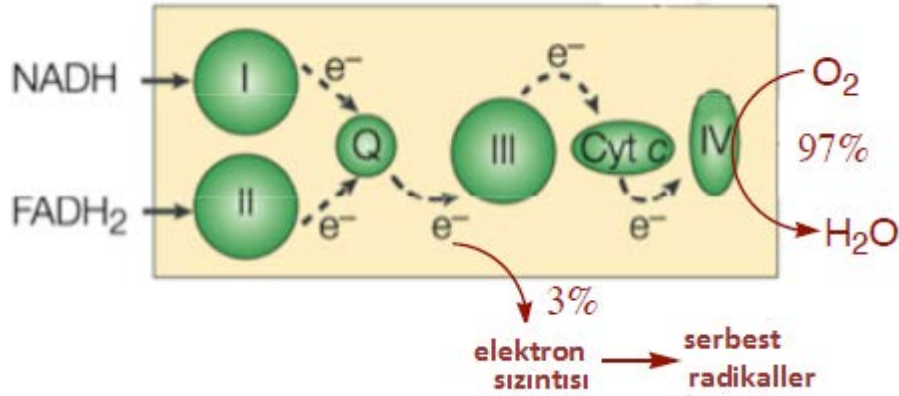


Şekil 1.2. Hidroksil radikal saldırısının DNA’da gerçekleştirdiği reaksiyonlar, (I) Cu⁺ katalizörliğünde DNA’dan hidrojen çıkarma reaksiyonları sonucu DNA bağ kırıklarının oluşması; (II) Deoksi-guanozine hidrojen eklenmesi sonucu 8-hidroksi-deoksiguanozin oluşumu; (III) Hidroksil radikal saldırısının sonuçları (Cadenas, 2013).

DNA üzerindeki hidroksil radikal (HO•) saldırısının Şekil 1.3’te gösterildiği üzere DNA bağlarını kırmaya yönelik hidrojen çıkarma reaksiyonları ve temel oksidasyonda 8-hidroksidezoksiguanozin birikimine yol açmakta olan ek reaksiyonlar olmak üzere iki şekilde olabilmektedir (Cadenas, 2013).

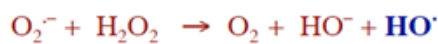
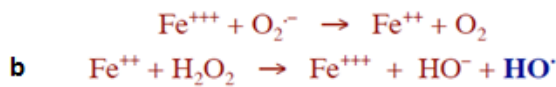
Mitokondri, sistem homeostazisi esnasında reaktif oksijen türlerinin en önemli kaynağı olarak bilinmektedir. Sahip olduğu biyokimyasal özelliklerden dolayı

kalıcı ROS üreten organel mitokondridir. Mitokondriyal tek-elektron taşıyıcılarının yanı sıra, tekli elektronları dioksijene transfer eden çeşitli oksidazlar da bulunmaktadır. Bu oksidazlar hücre membranlarının, sitozolün ve organellerin tamamlayıcı birimleridir (Nohl ve ark. 2005).



Şekil 1.3. Mitokondrideki biyokimyasal reaksiyon sonucu serbest radikal oluşumu şeması. (Cadenas, 2013)

In vivo elde edilen hidroksil radikallerinin çoğu, iyonlaştırıcı radyasyona bağlı kaldığı süreç haricinde, hidrojen peroksidin (H₂O₂) Fenton reaksiyonu vasıtasıyla bozunması yoluyla ortaya çıkmaktadır. Fenton reaksiyonu hidrojen peroksidin hidroksil radikaline metal bağımlı azalma reaksiyonunu gerektirmektedir. Bakır (Cu), demir (Fe) ve kobalt (Co) gibi geçiş metallerinin azalması Fenton tip reaksiyonları katalizlemektedir.



Şekil 1.4. Hidroksil radikallerin oluşum reaksiyonları (a) Fenton tip reaksiyon şeması, (b) H₂O₂'nin oksidasyonu sonucu hidroksil radikal oluşum şeması. (Cadenas, 2013).

Süperoksit anyonunun ($O_2^{\cdot-}$) demir azalmasını içeren ve hidrojen peroksidin (H_2O_2) oksidasyonunu içeren tüm reaksiyona bakıldığında şekil 1.5.b'deki aşamalar görülmektedir. Bağıntıda (7) son satırda belirtilen Haber-Weiss reaksiyonu olarak bilinmektedir. Bu reaksiyon, oldukça yavaş hızda seyretmektedir. Fenton reaksiyonu, biyolojik çevrede hakim olan hidrojen peroksidin metal katalizli azalmasıdır. Reaktif oksijen türlerinin gerçek kaynakları içerisinde süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2), ayrıca muhtemel olarak da tek elektronlu oksijen olduğu belirtilmektedir.

Reaktif oksijen türlerinin gerçek kaynakları içerisinde süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2), ayrıca muhtemel olarak da tek elektronlu oksijen olduğu belirtilmektedir. Hidrojen radikali oluşumu, hücrel kararlı durumda süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksidin (H_2O_2), her ikisinin de seviyesine bağlı olduğu gibi, fenton reaksiyonu kaynaklı hidroksil radikalini (HO^{\cdot}) gerektirmektedir (Cadenas, 1989).

1.4. Oksidanların hücrel hasara etki mekanizmaları

Oksidanlar aracılığı hücrel hasarlarla ilgili literatürde çok sayıda bilgi olup, bunların altında yatan nedenler de çok geniş bir spektrumda değişmektedir. Süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksidin (H_2O_2), hidroksil radikali (HO^{\cdot}) ve singlet oksijenden (1O_2) daha az reaktif olduğu açıkça bildirilmiştir. Buna rağmen, uygun bir biyolojik ortamda ilk iki türün çeşitli biyomoleküllerin hasarına yol açan önemli kimyasal aktivitelerinin olduğu bilinmektedir (Stadtman, 2004).

Reaktif oksijen türlerinin proteinlerdeki oksidasyon mekanizmaları aminoasitler üzerinde yapılan çalışmalar ile aydınlatılmıştır; örneğin, basit peptidler ve proteinler iyonize radyasyona maruz bırakılmış ve hidroksil radikali veya hidroksil/süperoksit radikal karışım formları elde edilmiştir.(Stadtman, 2004)

Yapılan bu çalışmalar göstermiştir ki, dioksijenden peroksil radikaline dönüşebileceği aerobik koşullarda hidroksil radikalleri ile reaksiyona giren

proteinden bir hidrojen çıkarılması durumunda protein polipeptid omurgasından karbon merkezli radikale dönüşmesine sebep olmaktadır. (Stadtman, 1992) Aminoasitlerin serbest oksijen gruplarına duyarlılıkları farklılık göstermekle beraber, sistein, sistin, metiyonin, histidin, triptofan ve tirozin serbest radikallere karşı daha fazla duyarlılık göstermektedir. Süperoksit grubunun bu aminoasitler üzerine etkisinin daha sınırlı olduğu bildirilmekle birlikte, bu grup sistein, histidin, tirozin ve triptofan ile yavaş bir şekilde reaksiyona girerken, diğer gruplar ile gerçekleşen tepkime daha hızlı olmaktadır. Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucunda proteinlerde çeşitli yapısal bozukluklar ortaya çıkmaktadır (Arıcıoğlu, 1994; Kaneko, 1980) . Karbonhidratlarda oluşabilecek hasarlara bakıldığında, bağ dokunun dayanıklılığının sağlanmasında etkin rol oynayan hiyaluronik asitin özellikle süperoksit grubundan etkilenecek bağ dokuda bozulmalara ve bağ doku sıvısının akışkanlığının kaybolmasına neden olduğu bildirilmiştir (Kaneko, 1980). Serbest oksijen grupları DNA üzerinde etki göstererek nükleik asitlerin yapısal değişikliklerine neden olmakta ve sonucunda kromozomlarda meydana getirdiği değişikliklerle beraber mutasyonlara neden olmaktadır. Bu olayla birlikte DNA hasarları ve mutasyonlar meydana gelmektedir (Arıcıoğlu, 1994; Kaneko, 1980; Comporti, 1993) .

Serbest oksijen gruplarının biyolojik sistemler üzerindeki en önemli etkileri lipidler üzerinde gösterilmiştir. Bu olay poliansatüre yağ asit rezidülerini içeren ve oksidasyona oldukça duyarlı olan fosfolipidler üzerindeki oksidatif hasar lipid peroksidasyonu olarak bilinmektedir (Esterbauer ve ark., 1991; Marnett, 1999). Lipid peroksidasyonu kısaca zar hücrelerdeki zar fosfolipidlerinin yükseltgenerek peroksit türevlerine dönüşmesi olayı şeklinde tanımlanmaktadır (Arıcıoğlu, 1994; Comporti, 1993; Draper, 1990).

Hücre zarları gibi mitokondriyal ve mikrozomal zarların fosfolipidlerinde doymamış yağ asitlerinin fazla miktarda bulunması sonucunda lipid peroksidasyonuna daha duyarlı olduklarını bilinmektedir. Lipid peroksidasyonu zarın yapı ve görevlerinde bozukluklara neden olmaktadır. Ayrıca lipid

peroksidasyonunun sonucunda ortaya çıkan ürünlerden bazılarının mutajenik etki göstermekte olduğu bildirilmiştir (Comporti, 1993; Draper, 1990; Wills, 1987).

Hidroksil radikali (HO \cdot) için özellikle biyolojik makromoleküllerle etkileşimini kapsayan çok önemli özellikler tanımlanmıştır. Örneğin, yüksek elektrofiliklik ve yüksek termokimyasal aktivitenin kombinasyonu ve ürünün şekli DNA yakınında (bölgeye özel mekanizma) meydana gelebilmektedir ve DNA molekülünün tüm komponentleri ile reaksiyona girdiği bilinmektedir. Purin ve pirimidin bazları birlikte deoksiriboz iskeletine de hasar vermektedir (Dizdaroğlu ve ark. 2002). Genetik materyalin çeşitli modifikasyonları bahsedilen oksidatif hasar, beraberinde mutagenез, karsinogenез ve yaşlanmayı getirmektedir ve buna dayanılarak çeşitli kanser dokularının serbest radikal kaynaklı DNA hasarından meydana geldiği belirtilmiştir (Valko ve ark. 2006). ROS-kaynaklı DNA hasarı tek veya çift zincirli DNA hasarlarına, purin, pirimidin veya deoksiriboz modifikasyonlarına ve DNA cross-linklerine neden olmaktadır (Valko ve ark. 2006). Ayrıca DNA hasarı karsinogenез ile alakalı olan transkripsiyonun durması veya uyarılması, sinyal transdüksiyon yollarının indüklenmesi, replikasyon hataları ve genomik kararsızlık ile sonuçlanabilmektedir (Dizdaroğlu ve ark. 2002; Marnett, 2000). DNA'da guanin gibi bazlara hidroksil radikali (HO \cdot) eklenmesi olayı çok hızlı bir şekilde ilerlemekte ve nükleobaz oksidatif hasar için parmak izi olarak *kullanılan 8-hidroksi-dezoksiguanozinin* oluşumuna yol açmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1999) (Bkz.Şekil 1.3).

Reaktif oksijen türleri DNA'yı farklı seviyelerde hasara uğratabilmektedir: (Cadenas, 2013) hidroksil radikali katılma reaksiyonları yoluyla tek iplikli bazların zarar görmesine neden olabilmektedir. (örneğin. 8- hidroksidezoksiguanozinin formasyonu) ve H çıkarılması ile tek iplikli DNA'da çentik oluşturabilmektedir (ssDNA nick) veya çift iplikli DNA bağlarını kırabilmektedir (dsDNA break). Replikasyondan sonra ssDNA çentiği dsDNA kırığına dönüşebilmektedir (Cadenas, 2013). Serbest bir radikalın DNA'yı okside etmesi mutajenite ve karsinojenite açısından önem teşkil etmektedir. Buna karşın DNA baz modifikasyonlarını tamir

edebilecek temel spesifik mekanizmalar mevcuttur (Evans ve ark., 2004; Kasai, 2002).

1.5. Oksidatif stres ve kalp fonksiyonları ile ilişkisi

Kronik ve geri dönüştürülemeyen hastalıklar içerisinde yer alan kardiyovasküler sistem hastalıkları her geçen gün dünya çapında yayılmaya devam etmektedir (Hoffman ve ark., 2004) . Miyokardiyal enfarktüsü de dahil olmak üzere akut koroner sendromları, birincil ve ikincil tedavi yöntemleri geliştirilmeye devam ederken, güçlü redoks-duyarlı bileşikler ile batı ülkelerindeki ölümlerin çoğuna sebep olan en tipik patolojik olaylar olarak bilinmektedir. Akut miyokardiyal enfarktüsü (AME) tedavisinde tek etken yol iskemik dokuya kan akışının hızlı bir şekilde gerçekleştirilmesi olarak belirtilmiştir. Ancak, reperfüzyonun aşırı yaralanma ile ilişkili olduğu ve iskemi-reperfüzyon süresinin uzunluğunun bu hasarın ölçüsünün önemli bir belirleyicisi olduğu bildirilmiştir (Ferdinandy ve Schulz, 2003; Hoffman ve ark.,2004). Reperfüzyon başlangıcından saatler sonra bile devam edebilen ROS/RNS üretimi, reperfüzyon hasarının (Bolli ve ark., 1989) ve inflamatuvar hücrelerin oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Simoons ve ark., 1986).

Koroner arter hastalığında, inflamatuvar süreç, oksidatif stresi de içeren, diyastolik ve sistolik fonksiyon bozuklukları ile birlikte kardiyak hasara yol açan zararlı olayların kısır döngü olarak gerçekleşmektedir (Toyokuni, 1999). Bu nedenle, kardiyak hasarın ve fonksiyon bozukluğunda iskemik hasarla birlikte reperfüzyonun da etkili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, iskemi/reperfüzyon hasarının çeşitli yolaklar aracılığı ile hücre uyarılabilirliğini ve iletim sisteminde oluşturduğu değişiklikler ile artimilere sebebiyet verebilmektedir (Majidi ve ark., 2009; Lopes ve ark., 2012).

Özellikle yaşlanma ve geri dönüştürülemeyen akut olaylar sonucunda redoks dengesi sağlıklı (sinyal) durumdan hastalık (stres) durumuna doğru kayma meydana getirmektedir. Normal kardiyovasküler performans, redoks dengesi de dahil olmak

üzere, bir çok karmaşık fizyolojik ve biyokimyasal olayın denge halinde olmasını gerektirmektedir (Pagliaro ve Penna, 2014).

Oksidatif/ nitrosatif/ nitratif stres adları verilen hücre içi oksidasyon-redüksiyon dengesizliği, arterosklerozis, kronik iskemik kalp hastalığı, kardiyomiyopati, konjesif kalp yetmezliği, ritim bozukluğu gibi rahatsızlıkların yanı sıra, kardiyovasküler sistemin iskemi/reperfüzyona karşı daha duyarlı hale gelmesi ve bir çok dejeneratif hastalığın oluşması ve gelişmesine katkıda bulunmaktadırlar (Lopes ve ark., 2012; Tullio ve ark., 2013). Artan ROS/RNS formasyonları reperfüzyon/kaynaklı hasarın en önemli sebeplerinden birisi olarak gösterilmiş ve reperfüzyon sırasında, artan O_2^- ürünlerinin diğer ROS/RNS ürünleri ile birlikte miyokardiyal fibrilleri okside edip hücre ölümlerine sebep verdiği belirtilmiştir (Zhao, 2004).

İzole edilmiş kalplerde yapılmış olan çalışmalarda, oksijen radikali oluşumuna yol açan her olayın yüksek enerjili fosfatlarda azalmaya, kontraktıl fonksiyon kaybına ve yapısal anormalliklere neden olduğu gösterilmiştir. Katekolaminerjik stresin indüklediği kalp rahatsızlıklarının araştırmalarında yapılan *in vitro* çalışmalarda katekolaminlerin otooksidasyonunun serbest radikal üretimini başlatarak kardiyak disfonksiyonuna yol açtığına dair bulgular elde edilmiştir (Singal et al. 1983). Bunun yanında, miyokard infarktüsü sırasında iskemi-reperfüzyon hasarında serbest radikallerin rolü ortaya konmuş ve bunun sarkoplazmik retikulumdaki Ca^{2+} transportunda azalmayla oluştuğu gösterilmiştir (Hess et al. 1983). Kalp hastalıklarının patogenezinin aydınlatılması açısından yapılan *in vitro* ve *in vivo* bu tip çalışmalarda serbest radikallerin artmasının önemi ortaya konmuştur.

Endotel tabakası, vasküler tonus, trombosit adhezyonu, inflamasyon, fibrinoliz ve vasküler proliferasyonu düzenleyen medyatörleri sağlayarak homeostazi korumaktadır. Endotel fonksiyonunun bozulması bu olaylar serisini olumsuz etkileyerek kardiyovasküler risk oluşturmaktadır (Nedeljkovic et al. 2003). Bu alandaki gelişmeler, oksidatif stresin vasküler disfonksiyon mekanizmalarını kolaylaştırdığını düşündürmektedir.

Ateroskleroz için risk faktörleri olan hiperlipidemi, diyabet, hipertansiyon ve yaşlanma gibi etkenler, endotel vasküler düz kas hücresi ve adventisyal hücrelerden reaktif türlerin salınımına yol açmaktadır (Harrison, D., 2003). Bu reaktif oksijen türleri de aterogenez sürecinde rol alan bir çok önemli olayı başlatmaktadır. Bunlar arasında, adhezyon molekülü ekspresyonu, vasküler düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonu, endotelde apoptoz, lipidlerin oksidasyonu (okside LDL), proteolitik matriks metalloproteinazların (MMP) aktivasyonu ve vazomotor aktivitede değişiklikler yer almaktadır. Bu süreçte ksantin oksidaz, (NAD(P)H oksidaz, nitrik oksit sentetaz (NOS) ve mitokondriyal enzimler rol oynamaktadır (Houston ve ark. 1999; Griendling ve ark.2000). Erken dönemde endotel disfonksiyonu ile başlayan süreç, oksidan uyarının devamı ve antioksidan enzim aktivitesindeki yetersizlik devam edecek olursa, hızla aterosklerotik plaktan koroner arter hastalığına dek ilerleyebilmektedir (Luft, 2005; Heinecke, 2003). İnsan koroner arterlerinden elde edilen örneklerde SOD gibi antioksidan enzim aktivitesinde azalmanın gösterilmiş olması, oksidatif stres ve ateroskleroz ilişkisinin güçlü bir kanıtıdır (West ve ark. 2001).

Dolaşımdaki homeostaz kontrolü, vasküler endotelin kimyasal, hormonal ve hemodinamik değişikliklere olan yanıtına bağlıdır. Hipertansiyonda, endotelle ilişkili vazodilatör sistemlerdeki bozukluklar endotel disfonksiyonuna neden olmaktadır (Rathaus ve Bernheim, 2002).

Oksidatif stresin etkilediği en önemli rahatsızlıklardan biri kalp yetersizliğidir. Kalp yetersizliği gelişen hastalarda SOD, CAT, GSH-Px ve E vitamini gibi miyokardiyal antioksidanlar azalırken, serbest oksijen radikallerinin ve oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir (Hill ve Signal, 1996). Bununla birlikte *in vitro* çalışmalar ve hayvan modellerinde iskemi/reperfüzyon, miyokard infarktüsü ve kronik basınç yükselmesi (hipertansiyon) gibi durumların oksidatif stres oluşturarak apoptoz yoluyla miyosit kaybına neden olduğu da gösterilmiştir (Benjamin ve Schneider, 2005; Giordano, 2005; Kaul ve ark., 1993).

Serbest oksijen radikallerinin doğrudan gösterildiği kardiyak sorunların başında reperfüzyon hasarı gelmektedir. Reperfüzyon hasarı, tıkanmış koroner arterin açılmasından sonra iskemik olan alana oksijenli kanın gelmesinin yarattığı olaylar zincirini takiben miyokard hücre hasarının artmasıdır. Bu olay kalpte geri dönüşebilir (miyokardiyal stunning) olabileceği gibi, geri dönülmez (miyokard infarktüsü) olayların başlangıcı da olabilmektedir. Hasar oluşumunda hücresel mekanizma olarak, koroner endotel hücreleri, dolaşımdaki kan hücreleri ve kardiyak miyositlerden artmış serbest oksijen radikali oluşumu sorumlu tutulmaktadır (Lucchesi,1990). Bunu destekleyen birinci bulgu, post-iskemik miyokarda serbest oksijen radikallerinin artmış olduğunun göstergesi olmasıdır. Diğer bir kanıt, dışarıdan serbest oksijen radikali verilmesinin iskemi/reperfüzyon hasarına benzer bir hasar meydana getirdiği tespit edilmiş olmasıdır. Dışarıdan H₂O₂ perfüzyonunun, reperfüzyon hasarının özellikleri olan hücresel K⁺ kaybı, yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin azalması, intraselüler Ca²⁺ artışı, miyosit kasılma gücünün zayıflayıp gevşemenin giderek azalması, metabolik fonksiyonun yavaşlaması ve aritmiler gibi bozukluklara neden olduğu gösterilmiştir (Bolli, 1990; Weiss ve ark. 1993; Tarr ve Valenzano, 1993). Öne sürülen mekanizma, serbest oksijen radikallerinin mitokondri, sarkoplazmik retikulumdaki iyon transport proteinleri ve enzimleri inaktive etmesi, lipid peroksidasyonu ile bu yapıları hasara uğratarak Ca²⁺ homeostazını bozması olarak belirtilmiştir.

Kalp hastalıklarına karşı miyokardiyal savunma açısından birkaç aşama göstermektedir. Birincil savunma hücre içi antioksidanlardan (SOD, CAT, GSH-Px, GSH-redüktaz vb.) oluşmaktadır. İkincil savunma lipolitik ve proteolitik enzimleri (proteaz, fosfolipaz vb.) içermektedir. Üçüncül savunma ise, oksidatif stres sonucunda artan reaktif oksijen türleri ile başa çıkabilme amacıyla, kalpteki gen ve proteinlerden (redoks duyarlı transkripsiyon faktörü olan) nükleer faktör kB (NF-kB) ve aktivatör protein (AP-1) ile Bcl-2 geni sayesinde hücre içi antioksidanların üretimini arttırılmasıdır (Aral ve Türkmen, 2002).

1.6. Oksidatif stres ve diyabet ile ilişkisi

Diyabet, günümüz insanının yaşam şartlarından dolayı tüm dünyada hızla yayılan, yüksek mortalite ve morbidite tehlikesi taşıyan bir hastalıktır. Yapılan çalışmalarda deneysel olarak diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin diyabet etiyolojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir (Pitkanen ve ark. 1992). Bunlar ek olarak, uzamış oksidatif stresin ve antioksidan kapasitede görülen değişikliklerin, diyabetin kronik komplikasyonlarının ortaya çıkışı ile de ilişkili olabileceği araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır (Van Dam ve ark., 1995; Bukan ve ark., 2003).

Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının reaktif oksijen türleri ile olan ilişkisini gösteren çalışmalarda, enzimatik olmayan glikasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yol aktivitesi, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan doku hasarının serbest radikal üretimini arttırdığı (Baynes ve Thorpe, 1999) ve antioksidan savunma sistemini değiştirdiği vurgulanmaktadır (Altan ve ark, 1994 a,b; Saxena ve ark., 1993; Elmalı ve ark., 2004; Kılıç ve ark., 1998).

Oksidatif strese en duyarlı yapılardan biri olduğu bilinen beta hücrelerinde gözlenen hasarın, hipergliseminin toksik etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Robertson ve ark. 2004).

Hidrojen peroksitin, yüksek aktiviteye sahip bir ROS ürünü olan OH radikaline dönüşmesi sonrası insülin reseptör sinyal sistemi üzerinde etkili olduğu ve insülin tarafından reseptör aracılığı ile düzenlenen sinyal transdüksiyon yollarında anahtar bir yol oynayabileceği görüşü araştırmacıların savları arasında bulunmaktadır (Houslay, 1991; Donalith ve ark. 1999). Glikasyon aracılı serbest radikal üretiminin insülinin gen transkripsiyonunu azalttığını ve beta hücre apoptozuna yol açtığını gösteren çalışmaların bulguları bu görüşü destekler niteliktedir (Houslay, 1991; Donalith ve ark., 1999).

Diyabet oluşturulan sıçan deney modellerinde oksidatif stres belirteci olarak değerlendirilen 8-OHdG düzeylerinde de artış gözlenmiştir (Ihara ve ark., 1999).

Çalışmamızda, metabolik sendromlu hayvanları tercih etme sebebimiz, metabolik sendrom kontrol altına alınmadığı durumlarda kronik diyabet oluşumu ve daha sonrasında oluşabilecek sistemik bozuklukların temeli olarak bilinmektedir.

Metabolik sendrom, insülin direnci ile başlayan abdominal obezite, glukoz intoleransı veya diabetes mellitus, dislipidemi, hipertansiyon ve koroner arter hastalığı (KAH) gibi sistemik bozuklukların birbirine eklendiği ölümcül bir endokrinopati olarak tanımlanmıştır (Metabolik sendrom kılavuzu, 2009). Metabolik sendromun patofizyolojisinde sempatik nöral faktörlerin rol oynadığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Meaney ve ark. 2008; Dalle-Donne ve ark. 2006). Son yıllarda yapılan çalışmalar metabolik sendromun gelişiminde oksidatif stresin rol oynadığı hipotezi üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu hastalığın önemli komponentlerinden hiperglisemi ve inflamasyonda reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve NADPH oksidazın aşırı aktivasyonu sonucunda oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir (Demircan ve ark. 2008).

Vücut kitle indeksi, kan basıncı ve trigliseritemi ile NO düzeyleri arasındaki negatif korelasyon ve metabolik rahatsızlıkları olan hastalarda düşük NO (Sun ve ark. 2006) düzeyleri, bu prosese nitrit oksit biyoyararlanımındaki azalmanın eşlik ettiği bulgusunu (Barbato ve ark., 2005) desteklemektedir. Bunun yanı sıra, metabolik sendromda oksidatif ve nitrozatif stresin belirteçlerinden olan okside olmuş plazma proteinlerinin (Maeney ve ark., 2008) ve peroksitlerin düzeylerinin (Demirbağ ve ark., 2006) arttığı ve total antioksidan aktivitenin azaldığı (Demircan ve ark., 2008; Demirbağ ve ark., 2006; Ford ve ark., 2003) gösterilmiştir.

1.7. Redoks sistemleri ve antioksidan enzimler

Oksidan oluşturulmasına ek olarak, hücrel redoks durumu indirgeyiciler veya antioksidan moleküller ve enzimler tarafından yakından kontrol altında tutulmaktadır. Bu nedenle, hücre içerisinde ROS aşırı üretiminin önlenmesi ve hücrenin bu sebepten meydana gelecek oksidatif stres kaynaklı hasarlardan korunabilmesi amacıyla bir çok önemli biyolojik redoks sistemi ve antioksidan enzimler bulunmaktadır. Antioksidanlar, hücrenin redoks düzenlenmesinde rol oynayan, oksidatif stresi nötralize eden ve hücreleri oksidatif stres kaynaklı hasarlara karşı koruyan araçlardır (Turan, 2010).

Organizmalar, sistemlerini ve mekanizmalarını serbest radikallerin ve reaktif metabolitlerin toksik etkilerine karşı korumak için koruyucu sistemler geliştirmişlerdir (Durackova, 1998). Koruma üç aşamalı olarak organize edilmiştir: (a) serbest radikal formasyonu katalize eden enzimleri inhibe eden sistemlerin oluşumu; allopurinol tarafından inhibe edilebilen veya demir ya da geçiş metalleri tarafından yakalanan ve serbest radikal oluşumu sürecinde katalitik aktivitesini elimine etmesine neden olan süperoksitlerin oluşumunu gerçekleştiren ksantin oksidaz bu kategoriye dahildir, (b) birincil koruma sistemi etkili olmadığı ve serbest radikaller ile reaktif moleküllerin buna rağmen oluştuğu durumlarda, temizleyici ve tuzakçılar harekete geçerek serbest radikallerin yüksek reaktivitesini radikal olmayan ve toksik olmayan metabolitlere dönüştürmektedirler. Bu tip bileşikler antioksidanlar olarak adlandırılmaktadır ve biyolojik öneme sahip moleküllerin serbest radikaller ile reaktif metabolitlerin oksidasyonlarına karşı korumakla görevlidirler. (c) Organizmanın koruma görevi bu seviyeye kadar halen gerçekleştirilememiş ise tamir sistemleri proteinazın oksidatif modifiye proteinlere, lipazların oksidatif hasarlı lipidlere veya DNA tamir sistemlerinin modifiye DNA bazlarına dönüşmesi gibi olayları organize ederek tamirini sağlamaktadır (Durackova, 1998).

Antioksidanlar, antioksidatif moleküllerinin büyüklüklerine bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir ve yüksek-moleküler-ağırlıklı ile düşük-moleküler-ağırlıklı bileşikler olarak sınıflandırılmaktadırlar. Endojen ve yüksek moleküler ağırlıklı antioksidanlar arasında süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz, albumin, transferin ve metallothionein örnek verilebilirken, düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar ise ürik asit, askorbik asit, lipoik asit, glutatyon, tokofenol (vitamin E), ubikuinol (CoQ) ve flavonoidler/polifenoller örnek verilebilir. Ayrıca organizmanın dışarıdan özellikler polifenik bileşikleri sentezleyen ve flavonoidlerin içerisinde bulunduğu bitkisel besin ile aldığı, vitamin C ve vitamin E de antioksidanlar arasında yer almaktadır. (Williams ve ark. 2004; Durackova, 2008)

Bir bileşiğin in vivo etkili bir antioksidan olarak tanımlanabilmesi için (1) biyolojik olarak efektif reaktif metabolitlerle reaksiyona girebilmelidir; (2) reaksiyon sonrası oluşan prooksidan+antioksidan ürünü organizma için prooksidan formundan daha fazla toksik olmamalıdır; (3) antioksidan organizmada etkili konsantrasyonda mevcut olmalıdır; (4) antioksidanın yarılanma ömrü oksidan ile reaksiyona girebilecek kadar uzun olmalıdır (Halliwell ve Whiteman, 2004).

Glutatyon sistemi (GSH), birçok biyokimyasal yolak için indirgeyici eşdeğerler sağlayarak çeşitli hücre tiplerinde redoks durumunu düzenlemekte önemli göreve sahip olan glutatyonu içermektedir. Glutatyon, glutatyon S-transferaz halinde bir sülfidril tamponu gibi davranarak bileşiklerin toksisitesini ortadan kaldırmaktadır (Nordberg ve Arner, 2001; van Bladeren, 2000). Glutatyon peroksidaz (GSHPx) H₂O₂ ve lipid peroksidlerini etkili bir şekilde azaltarak su ve lipid alkollerine dönüştürmektedir. GSHPx/GSH sisteminin, düşük oksidatif stres seviyeleri için temel savunma yolu olduğu düşünülmektedir (Wassmann ve ark., 2004).

Protein oksidatif kaynaklı hasarlarına karşı hücrel korumayı, fizyolojik koşullar altında proteinlerin indirgenmesini sağlayan Tiyoredoksin (Trx) sistemi gerçekleştirmektedir. Trx sistemi, protein disülfidlerinin azalmasını katalizleyen ve poksidasyona karşı duyarlı proteinlerin fizyolojik fonksiyonlarının düzenlenmesini

sağlayan tiyoredoksin, tiyoredoksin redüktaz ve NADPH içeren bir tiyol-disülfid oksiredüktaz sistemidir (Turan, 2010).

1.8. Serbest radikal tespit ve ölçme yöntemleri

Redoks biyokimyasını anlayabilmek için, çeşitli modifikasyonlara karşı hedef olan biyomoleküllerin sağlam ve hastalıklı durumlarda tanımlanabilmesi gerekmektedir. Modifikasyonlar gibi spesifik radikallerin nerede ilk oluşturulduğunu, metabolik aktif sistemlerde biyomolekül merkezli serbest radikallerin selüler ve subselüler yerleşim yerlerinin ve bunların canlının tümünde lokalize olduğu yerin tanımlanmasını içermektedir (Gomez-Mejiba ve ark. 2009).

Protein ve DNA gibi oksidatif kaynaklı biyomoleküllerin hasarı sonucu protein ve DNA merkezli radikallerin oluşumu genellikle ilk elektronun veya hidrojen atomunun çıkarılması yoluyla oluşmaktadır (Hawkins ve Davies, 2001; Cadet ve ark. 2003). Bu biyomolekül merkezli radikaller genellikle hızla parçalanabilen; oksijenle reaksiyona girerek fragmentasyona veya post-translasyonel modifikasyonlara neden olan ya da biyomoleküller veya antioksidanlarla birlikte yığılmaya ve atılmaya neden olmaktadır (Hall ve ark. 1996; Stadtman, 1995; Halliwell ve Whiteman, 2004).

Bir atom, iyon veya molekül olabilen bir serbest radikal dış orbitalinde sahip olduğu yalnızca bir adet çiftlenmemiş elektrondan dolayı genelde çok reaktif ve kararsızdır, bu karakteri paramagnetik özelliği ile açıklanabilmektedir. Bakır gibi bazı paramagnetik geçiş metalleri istisnalar arasında sayılabilmektedir. Çiftlenmemiş elektron bu türlere, bahsedilen paramagnetik özellikleri sağlayarak, serbest radikallerin tespitini sağlamak için kullanılan ve “altın standart” olarak nitelendirilen elektron spin rezonans (ESR) (veya EPR:Elektron paramagnetik rezonans) spektrofotometri yöntemi için gerekli olan kararlılığı sağlamaktadır (Mason,2000).

Protein ve DNA merkezli radikaller yüksek reaktivite özelliklerinden dolayı, her ne kadar ribonükleotid redüktazın tirozil radikali gibi bir alternatif mevcut olsa da, radikallerin bozunup diyamagnetik türlerin (ESR-silent) oluşturulması için genellikle yalnızca mikrosaniyeler ile saniyeler arasında değişen kararlılığa sahiptirler (Gräslund ve ark., 1985).

ESR'ın serbest radikal tespit yöntemleri arasında önemli derecede avantajlı olduğu bilinmektedir (Davies ve Slater, 1988). Bununla birlikte ESR'ın hücrelerde ve dokulardaki fizyolojik koşullar altında serbest radikallerin kararlı-durum (steady-state) konsantrasyonlarındaki ilişkisindeki zayıf hassasiyet göstermesi ve bazen de strese sebep olması çalışmalarda en önemli limitleyici özelliği olarak belirtilmiştir (Gomez-Mejiba ve ark. 2014).

Spin yakalama, kimya ve biyolojide elektron paramanyetik rezonans (EPR=ESR) tekniği kullanımı ile kısa süreli serbest radikallerin saptanmasını ve tanımlanmasını sağlayan bir analiz tekniğidir. ESR spektroskopisi, serbest radikallerdeki çiftlenmemiş elektronlar gibi paramanyetik türleri tespit etmektedir. Ancak, radikallerin yarılanma ömürlerinin ESR ile tespit edilebileceğinden daha kısa olması, spin yakalayıcılar adı verilen, radikal ürünleri ile daha kararlı bileşikler oluşturabilen ve ESR spektrofotometrisi ile tespit edilebilecek paramanyetik rezonans özelliğine sahip olan ürünleri geliştirmeye yönlendirmiştir. Kısa ömürlü radikallerin radikal-ekleme reaksiyonları ile tespit etme yöntemi ilk olarak 1965 yılında E.G. Janzen tarafından uygulanmıştır. ESR üzerindeki sınırlandırmalar 1960'lı yıllarda serbest radikalın karbon ucuna nitron fonksiyonunda olan bir spin trap (spin-yakalayıcı) eklenmesi ile spin trapping tekniğinin geliştirilmesine yol açmıştır (Janzen, 1984). Bu reaksiyon sonrasında ESR spektroskopisi ile görülebilen daha kararlı bir serbest radikal, nitroksit radikal bileşiği veya radikal bileşiği oluşturulmaktadır (Janzen, 1984).

Serbest radikal çalışmalarında spin trapping kullanılmasının sağladığı en büyük avantaj serbest radikallerin artan kararlılıkları ile radikal bileşiklerin konsantrasyonlarının artması olarak belirtilmiştir (Mason, 2000).

Bu buluş biyolojik sistemlerdeki oksidatif proses çalışmalarında ESR-spin yakalama rönesansına yol açmıştır (Davies ve Hawkins, 2004; Augusto ve Muntz Vaz, 2007). Üstelik serbest radikal metabolitleri, proteinler ve nükleik asitler ESR-spin trapping tarafından hem in vitro hem de in vivo olarak tespit edilmektedir (Mason, 2000).

Nitroso ve nitron bileşikleri gibi bir çok spin yakalayıcı (trap), biyolojik sistemlerdeki serbest radikal çalışmalarında kullanılmaktadır (Davies ve Hawkins, 2004; Augusto ve ark., 2007; Davies ve ark. 1991). Nitron spin yakalayıcıları, fizikokimyasal özellikleri, membran permeabilitesi, (Davies ve ark., 1991; Janzen ve ark., 1996), serbest radikalleri yakalayabilme etkinliği (Davies ve ark., 1991) ve düşük toksisitesinden (Janzen ve ark., 1995) dolayı hem ESR spektroskopisinde radikalleri tespit etmek amacıyla (Davies ve Hawkins, 2004; Davies ve ark., 1991) hem de oksidatif-stres aracılı hasarlara karşı farmakolojik ajanlar olarak kullanılmaktadır (Villamena ve ark. 2012; Floyd ve ark. 2008).

Kullanılmakta olan spin yakalayıcılar içerisinde en popüler olanları 5,5-dimetil-1-pirolin N-oksit (DMPO) (Janzen ve ark. 1989) ve alfa-fenil N-tertiari-bütül nitron (PBN) (Ramirez ve Mason, 2005) gösterilmektedir. Daha az kullanılan spin yakalayıcılar arasında, 3,5-Dibromo-4-nitrozobenzensülfonik asit (DBNBS) gibi C-nitroso spin yakalayıcıları da kullanılmaktadır. Bir diğer spin yakalayıcı olan 5-di izo-propoksifosforil-5-metil-1-pirolin-N-oksit (DIPPMO), mitokondr bünyesindeki süperoksit ürünlerinin ölçümü için kullanılmaktadır (Ramirez ve Mason, 2005).

Radikal bileşiğinin daha yüksek kararlılığa sahip olması, serbest radikal oluşumunun belirli bir oranda daha yüksek konsantrasyonda radikal bileşiği oluşumunu sağlamaktadır (Davies ve Hawkins, 2004). ESR-spin trapping deneylerinde başarı sağlanabilmesi için en önemli faktörün genellikle radikal bileşiğinin yarılanma ömrü olduğu belirtilmiştir (Mason, 2000).

Buna ek olarak, direk ESR'dan farklı olarak, spin trapping metodunun spin-trapping reaksiyonunun mutlak kararlılığına bağlı olduğu bilinmektedir (Ranguelova ve Mason, 2011). Önemli olarak, nitron spin yakalayıcılarının, elektrofilik ve nükleofilik ekleme reaksiyonları yolu ile serbest radikaller ve radikal olmayan bileşiklerle reaksiyona girdiği bilinmektedir (Nash ve ark. 2012).

Radikal bileşiklerin artifaklarının DMPO ile reaksiyonu ters-spin trapping (spin yakalayıcının bir-elektron oksidasyonu) ve Forrester-Hepburn (spin trapin nükleofilik eklemesi) olarak iki alternatif mekanizma ile gösterilmiş ve tartışılmıştır (Ranguelova ve Mason, 2011; Leinisch ve ark. 2011).

Bir nükleofilin spin yakalayıcıya nükleofilik eklenmesi ile tanımlanan Forrester-Hepburn mekanizması biyolojik sistemlerde olası yapay DMPO-molekül bileşikleri oluşturulmasının temel mekanizması olarak tanımlanmıştır (Ranguelova ve Mason, 2011; Leinisch ve ark. 2011).

Nitron spin yakalayıcılarının serbest radikaller ile gerçekleştirdiği reaksiyonlar, hücreler, dokular ve hayvanlar gibi biyokimyasal sistemlerde, spin trapping tekniğini ESR tespiti yöntemi bir arada kullanılmasının en özel ve spesifik araç olarak kullanılabilir olması bilinen bir gerçektir (Hawkins ve ark. 2009).

Burada gözden kaçırılmaması gereken ESR-spin yakalama tekniğinin in vivo ortamda 1) materyallerin edinilme zorluğu, 2) dokularda radikal bileşiklerin kararsız olmasından ötürü tekrarlanabilir olmayışı, 3) dialektik örneğinin kaybolmaması ve 4) düşük radikal bileşik konsantrasyonundan ötürü DMPO ile yarışabilecek antioksidanların varlığı gibi sınırlandırılmalarına sahip olduğu gerçeğidir.

Biyokimyasal olarak bakıldığında, bahsedilen teknik serbest radikallerin biyolojik olaylardaki kimyasal etkileşimlerin anlaşılmasını sağlayacak ve oksidasyonu stresin seviyelerinde belirleyebilmek için protein hedeflerin oluşturulmasına olanak sağlayacak bir yöntem olarak gösterilmiştir (Gomez-Mejiba ve ark. 2014).

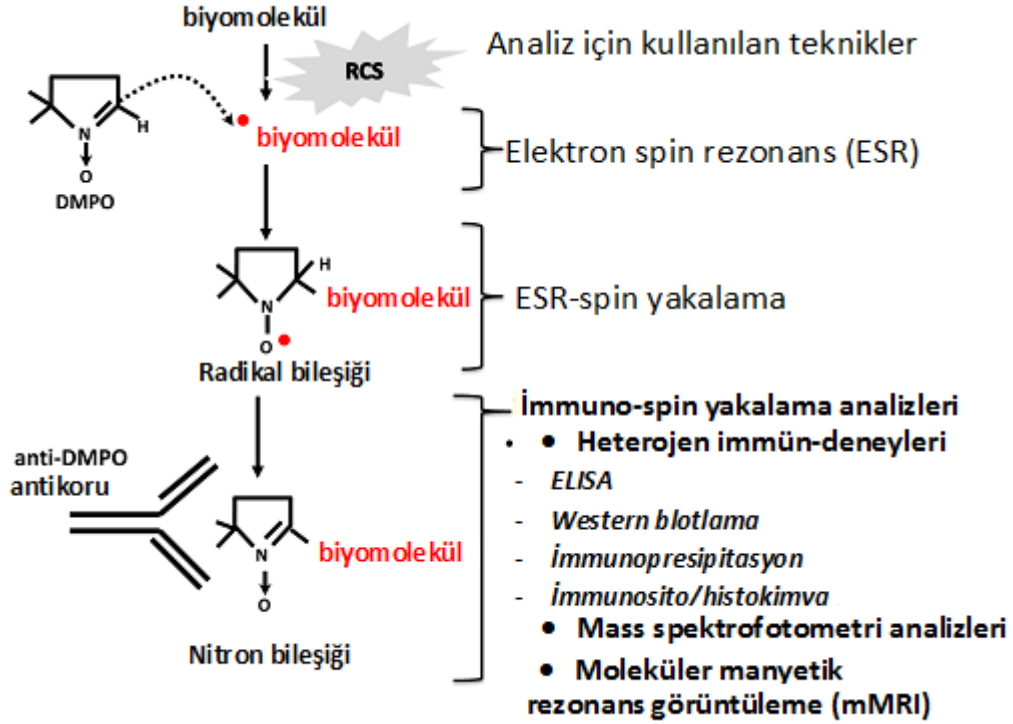
Spin-yakalayıcı bileşiklere bakıldığında, hücreler, parazitler ve hayvanlar gibi biyolojik sistemler için en az toksik ve farmakokinetik olarak (alınımı, dağılımı,

metabolizması ve atılımı) en uygun olanın nitron spin yakalayıcı DMPO olduğu tespit edilmiştir (Anzai ve ark. 2003) .

DMPO, in situ ve gerçek zamanlı olarak protein ve DNA-merkezli radikaller herhangi bir hücrel bileşikte nerede ve ne zaman oluşturulursa oluşturulsun ulaşabilen ve yakalayabilen, suda ve organik çözücülerde çözünebilmektedir. Bu şekilde oluşturulan DMPO-biyomolekül bileşiği ekstraksiyon ve immunoanaliz sırasında stabil olarak bağlı kalıp, DMPO'nun en az kendisi kadar kararlılık göstermektedir (Ramirez ve ark. 2007; Ramirez ve Mason, 2005; Mason, 2004).

DMPO, yalnızca -1,68V gibi çok düşük potansiyellerde hidroksilamine indirgenen, normal hidrojen elektrodun aksine yalnızca 1,87V gibi çok yüksek potansiyellerde okside olabilen, oldukça kararlı ve yaklaşık redoks olarak etkisiz bir bileşik olarak tanımlanmıştır. Bir defa oluşturulan DMPO protein bileşiği (1) nitroksit radikal bileşiği, (2) hidroksilamin formuna denk gelen ve bir elektron indirgenmesi ile oluşturulan radikal bileşiği, (3) nitron formuna denk gelen ve bir elektron oksidasyonu ile oluşturulan radikal bileşiği olarak üç ayrı redox formunu içermektedir (Mason, 2004).

Bu kısma dek bahsedilen tüm temel kavramlar DMPO motifinin protein-DMPO nitron bileşikleri ve DNA -bileşikleri içerisinde bir immuno deney geliştirilmesini ve immunolojik tekniklere güç kazandırırken tıpta serbest radikal biyokimyasının büyüyen alanına kazandırılmasını sağlamıştır (Gomez-Mejiba ve ark. 2009). Bu tekniğe immuno-spin trapping (IST) tekniği adı verilmiştir (Ramirez ve ark. 2002). Immuno-spin yakalama tekniğinde oluşturulan bir nitron bileşiğinin tespiti için radikale özel bir belirteç ve immunohistokimya, yüksek performanslı likid kromatografi (HPLC), mass spektrofotometri (MS), MS/MS (tandem-MS), NMR, ve magnetik rezonans görüntüleme (MRI) gibi herhangi bir analitik metod kullanılabilir (Gomez-Mejiba ve ark. 2009; Zhang ve ark. 2010).



Şekil 1.5. Radikal ve nitron bileşiklerinin tespit edilmesinde kullanılan yöntemler (Gomez-Mejiba ve ark., 2013).

Etkileyici duyarlılığı, güç ve immunolojik tekniklerde tespit kolaylığı bakımından DMPO özel bir radikal prob olarak kendisini tanıyabilen antikorların üretimine yol açmıştır. Nitron-spin yakalayıcı DMPO'ya karşı poliklonal ve monoklonal antikorlar üretilmiştir (Detweiler ve ark. 2002).

Immuno-spin yakalama tekniği, DMPO-protein veya DMPO-DNA radikal bağımlı nitron bileşiklerinde antijen-antikor etkileşimi ve spin yakalamanın özgünlüğünü birleştirmektedir. Protein ve DNA radikalleri, DMPO ve radikal bileşik formları tarafından in situ ve gerçek zamanlı olarak tespit edilmektedir. Radikal bileşiği, anti-DMPO antiserumu tarafından bir nitron bileşiği oluşturmak üzere tespit edilip, oksidasyon tarafından çürütülmektedir. Anti-DMPO antiserumu DMPO'nun bağlı bulunduğu molekülleri değil, DMPO'nun kendisini tanıyabilmektedir. DMPO'nun nitron bölgesi, DMPO'ya oldukça antijenik karakter kazandırmaktadır (Mejiba ve ark. 2013).

DMPO, pirolin N-oksit halkasındaki C2 pozisyonunda bir oktanoik asit (OA) zincirine konjugedir. Hapten yapının (DMPO-OA) bir sonucu olarak radikalın DMPO tarafından yakalanmasını stimüle etmektedir. DMPO-OA kompleksi ovalbumin (OVA) ile immunojen (DMPO-OA-OVA) oluşturmak üzere konjuge oluşturmaktadır. Bahsedilen antiserum immuno-spin yakalamayı gerçekleştirmek ve geliştirmek üzere kullanılmaktadır ve hapten yapı serbest DMPO, protein ya da DNA-DMPO nitron bileşiklerini tespit etmektedir (Ramirez ve ark. 2003).

Anti-DMPO antiserumunun DMPO'yu tanınması, DMPO biyomolekül nitron bileşiklerinin, biyomolekül merkezli radikallerden serbest DMPO'ya kadar ve DMPO-küçük molekül-merkezli radikallere kadar (DMPO-ditiyoterirol nitron bileşikleri gibi) heterojen özellik göstermesine sebep olmaktadır (Guo ve ark. 2004).

Immuno-spin yakalama tekniği, i) kararlı nitron bileşiklerinden in situ ve gerçek zamanlı olarak makromolekül-merkezli radikallerin yakalanması; ii) nitron bileşiklerinin ayrılması ve/veya çıkarılması; iii) nitron bileşiklerinin yerleşim yerlerinin immuno- tespiti olmak üzere üç ana basamak içermektedir (Ramirez ve ark. 2007; Ramirez ve Mason, 2005; Gomez-Mejiba ve ark. 2009).

1.9. Çinkonun biyolojik moleküller ile ilişkisi

Genel bilgilerimiz içinde, çinko iyonunun (Zn^{2+}) biyolojik sistemlerde fizyolojik öneme sahip, tek hücre düzeyinde önemli bir hücre içi (intracellular) iyondur. Böylece, Zn^{2+} biyolojik sistemlerde, yapısal/ regülatör metallo-proteinlere bağlı veya histokimyasal olarak reaktif olmak üzere iki farklı durumda bulunur. Fizyolojik koşullarda hücre içi serbest Zn^{2+} seviyesi ($[Zn^{2+}]_i$) sıkı kontrol altında regüle edilmekte olup, buna karşın dinamik olarak düzensiz bir şekilde hücre içinde değişebildiği ileri sürülmektedir (Tuncay ve ark.,2011; Hershfinkel ve Moran ile ark., 2011; Maret, 2009; Palmer ve Vogt ile ark., 2006; Spahl ve Berendji-Grün ile ark., 2003; Vallee ve Falchuk, 1993).

Literatürde bulunan çalışmalar içerisinde insan genomunda yapılan biyoinformatik çalışmalarında Zn^{2+} 'nin sitozolde bulunan tüm proteinlerin %10'una bağlı bulunduğu gösterilmiştir (Valle ve Falchuk, 1993). Transkripsiyon faktörleri ve enzimler gibi birçok proteinin yapısında bulunan Zn^{2+} yapısal ve fonksiyonel kofaktör olarak görev almaktadır. Kardiyomiyositlerde serbest Zn^{2+} seviyesi 1 nM'dan daha düşük değerlerde (Turan ve ark., 1997; Ayaz ve Turan, 2006) bulunmasına karşın, bu iyonun çok büyük oranları proteinlere bağlı kofaktör olarak görev yapmaktadır.

Hücre içi çeşitli proteinlerden Zn^{2+} salınarak, çeşitli sinyal yollarını mitokondriyal metabolizmayı ve hücrenin redoks durumunu etkileyebilmektedir. Çeşitli konsantrasyonlarda Zn^{2+} antioksidan kapasiteyi arttırmakta veya toksaik reaktif oksijen türlerinin salınmasına neden olabilmektedir (Little ve ark., 2010; Tuncay ve ark., 2010). Zn^{2+} -parmak (finger) proteinleri olarak bilinen hücre içi proteinler Zn^{2+} ya çok büyük bir afinite ile bağlanırlar. Bu nedenle hücre içi Zn^{2+} miktarı çok düşük değerlerde kalır.

Hücre proliferasyonu, bağışıklık fonksiyonu ve serbest radikallere karşı hücrel savunma mejanizmaları gibi çeşitli biyolojik süreçlerde, Zn^{2+} 'nin etkin olarak görev yaptığı gösterilmiştir (Dreosti, 2001; Ho, 2004; Falchuk, 1998; Bray ve Bettger, 1990; Powell, 2000; Cousins ve ark., 2003). Ayrıca, Zn^{2+} 'nin farklı hücre tiplerinde normal fizyolojik ve hücrel fonksiyonunun korunmasında görevli olan önemli bir eser element olduğu ve hücre içerisinde metalloproteinler ile bağlanarak birçok enzimin aktifleştirilmesinde kofaktör olarak önemli bir role sahip olduğu belirtilmiştir (Maret, 2009; Vallee ve Falchuk, 1993).

Hücrelerde Zn^{2+} 'nu, hücrenin redoks denge mekanizmasında önemli rol oynamaktadır. Özellikle Zn^{2+} kendisi redoks inert bir iyon olmasına rağmen, hücre içinde redoks durumunun değişiminden çok çabuk etkilenebilmektedir. Hücrede bir şekilde oksidatif stresin artması Zn^{2+} 'nin bağlı olduğu proteinlerden ayrılmasına veya depolardan salınmasına neden olabilmektedir. Artan oksidatif stres glisemi kontrolünün düştüğü kronik diyabet hastalarında görülen bir bulgudur.

Kardiyomiyositlerde, oksidanlar hücre içinde serbest Zn^{2+} seviyesinde 30-kat artışa neden olurken, sadece 2-kat serbest Ca^{2+} artışa neden olduğu gösterilmiştir (Turan ve ark., 1997). Herhangi bir hastalık durumunda özellikle diyabette, oksidatif stresin artması beklenen bir durumdur. Diyabette kardiyomiyositlerde serbest Zn^{2+} seviyesinin arttığı gösterilmiştir (Turan ve ark., 1997; Ayaz ve Turan, 2006). Metalloproteinler metal bağlayıcılığı yanında, oksiradikal tutucu özelliğinden dolayı, hidroksil radikallerini nötralize ederler. Bu nedenle, reaktif oksijen türlerinin birikimine karşı metalloproteinler koruyucu protein olarak görev yaparlar (Foster ve Samman, 2010). Aynı zamanda, Zn^{2+} mitokondriyi inhibe ederek ve NADPH oksidazı aktive ederek reaktif oksijen türlerinin oluşmasına katkıda bulunmaktadır (Alvarez-Collazo ve ark., 2012)

Nitrik oksit (NO) birçok dokuda çeşitli fizyolojik ve patolojik yanıtlara neden olan önemli biyolojik bir mesajcıdır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda NO'nun fonksiyonu hakkında net bir bilgi elde edilememiştir. Vasküler sistemde çok iyi bir gevşetici ajan olduğu bilinmektedir. Kalpte ise çelişkili birçok veri bulunmaktadır. Kasılmayı arttırdığını, azalttığını veya değiştirmedini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Derici ve ark.,2012). NO'nun birçok patolojik durumda arttığı da gösterilmiştir (Calo ve ark.,1996; Ayaz ve Turan, 2006).

Zn^{2+} 'nin insülin kristalinin bir parçası olduğu 1934 yılından beri bilinmektedir. Bu nedenle, Zn^{2+} ve diyabet arasındaki ilişki her zaman önemli bir konu olmuştur (Jansen ve ark., 2009). Diyabetik kardiyomiyopati hem tip 1 hem de tip 2 diyabetli hastalarda görülen sol ventrikül yetmezliği geliştiğinde klinik tedavi gerektiren önemli ve kompleks bir metabolik hastalıktır. Bu süreçlerin moleküler ve hücrenel mekanizmaları tam olarak bilinmemesine karşın, hücre içi Ca^{2+} ve Zn^{2+} mekanizmasının ve bu mekanizmada rol alan oyuncuların bozulmuş olduğu en önemli bulgular arasındadır (Ayaz ve ark., 2004; Ayaz ve Turan, 2006). Günümüzde artan oksidatif stresin diyabetik kardiyomiyopatinin gelişmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Oksidant stresin proteinlerin tiyol bağlanma bölgelerinden Zn^{2+} 'nin serbestleşmesini tetiklediği ve oksidant stres ile Zn^{2+} salınan önemli bir hücrenel molekülün PKC olduğu ve diyabette PKC'nin aktive olduğu

(Korichneva ve ark. 2002) gösterilmiştir.

Zn^{2+} 'nin oksidatif stresle olan ilişkisi yanında, artan oksidatif stres ve buna bağlı hücrel hasarlarda Zn^{2+} eksikliğinin de katkıda bulunduğu belirtilmiştir. Zn^{2+} , birden fazla düzeyde oksidan savunma sisteminin bir kurucusu olarak gösterilmiştir (Uriu-Adams ve Keen, 2010). Zn^{2+} , hidrojen peroksit içerisinde süperoksit anyonundan bakır-çinko süperoksit dismutaz oluşumunun bir bileşeni ve metal-bağlayıcı protein bileşeni olmasından dolayı da, bağıl olarak antioksidan potansiyelinin düzenlenmesinde önem rol oynamaktadır. Zn^{2+} 'nu, Zn^{2+} -transkripsiyon faktörleri de dahil olmak üzere yapısında bulunduğu çok sayıda protein sayesinde redoks-duyarlı sistein ve sülfidril gruplarının oksidasyonunu önlemektedir (Uriu-Adams ve Keen, 2010). Zn^{2+} 'nu ayrıca, demir ve bakır gibi redoks aktif metallerin Fenton-tip reaksiyonlar ile membranlara ve intraselüler alanlara bağlanmasını inhibe ederek serbest radikal oluşumunu azaltabilmektedir. Zn^{2+} 'nu eksikliği koşullarında, hücrelerde ve dokulardaki demir birikmesi nedeniyle proteinlerdeki demir taşınması, biriktirilmesi ve düzenlenmesinde artma durumu ile karakterize edilmektedir (Niles ve ark. 2008; Rogers ve ark. 1987). Zn^{2+} eksikliği koşullarında çeşitli hücre tiplerinde, reaktif oksijen ve nitrojen kaynaklarının artması ile indüklenebilir nitrik oksit sentetaz (iNOS)'ın sentezinin artması ve NADPH oksidazın aktive edilmesine neden olduğu tespit edilmiştir (Aimo ve ark., 2010; Cui ve ark. 1999).

Zn^{2+} 'nu eksikliğinin oluşması sonucu oksidatif stresin oluşmasına ve bununla birlikte lipid, protein ve DNA'da oksidatif hasarın oluşması ve apoptozun artışı gibi her hangi bir olumsuz durumun gerçekleşmesini tetikleyebilmektedir. Teratogenezin altında yatan, tıbbi ilaçların kullanımı ile tetiklenen, artan oksidatif stres bu savı kanıtlamaktadır (van Gelder ve ark. 2010 ve Wells ve ark. 2009). Hücre ve dokulardaki çinko eksikliği durumunda lipidler ve proteinlerde oksidatif stres Carter (2002) ve Oteiza ve arkadaşları (1995) tarafından not edilmiştir. DNA'daki oksidatif stresin temelinde Zn^{2+} 'nu etkisine bakıldığında da, Zn^{2+} 'nu yetersizliği bulunan hücre ve dokularda aynı şekilde çinkoyu sınırlı alan insanlarda

da DNA tekli bağ kırılmalarına rastlandığı gösterilmiştir (Olin ve ark. 1993; Oteiza ve ark. 1995; Song ve ark. 2009a,b).

Zn²⁺ nu hakkında bahsedilen tüm yararlı etkilerine rağmen bazı polimorfizmlerde genetik geçmişlere bağlı olarak, bulunduğu yerde çok fazla miktarda ise temel olarak bakır eksikliğinden dolayı toksik etki gösterebilmektedir. Zn²⁺ nun gösterdiği bu toksisitenin yan etkileri olarak da bakır bağımlı enzimlerde (SOD), seruloplazmin, sitokrom C oksidaz, immunolojik parametreler, kolesterol ve lipoprotein dağılımında değişimler oluşmaktadır (Maret, 2006). Ayrıca insan akciğer hücrelerinde yapılmış olan in vivo bir çalışmada da artmış Zn²⁺ nu konsantrasyonunun kromozomal kararsızlık ve DNA çift zincir kırıklarına neden olduğu gösterilmiştir (Xie et al. 2009).

1.10. Selenyumun biyolojik sistemlerdeki önemi

Selenyum (Se), selenometionin ve yiyeceklerden alınan diğer organik bileşiklerden biri olarak vücuda alındığında, ön absorpsiyon katabolizma sonucunda, ya selenit oksianyonu (SeO₃²⁻) ya da selenat oksianyonu (SeO₄³⁻) olarak salınır. Buna ek olarak, selenyumun dışarıdan alındığı durumlarda kullanılan bileşiği sodyum selenit (Na₂SeO₃) veya sodyum selenat (Na₂SeO₄) olduğu için, özellikle dışardan uygulama ile yapılan selenyum metabolizması çalışmaları, esas olarak selenit veya selenat metabolizması üzerinde yoğunlaşmıştır. Örneğin, selenitin, glutatyon (GSH) gibi çeşitli tiollerle (SH) non-enzimatik olarak indirgenmesi sonucu, organizmada *selenotrisülfidler* meydana gelir (Bjornstedt ve ark., 1995; Combs ve ark., 1984; Frenkel ve ark., 1991; Tsen ve Tappel, 1958).

Selenotrisülfidlerden oluşan hidrojen selenit (H₂Se), aynı zamanda non-enzimatik reaksiyonla, tiollerle de meydana gelir. Selenitin, H₂Se' e indirgenmesi hücre içinde gerçekleşirken, H₂Se'nin metilasyonu, hem sitozolde, hem de mikrozomal bölümlerde gerçekleşir. Oluşan H₂Se, bu şekli ile proteinlere bağlanabilir veya metilasyon reaksiyonuna girer. H₂Se, selenyum bileşikleri arasındaki en toksik

bileşenlerden biri olduğu için, metilasyon reaksiyonu, detoksifikasyonunda büyük önem taşır.

Selenyumun biyolojik önemi, GSH-Px'nin bir ko-faktörü olmasından kaynaklanmaktadır (Rotruck ve ark., 1973; Schwarz ve Foltz, 1957). Her alt ünitesinde, selenosistein şeklinde bir adet selenyum atomu içeren GSH-Px enzimi, hücre içinde hidrojen peroksitin (H_2O_2) suya indirgenmesinde önemli rol oynamaktadır. GSH-Px'in fonksiyonu, vitamin E'nin fonksiyonunu tamamlayıcı niteliktedir. İyi bir serbest radikal temizleyicisi olan vitamin E, lipofilik bir vitamin olup, biyolojik zarların içinde yerleşmiştir (Severcan ve ark., 1990). Lipidperoksitler, kalp hücresi zarını hasara uğratarak, Ca^{2+} taşınım mekanizmasını bozarak, hücrede kontrolsüz Ca^{2+} birikimine neden olabilmektedirler, bu ise kalp kası hücrelerinin fonksiyonunu bozmaktadır (Bryant ve ark., 1980; Guidi ve ark., 1984; Oster ve Prellwitz, 1990). Selenyum antioksidan sistemde oynadığı önemli rol nedeni ile kalpteki patolojilerin yol açtığı oksidan etkileri önleyebilmektedir (Grupp ve ark., 1983; Van Vleet, 1987; Nakano ve ark., 1989).

Keshan hastalığı olarak bilinen (Chen ve ark., 1980) bir tip endemik fatal kardiyomiyopatinin dışardan selenyum uygulamasına cevap verdiği gösterilmiştir. Ayrıca, Keshan hastalığının bulunduğu bölgelerdeki çocukların sodyum selenitle beslenmesi halinde, hastalık insidansının bariz bir şekilde azaldığı görülmüştür (Chen ve ark., 1980).

Kısaca selenyum, özellikle süperoksit ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen ürünleri olan hidrojen peroksiti ve lipid peroksidazı katalizleyen, glutatyon peroksidaz enziminin bir parçasıdır. Hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerin temizlenmesi, zincirleme oksidasyon reaksiyonunu durdurur. Bu durum, iskemik koşullarda ksantin oksidaz tarafından üretilen süperoksit artışının yol açabileceği ek oksijen tüketimi ve artan lipid peroksidasyonu açısından önemlidir.

Streptozotocin ile yapılan deneysel diyabet modellerinde selenyumun diyabetik hayvanların kan şekerini düşürdüğü, sıvı tüketimlerini, ağırlık artışlarını ve bazı biyokimyasal parametrelerini normale getirebildiği bildirilmiştir (Tashima ve ark.,

1989; McNeill ve ark., 1991; Ghosh ve ark., 1994). Diğer taraftan, diyabette oksidan stresin önemli rol oynadığı, oksidan stresin ya diyabetin bir sonucu olarak ortaya çıktığı ya da oksidan stres sonucu diyabetin ortaya çıktığı iki ayrı görüştür. Selenyumun anti-oksidan sistemdeki bilinen belirgin rolü nedeni ile diyabette gözlenen patolojileri düzeltebilmesi olasıdır. Ayrıca hücrel kültürleri üzerinde yapılan çalışmalarda selenyumun bir büyüme faktörü gibi davrandığı bildirilmiştir. Selenyumun bu etkisinden insülin reseptörünün substratı olan bazı proteinlerin fosforilasyonuna neden olmasının sorumlu olduğu iddia edilmiştir ancak bu durumda insülin reseptörünün kendisinin kinaz aktivitesi artmamaktadır (Ezaki, 1990). Böylece selenyum hücre içi sinyal iletimi yollarında, insülinin yokluğunda da insüline benzeyen değişiklikler yapmakta ya da insülinin reseptörü üzerinden yaptığı etkiyi arttırmaktadır. Bu aktivatör etkinin nedeni bilinmemekle beraber, selenyumun oksidan etkisinin bundan sorumlu olabileceği söylenmektedir (Ezaki, 1990).

In vitro ortamda, selenit, selenyum dioksit ve diselenitler, glutatyon gibi tiyollerle reaksiyona girerek süperoksit ve diğer reaktif oksijen türlerini oluşturmaktadır. Hem bitkiler hem de hayvanlarda selenyumun metilasyonu oluşturulan metilselenitler selenyum detoksifikasyonu için hizmet etmektedir (Turan ve Vassort, 2010).

Selenyumun sağlık ile olan ilişkisinde, selenyum vücutta önemli antioksidan enzimler olan selenoproteinleri oluşturmak üzere proteinler ile birleşir. Selenoproteinler antioksidan özellikleri sayesinde serbest radikallerin hücrel hasara karşı korunmasında görevlidirler. Genel olarak, antioksidanlar serbest radikal hasarından korunmak amacı ile bu serbest radikalleri su ve zararlı olmayan moleküllere çevirmektedir (Turan ve Vassort, 2010). Selenit, DNA hasarında (tekli bağ kırıkları) selenometiyoninden daha büyük hasar oluşturma kapasitesine sahipken, kanser korumasında selenometiyoninden daha etkili olduğu belirtilmiştir (Clement, 1998). Selenitin anti kanser özelliğinin hücre döngüsünü durdurma ve apoptozise teşvik etme ile ilgili olan sitotoksik kapasitesi ile alakalı olduğunu düşündürmüştür (Zhong ve Oberley, 2001).

Diğer selenoproteinler, tiroit fonksiyonunu düzenlemeye yardımcı olurken, bağışıklık sisteminde önemli role sahiptir (Turan ve Vassort, 2010). Özetle, selenyum antioksidan koruma, DNA tamiri, tiroit hormon aktivasyonu, bağışıklık sistemi geliştirilmesi, prostoglandinlerin üretimi, kas fonksiyonu ve kansere karşı korumada görevli olduğu bildirilmiştir (Comb, 2001).

Kalpdeki iskemi-reperfüzyon (I/R) bağımlı hasarına karşı glutatyon peroksidazın bir bileşeni olan selenyumun koruma görevi üstlenmiş olan önemli bir iz element olduğu bilinmesine karşın bu korunma mekanizması tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu nedenle Turan ve arkadaşlarının (2005) gerçekleştirmiş olduğu deneylerde, sodyum selenitin farklı konsantrasyonlarının (25-1000 nM) kalpteki iskemi/reperfüzyon bağımlı hasara yönelik vermiş olduğu yanıtlar incelenmiştir. Bu incelemelerde, ancak çok dar bir aralıkta selenitin antioksidan etkisi, diğer yüksek seviyelerde bir pro-oksidan gibi davrandığı gözlenmiştir.

1.11. Hücrelerde hiperglisemi altında oto-oksidasyon ve süperoksit üretimi

Oto-oksidasyon yoluyla hücrelerin yüksek glukoz altında (hiperglisemi) fazla miktarlarda süper oksit üretimine yol açtığı bildirilmiştir (Abdo,1994). Örneğin, bir geçiş elementi varlığında glukoz, reaktif ketoaldehitlere ve süperoksit anyonuna çevrilmektedir. Reaksiyonlar zinciri, süperoksit radikalinin hidrojen peroksit üzerinden son derece reaktif olan hidroksil radikali oluşturması ile sonuçlanmaktadır. Hücre içi glukoz oksidasyonu NADH'nın açığa çıkmasına yol açar. NADH solunum zincirinde oksidatif fosforilasyon yolu ile ATP üretimi için gerekli enerjiyi sağlamak üzere kullanılır. Solunum zincirindeki bu reaksiyon sırasında da, süperoksit radikali açığa çıkmaktadır. Yüksek glukoz varlığında bu yolla süperoksit radikali üretimi artmaktadır. Örneğin mitokondri solunum zinciri, başlıca hücre içi serbest oksijen türevlerinin (ROS) üretim kaynağıdır (Abdo,1994).

Normal solunum zinciri olayları sırasında sürekli olarak süperoksit radikali oluştuğu düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, diyabetteki patolojilerin birçoğunun artmış mitokondriyal ROS üretimi ile ilintili olduğunu göstermektedir

(Brownlee, 2001; Green ve ark., 2004; Altan ve ark.,1997). Ayrıca, hiperglisemi aracılı ROS üretimi, glukoz indüklü oto-oksidasyon ve süperoksit üretimi yanında, proteinlerin glikasyonu ve ileri glikasyon son ürünleri (AGE) oluşumu ve poliyol yolağındaki süreçlerle de açıklanmaktadır (Bonfont-Rousselot, 2002).

1.12. Çalışmanın amacı

İmmüno- spin-yakalama (immuno-spin-trapping) tekniğı adı verilen ve sonra da geliştirilen bu teknikte, çok kısa zaman içinde daha kararlı bir serbest radikal (yani bir radikal adduksiyonu) yapmak için geliştirilmiştir. Burada serbest radikale bir diamagnetik spin çift bağı takılarak inceleme yapılmaktadır. Böylece elektron spin rezonans (ESR) yöntemi kullanılarak daha iyi inceleme yapılabilmektedir. ESR yöntemi, biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikalleri (çok kısa süreli oluşumlar) gözlemek için tek teknik olarak kabul görmüştür (Ramirez ve ark., 2005; Hanna ve Mason, 1992; Hanna ve ark. 1992). Buna karşın, protein veya DNA radikallerinin nitron adduksiyonlarını gözlemek için, bir immunoassay tekniğinin geliştirilmesi immunolojik tekniklerin serbest radikal biyolojisinde çok önemli bir güç kazanmasına yol açmıştır. Bu teknik sayesinde protein veya DNA düzeyinde çok kısa süreli serbest radikal oluşumu çok hassas olarak ölçülebilmektedir (Ramirez ve ark., 2006; 2007; Summers ve ark., 2012). Canlılık işlevleri ve biyolojik gelişmeler ile fonksiyonlar için gerekli olan genetik direktifleri taşıyan nükleik asit olan DNA üzerinde meydana gelebilecek bir hasar, sentezlenecek proteine de etki edecektir ve bu zincirleme sonrasında DNA'daki bir radikalden ötürü kalıcı hasarlar ve sonrasında kronik hastalıklar meydana gelmektedir.

Hücre bazında artan serbest radikal oluşumu ve oksidatif stres hasarını zayıflatmak veya tamamen ortadan kaldırabilmek amacıyla hücrelerde, antioksidan savunma sisteminin kuvvetlendirilmesi genel olarak seçilen yollar arasında yer alır. Bu sistemin kuvvetlenmesinde dışarıdan sisteme çeşitli iz elementlerin verilmesi ise yine genel yollardan birisidir. Biyolojik sistemlerde fizyolojik koşullarda eser miktarlarda bulunan çinko ve selenyum bu iz elementler arasında önemli bir gruptur. Diğer yandan, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda, bu elementlerin antioksidan

etkileri yanında hem eksiklikleri hem de fazla olmaları yani toksik etkileri de bulunduğu, pro-oksidant gibi davranabildikleri başka gruplar tarafından (Frustaci ve ark., 2012; Lin ve ark., 2011; Miriam ve ark., 2009; Mukarami ve Hireano, 2008; Yamasaki ve ark., 2007; Chung ve ark., 2006; Frazzini ve ark., 2006; Frederickson ve ark., 2005; Nakatani ve ark., 2000) ve bizim önceki çalışmalarımızda gösterilmiştir (Turan ve ark., 1996; 1997; Ugur ve ark., 2002; Ayaz ve ark., 2005; Turan ve ark., 2005; Turan, 2003; Tuncay ve ark., 2011).

Bu tez çalışmasının temel amacı, DMPO adı verilen kimyasal madde aracılığı ile, daha önceden kullanılmakta olan ESR yönteminden daha fonksiyonel ve aynı zamanda DNA'nın yapısına zarar vermeden serbest radika oluşumunu ölçmeye yarayan "immün-spin-yakalama" yöntemi ile, DNA düzeyinde serbest radikal oluşumunun tespitinin yapılmasıdır. Ayrıca, bu teknik kullanılarak *in vitro* koşullarda DNA üzerinde, selenyum ve çinko iyonlarının antioksidan/pro-oksidan konsantrasyonları tespit edilecektir. Bunlara ek olarak, normal ve metabolik sendromlu sıçan kardiyomiyositlerinde izole edilen proteinlerde bu yöntem kullanılarak serbest radikal oluşum seviyeleri ölçülerek karşılaştırılacaktır. Böylece söz konusu yöntemin, biyolojik örneklerdeki oksidan/antioksidan hususlarının incelenmesinde kullanılma durumu tartışılacaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. DNA-nitron bileşiklerinin *in vitro* oluşturulması

Çalışmanın DNA-nitron bileşiklerinin *in vitro* oluşturulması ile ilgili bölümde, buzağı timüsünden elde edilmiş deoksi-ribonükleik asit kullanılmıştır (deoxyribonucleic acid sodium salt from calf thymus-Type I fibers, Sigma D1501). Steril DNA (1 mg/mL), DNase içermeyen 5 mM fosfat tamponu (pH=7.4) ile +4°C'de en az 1 gece bekletilerek seyreltilmiştir. Seyreltilen DNA'nın serbest radikallerinin oluşturulması aşamasında Tablo 1'de belirtilen konsantrasyon ve hacimler ile DMPO'nun bulunmadığı kontrol ve bulunduğu deney grupları hazırlanarak CuCl₂ katalizörlüğünde H₂O₂ ile 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. 37°C'de 1 saat inkübasyon sonrasında, reaksiyonun durdurulması için DNA karışımları üzerine 100 mM DTPA solüsyonu eklenmiştir. DNA, ELISA kuyularına (White Maxi Sorp High Binding plate) bağlanma aşamasından önce çöktürülmüş ve konsantrasyonu kuvarz kuyularda spektrofotometre ile ölçülmüştür. Her bir kuyu başına 0,5 µg DNA örneği içerecek şekilde yapılan hesaplamalar sonrasında, ELISA kuyularına pipetlenen DNA'lar üzerine seyreltilmemiş Reacti-Bind DNA coating solüsyonu (Pierce) eklenerek karanlıkta, oda sıcaklığına 1 gece çalkalamalı ortamda inkübe edilmiştir. Ertesi sabah solüsyonlar dökülerek kuyular steril 1XPBS ile yıkanmış ve üzerine spesifik olmayan (non-specific) bağlanmaları bloklamak amacı ile %1 kazein içeren PBS (ph=7.4) eklenerek 1 saat 37°C'de inkübe edilmiş ve 1 saat inkübasyon sonrası kuyular 1XPBS ile yıkanmıştır. Her bir kuyuda 5 µg/ml bulunacak şekilde kuyulara anti-DMPO antikoruna eklenerek 37°C'de çalkalamalı ortamda inkübe edilen kuyular, 1 saat sonra 3 defa 1XPBS ile yıkanmıştır. Kuyulara 1/500 oranında Goat Anti-mouse ikincil antikoruna eklenerek 37°C'de inkübe edilmiş ve 1 saat inkübasyon sonrası plate 5 defa 1X PBS ile yıkanmıştır. Kuyulara LumiGLO chemiluminescent substrat eklenerek 5 dakika oda sıcaklığı ve karanlıkta inkübe edilen plate, meydana gelmiş olan luminesens miktarları fluorosan okuyucuda okutulmuştur.

2.2. Çinko varlığında *in vitro* ortamda DNA - nitron bileşiklerinin oluşturulması ve gözlemlenmesi

Kontrol deneylerinde gerçekleştirilmiş olan DNA serbest radikallerinin oluşturulma aşamasında kullanılmış olan 200 μM H_2O_2 oksidan olarak kullanılmış ve çinko bileşiği olarak $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ kullanılarak, bu bileşikten 50 μM , 100 μM , 200 μM , 400 μM konsantrasyonları seçilerek DMPO'nun bulunmadığı kontrol ve bulunduğu deney grupları Tablo 2'deki konsantrasyonlar ve hacimler kullanılarak örnekler hazırlanmış ve 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. 37°C'de 1 saat inkübasyon sonrasında, reaksiyonun durdurulması için DNA karışımları üzerine 100 mM DTPA solüsyonu eklenmiştir. DNA, ELISA plate'e (White Maxi Sorp High Binding plate) bağlanma aşamasından evvel presipite edilmiş ve konsantrasyonu kuvarz plate'de spektrofotometre ile ölçülmüştür. Her bir kuyu başına 0,5 μg DNA örneği içerecek şekilde yapılan hesaplamalar sonrasında, ELISA plate kuyularına pipetlenen DNA'lar üzerine dilue edilmemiş Reacti-Bind DNA coating solüsyonu (Pierce) eklenerek karanlıkta, oda sıcaklığına 1 gece çalkalamalı ortamda inkübe edilmiştir. Ertesi sabah solüsyonlar dökülerek kuyular steril 1XPBS ile yıkanmış ve üzerine spesifik olmayan bağlanmaları bloklamak amacı ile 1% kazein içeren PBS (pH=7,4) eklenerek 1 saat 37°C'de inkübe edilmiş ve 1 saat inkübasyon sonrası plate 1XPBS ile yıkanmıştır. Her bir kuyuda 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bulunacak şekilde kuyulara anti-DMPO antikoru eklenerek 37°C'de çalkalamalı ortamda inkübe edilen plate, 1 saat sonra 3 defa 1X PBS ile yıkanmıştır. Kuyulara 1/500 oranında Goat Anti-mouse ikincil antikoru eklenerek 37°C'de inkübe edilmiş ve 1 saat inkübasyon sonrası plate 5 defa 1X PBS ile yıkanmıştır. Kuyulara LumiGLO chemiluminescent substrat eklenerek 5 dakika oda sıcaklığı ve karanlıkta inkübe edilen plate, meydana gelmiş olan luminesens miktarları fluorosan okuyucuda okutulmuştur.

Yine DNA serbest radikallerinin oluşturulma aşamasında kullanılmış olan 200 μM H_2O_2 oksidan olarak kullanılmış ve selenyumun Na_2SeO_3 tuzundan 50 nM, 100 nM, 200 nM ve 400 nM konsantrasyonları kullanılarak (Tablo.3) bir önceki aşamada açıklanan deneyler gerçekleştirilmiştir.

Tablo 1. DNA-nitron bileşikleri oluşumu esnasında hazırlanan örnekler.

	10X PBS	DNA 1 mg/ml	1 mM Cu²⁺	1mM H₂O₂	1 M DMPO	ddH₂O
1	20 µl	25 µl	-	-	-	70 µl
2	20 µl	25 µl	10 µl	-	-	60 µl
3	20 µl	25 µl	10 µl	10 µl	-	50 µl
4	20 µl	25 µl	10 µl	20 µl	-	40 µl
5	20 µl	25 µl	10 µl	40 µl	-	20 µl
6	20 µl	25 µl	-	-	20 µl	50 µl
7	20 µl	25 µl	10 µl	-	20 µl	40 µl
8	20 µl	25 µl	10 µl	10 µl	20 µl	30 µl
9	20 µl	25 µl	10 µl	20 µl	20 µl	20 µl
10	20 µl	25 µl	10 µl	40 µl	20 µl	0 µl

Tablo 2: Çinko varlığında DNA-nitron bileşikleri oluşturmak amaçlı hazırlanan örnekler.

	10x PBS	DNA 1 mg/ml	1mM Cu²⁺	1mM Zn²⁺	1mM H₂O₂	1 M DMPO	ddH₂O
1	20 µl	25 µl	-	-	-	-	150 µl
2	20 µl	25 µl	10 µl	-	40 µl	-	100 µl
3	20 µl	25 µl	10 µl	10 µl	40 µl	-	90 µl
4	20 µl	25 µl	10 µl	20 µl	40 µl	-	80 µl
5	20 µl	25 µl	10 µl	40 µl	40 µl	-	60 µl
6	20 µl	25 µl	10 µl	80 µl	40 µl	-	20 µl
7	20 µl	25 µl	-	-	-	20 µl	130 µl
8	20 µl	25 µl	10 µl	-	40 µl	20 µl	80 µl
9	20 µl	25 µl	10 µl	10 µl	40 µl	20 µl	70 µl
10	20 µl	25 µl	10 µl	20 µl	40 µl	20 µl	60 µl
11	20 µl	25 µl	10 µl	40 µl	40 µl	20 µl	40 µl
12	20 µl	25 µl	10 µl	80 µl	40 µl	20 µl	0

Tablo 3: Selenyum varlığında DNA-nitron bileşikleri oluşturmak amaçlı hazırlanan örnekler.

	10X PBS	DNA 1 mg/ml	1mM Cu ²⁺	1nM Na ₂ SeO ₃	1mM H ₂ O ₂	1M DMPO	ddH ₂ O
1	20 µl	25 µl	-	-	-	-	150 µl
2	20 µl	25 µl	10 µl	-	40 µl	-	100 µl
3	20 µl	25 µl	10 µl	10 µl	40 µl	-	90 µl
4	20 µl	25 µl	10 µl	20 µl	40 µl	-	80 µl
5	20 µl	25 µl	10 µl	40 µl	40 µl	-	60 µl
6	20 µl	25 µl	10 µl	80 µl	40 µl	-	20 µl
7	20 µl	25 µl	-	-	-	20 µl	130 µl
8	20 µl	25 µl	10 µl	-	40 µl	20 µl	80 µl
9	20 µl	25 µl	10 µl	10 µl	40 µl	20 µl	70 µl
10	20 µl	25 µl	10 µl	20 µl	40 µl	20 µl	60 µl
11	20 µl	25 µl	10 µl	40 µl	40 µl	20 µl	40 µl
12	20 µl	25 µl	10 µl	80 µl	40 µl	20 µl	0

2.3. Sıçanlarda metabolik sendrom oluşturulması

Deneyle için, ağırlıkları 200-250 g arasında değişen, yaklaşık 3 aylık, Wistar türü erkek sıçanlar kullanılmıştır. Çalışmada, mevcut hayvanlar ikiye ayrılarak, birinci gruba (kontrol) standart rat yemi ve çeşme suyu verilirken, diğer gruba ise yüksek karbonhidrat içerikli diyet (standart rat yemi ve % 32 sükröz içeren çeşme suyu) verilmiştir. 16 hafta boyunca her hafta deney grubunun kan glikoz düzeyleri ölçülmüş ve kan örnekleri insulin tayini yapmak için toplanmıştır. Grupların kan glikoz düzeyleri incelendiğinde, 12 hafta sonunda kontrol grubunun açlık kan glukoz seviyesi ortalama 91.41 ortalamanın standart sapması 8.03 iken deney grubunda bu değer 104.9 ile 5.8 olarak bulunmuştur (p<0,05 t-testi sonucuna göre). Deneyle sonunda sıçanların, vücut ağırlıklarını ve insulin düzeylerinin (Cayman EIA

Rat Insulin Assay Kit) değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, yüksek sukrozla beslenen sıçanlarda metabolik sendrom geliştiğini göstermiştir.

2.4. Kalp dokusundan protein elde edilmesi

Laboratuvarımızda yetiştirdiğimiz kontrol ve metabolik sendromlu sıçan kalp dokularından 100 mg tartılıp zerine Camiolo buffer (0,368g KAc+0,8765g NaCl+ 1 ml 0,5M EDTA+125 µl TritonX-100+0,871g L-Arginine) eklenmiş ve homojenizatör yardımı ile buz üzerinde hücrelerin parçalanması sağlanmıştır. +4°C'de 20.000g'de 20 dakika santrifüj edilip, süpernatantlar temiz ependorf tüpüne alındıktan sonra Bradford yöntemi ile elde edilmiş olan protein konsantrasyonları ölçülmüştür.

2.5. Kontrol ve metabolik sendromlu sıçanlardan elde edilen kalp proteinlerinde oksidatif hasar oluşturulması

Kontrol ve metabolik sendromlu sıçan kalplerinden elde edilen proteinlerden 30µg alınıp H₂O₂ 'in 50µM, 100 µM, 200 µM konsantrasyonları ile aşağıdaki Tablo 4'te belirtilen konsantrasyonlar ve hacimler kullanılarak hazırlanan reaksiyon karışımları ile protein-nitron bileşikleri oluşturulmuştur.

İzleyen deney serilerinde, Çinko (Zn₃(PO₄)₂)'nun Tablo 5'te belirtilen konsantrasyonlara ve hacimlere göre ve Sodyum selenitin (Na₂SeO₃)'un Tablo 6'da belirtilen konsantrasyonlar ve hacimler ile hazırlanan örnekler hazırlanan reaksiyon karışımları hafif çalkalamalı ortamda 1 saat 37°C'de inkübe edilmiş ve reaksiyonun durdurulması amacıyla her bir tüp içerisine 100 mM DTPA solüsyonu eklenmiş ve rnekler Western Blotlama ile görüntüleme yapılmak üzere Bölüm 2.7'de belirtilen işlem basamakları için buz üzerinde bekletilmiştir.

Tablo 4. Kontrol grubu protein-nitron bileşiklerini oluşturmak amaçlı hazırlanan bileşiklere ait konsantrasyon ve hacim tablosu.

	10µM protein	1mM H ₂ O ₂	1M DMPO	10mM PB
1	30 µl	-	-	270 µl
2	30 µl	10 µl	-	260 µl
3	30 µl	20 µl	-	250 µl
4	30 µl	40 µl	-	230 µl
5	30 µl	-	30 µl	240 µl
6	30 µl	10 µl	30 µl	230 µl
7	30 µl	20 µl	30 µl	220 µl
8	30 µl	40 µl	30 µl	200 µl

Tablo 5. Çinko grubu protein-nitron bileşiklerini oluşturmak amaçlı hazırlanan bileşiklere ait konsantrasyon ve hacim tablosu

10µM protein	1mM Zn ₃ (PO ₄) ₂	1mM H ₂ O ₂	1M DMPO	10mM PB
30 µl	-	40 µl	-	230 µl
30 µl	10 µl	40 µl	-	220 µl
30 µl	20 µl	40 µl	-	210 µl
30 µl	40 µl	40 µl	-	190 µl
30 µl	-	40 µl	30 µl	200 µl
30 µl	10 µl	40 µl	30 µl	190 µl
30 µl	20 µl	40 µl	30 µl	180 µl
30 µl	40 µl	40 µl	30 µl	160 µl

Tablo 6. Selenyum grubu protein-nitron bileşiklerini oluşturmak amaçlı hazırlanan bileşiklere ait konsantrasyon ve hacim tablosu.

10µM protein	1nM Na ₂ SeO ₃	1mM H ₂ O ₂	1M DMPO	10mM PB
30 µl	-	40 µl	-	230 µl
30 µl	10 µl	40 µl	-	220 µl
30 µl	20 µl	40 µl	-	210 µl
30 µl	40 µl	40 µl	-	190 µl
30 µl	-	40 µl	30 µl	200 µl
30 µl	10 µl	40 µl	30 µl	190 µl
30 µl	20 µl	40 µl	30 µl	180 µl
30 µl	40 µl	40 µl	30 µl	160 µl

2.6. Hasar oluşturulmuş kalp proteinlerinin protein-nitron bileşiklerinin Western blotlama yöntemi ile görüntülenmesi

H₂O₂ varlığında protein-nitron bileşiklerinin oluşturulduğu protein karışımlarından 30µL alınarak, üzerine 11 µL 2X Laemmli sample buffer (1M Tris-HCl+%10SDS+%20Gliserol+%0,02 BFB)+ 0,5 mM DTT ile eklenmiş, 5 saniye döndürüldükten sonra, ardından ısıtıcı blokta 80°C’de 8 dakika denatüre edildikten sonra 2 dakika kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. %8’lik SDS-PAGE jel her bir kuyuya 12 µL yüklenen protein örnekleri 200 volta 1,5 saat dikey elektroforez sisteminde yürütülmüştür. 1,5 saat sonra tank içerisindeki yürütücü tampon (250mM Trizma + 1,92M Glisin + %20SDS, pH: 8.3) dökülerek yerine distile su eklenmiş ve jelin tampondan arındırılması sağlanmıştır. Jel, plastik aparatlar içerisinde çıkarılarak, daha evvel jel boyutuna göre kesilip metanolde bekletilmiş olan PVDF membran ile birlikte kaset ve süngerler ve Whatman kağıtları arasına hava kabarcıkları kalmamasına dikkat edilerek kasetler kapatılmış ve soğuk transfer tamponu (250mM Trizma , 1,92M Glisin, %20 Metanol, pH: 8.3) ile +4°C’de 1,5 saat süreyle 50 Volt’da proteinlerin jelden PVDF membrana transferi sağlanmıştır.

Proteinlerin membrana transferi sonrası spesifik olmayan (non-specific) bağlanmaları önlemek amacıyla, membranın üzerini tamamen kapatacak şekilde hazırlanmış olan Coating solüsyonu (1,59g Na₂CO₃ , 2,93g Na₂HCO₃, 0,2g NaN₃, pH 9.6) içerisindeki %2,5 Casein+%2,5 BSA içeren bloklama tamponu içerisinde oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edilmiş ve 10 dakika yıkama tamponu (10 mM Tris, %5 Tween, %0,25 BSA, %0,25 Kazein, pH: 7,4) içerisinde yıkanmıştır.

Membran bir gece +4°C'de hafif çalkalamalı ortamda yıkama solüsyonu içerisinde seyreltilmiş ve DMPO'ya özgü olan Anti-DMPO primer antikoru ile inkübe edilmiştir. Bu işlemin ardından yıkama tamponu ile 3 defa 10'ar dakika yıkayıp primer antikordan arındırılan membran üzerine Goat-anti Mouse primer antikoru eklenip oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edilmiştir.

Sekonder antikor inkübasyonunun ardından 3 defa 10'ar dakika yıkanan membranlar son yıkamanın ardından 1XTBS (pH=9,6) eklenerek membran görüntüleme yapılmak üzere hazırlanmıştır. Membran üzerine luminol eklenerek karanlık ortamda görüntü luminesans filme aktarılmıştır. Bilgisayara aktarılan film görüntüleri üzerinden luminesans miktarı uygun bir program yardımıyla belirlenmiştir.

2.7. İstatiksel analizler

Bütün deneylerde istatiksel analiz, Prism 6.0 GraphPad program kullanılarak Student t-test ile eş olmayan gruplara arasındaki farkın anlamlılık testi kullanılarak yapılmıştır. P değeri, 0,05'ten küçük ise bulgu anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

2.8. Kullanılan kimyasallar

Fosfat tamponu (PB) hazırlamak için NaH₂PO₄ ve Na₂HPO₄ kullanıldı; fosfat tampon tuzu (PBS) hazırlamak için KH₂PO₄, Na₂HPO₄, KCl ve NaCl kullanıldı; sodium asetat tampon (NaAc) hazırlamak için Asetik asit ve NaOH kullanıldı; EtOH, Tris-EDTA solüsyonu, CuCl₂; DTPA; Zn₃(PO₄)₂; Na₂SeO₃; KAc, NaCl EDTA, Triton-X ve L-arginine Camiolo buffer hazırlamak için kullanıldı. Trizma base, SDS western blotlamada SDS jellerini hazırlamak ve yürütme-transfer

tamponlarını hazırlamak amacıyla kullanıldı. Tris-HCl, Gliserol, BFB ve DTT Laemmli örnek tamponu hazırlamak amacıyla kullanıldı. Trizma base, NaCl, KCl TBS hazırlamak için, Na_2CO_3 , Na_2HCO_3 , NaN_3 kimyasalları Coating buffer hazırlamak için kullanıldı.

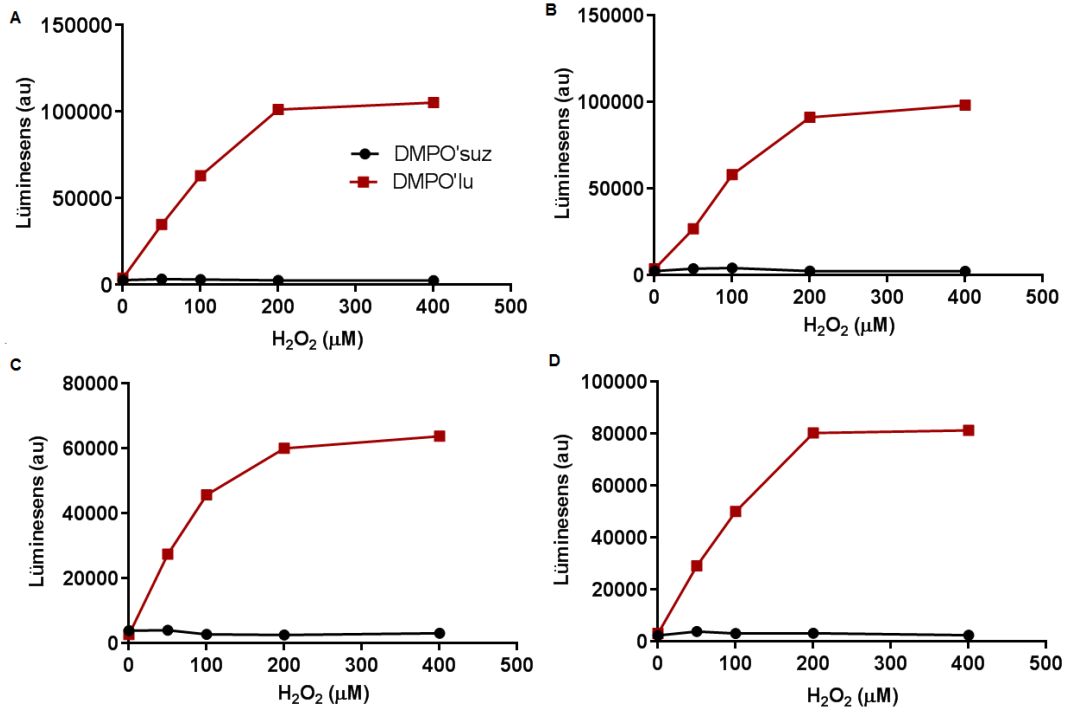
3. BULGULAR

3.1. Hidrojen peroksit varlığında DNA-nitron bileşiği oluşumunun İmmuno-spin yakalama tekniği ile gösterilmesi

Bu tez çalışmasında ana amaçlarımızın ilki immuno-spin yakalama tekniğini laboratuvarımızda çalışmaktır. Bu nedenle, tezin ik bulguları olarak bu teknik kullanılarak hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında DNA-nitron bileşiklerinin oluşması gösterilmiştir. Satın alınan DNA (1 mg/mL) ile ELISA ölçümleri Cu^{2+} (100 μM) varlığında ve farklı H_2O_2 konsantrasyonlarında (0-, 50-, 100-, 200- ve 400- μM) reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir.

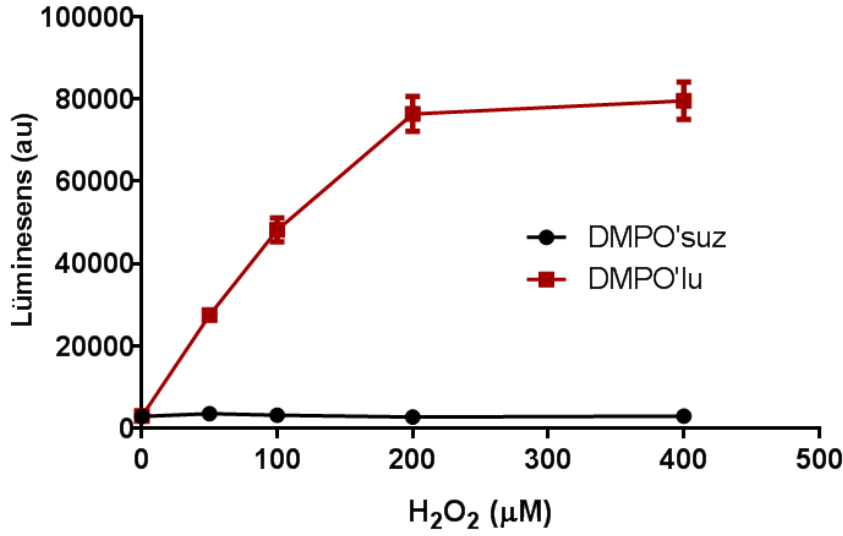
Her bir grup için 0 μM H_2O_2 luminesens sonucuna göre yapılan oranlara göre Şekil 3.1. (A-D) grafikleri elde edilmiştir.

Deneylede iki ana seri oluşturulmuş, bu serilerden ilkinde DNA-nitron bileşiğini tanıyan DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide) eklenmemiş, ikinci seri ise DMPO eklenerek reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. DMPO'nun bulunmadığı birinci seriden elde edilen sinyal ile DMPO'lu ikinci seriden elde edilen sinyal karşılaştırıldığında, birinci grupta luminesens değişimi olarak farklı H_2O_2 konsantrasyonlarında farklı yanıtlar elde edilmemiştir (Şekil 3.1. siyah renkli eğriler). DMPO bulunan ikinci seriden elde edilen sinyallerde ise tüm ölçümlerde farklı H_2O_2 konsantrasyonlarda artan ve sonra satüre olan luminesens değerleri ölçülmüştür (Şekil 3.1. kırmızı renkli eğriler). Burada 4 bağımsız ölçümün sonuçları örnek olarak verilmektedir (Şekil A-D).



Şekil 3.1. ELISA tekniği kullanılarak immuno-spin yakalama tekniği ile Cu²⁺ katalizörlüğünde farklı hidrojen peroksit (H₂O₂) konsantrasyonlarında (50, 100, 200 ve 400 μM) gerçekleştirilen DNA – nitron bileşiği sonuçlarının luminesens şiddet değişimi olarak gösterilmesi (dört bağımsız ölçüm sonuçları A-D 'de örnek olarak verilmiştir). Burada kırmızı grafikler DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide) varlığında, siyah eğriler ise DMPO yokluğunda yapılan ölçümleri göstermektedir.

Birbirinden bağımsız olarak gerçekleştirilen 8 farklı deney serisinin ortalama sonuçları alındığı zaman elde edilen sonuçta DMPO bulunmayan örneklerin sinyalleri farklı H₂O₂ konsantrasyonları için farklı bulunmamıştır. Fakat DMPO bulunan ikinci serilere ait örneklerin ortalama değerleri grafikte H₂O₂ 50 μM, 100 μM ve 200 μM eklendiğinde elde edilen sinyalde (Şekil 3.2, kırmızı renkli eğriler) lineer olmayan bir artış görülmüştür. DMPO'lu serilerin 400 μM H₂O₂ bulunan son örneklerinden alınan sinyallerin 200 μM'da maksimum değere eriştiği ve bu değerden sonra artış veya azalma göstermeyerek sabitlendiği görülmüştür.

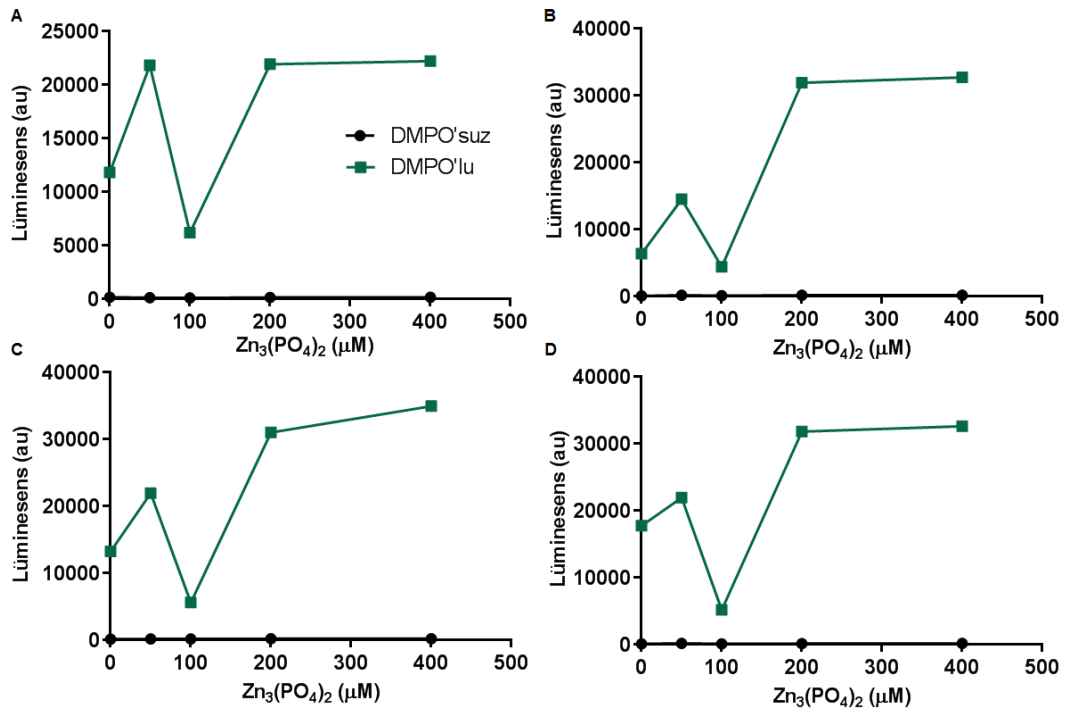


Şekil 3.2. ELISA tekniği kullanılarak immuno-spin yakalama tekniği ile Cu^{2+} katalizörlüğünde farklı hidrojen peroksit (H_2O_2) konsantrasyonlarında (50, 100, 200 ve 400 μM) gerçekleştirilen DNA – nitron bileşiği sonuçlarının ortalama ($\pm\text{SEM}$) değişim grafiği. Kırmızı grafikler DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide) varlığında, siyah eğriler ise DMPO yokluğunda yapılan ölçümleri göstermektedir. Ortalama değerler 8 farklı ölçümden elde edilmiştir.

3.2. Çinko varlığında oluşturulan DNA-nitron bileşiklerine ait luminesens yanıtlarının karşılaştırılması

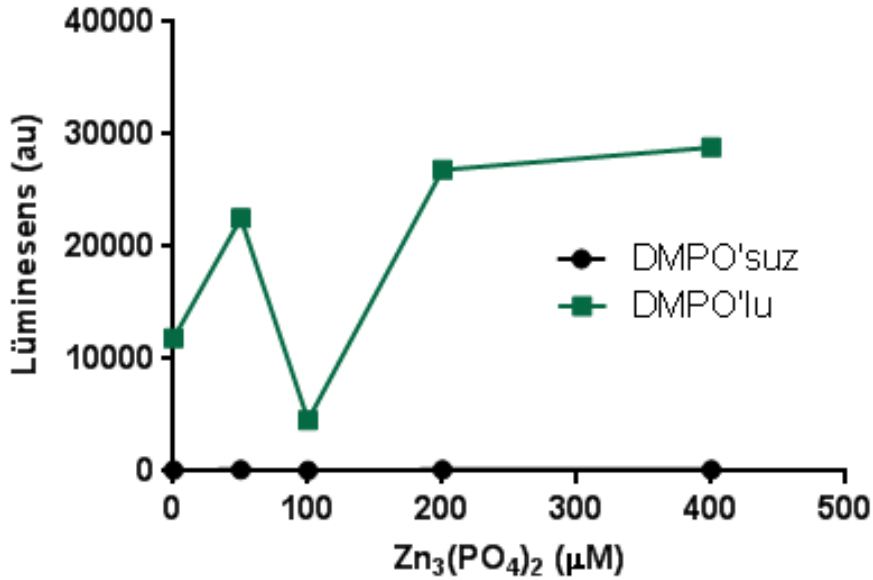
Bir önceki bölümde elde edilen verilere göre elde edilen en yüksek oksaidan etkisi olan H_2O_2 'nin 200 μM değeri göz önüne alınarak, bu grup incelemelerimizde çinkonun [çinko sülfat, $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$] DNA–nitron bileşiği oluşumundaki etkileri konsantrasyon bağımlı olarak incelenmiştir. Bu incelemede değişmeyen tek bir H_2O_2 (200 μM) varlığında reaksiyon gerçekleştirilmiş olup bu reaksiyonlarda çinko farklı konsantrasyonlarda kullanılmıştır (0-, 50-, 100-, ve 200- μM). Elde edilen luminesans değişimleri (DMPO varlığında; yeşil eğriler ve DMPO yokluğunda; siyah eğriler) Şekil 3.3. de verilmiştir. Yine bu şekilde 4 farklı deney sonuçları örnek olarak sunulmuştur.

DMPO yokluğunda ve 200 μM H_2O_2 varlığında DNA-nitron bileşiği oluşumu için farklı $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ konsantrasyonlarında değişmeyen lüminesans değerleri ölçülürken, DMPO ve 200 μM H_2O_2 varlığında yine benzer bileşik oluşumu yine farklı $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ eklenen konsantrasyonları altında gerçekleştirildiğinde, farklı lüminesans yanıtları gözlenmiştir. Yine 4 farklı ölçüm için elde edilen lüminesans değişim eğrileri Şekil 3.3'te sunulmuştur. Elde edilen ortalama yanıt eğrileri incelendiğinde (Şekil 3.4.), örneğin, 50 μM $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ varlığında gözlenen sinyal artışının, 100 μM $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ varlığında hemen hemen ortadan kalktığı, buna karşın artan $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ konsantrasyonlarında (200- ve 400- μM gibi) sinyalin artmaya devam ettiği gözlenmiştir.



Şekil 3.3 Immuno-spin yakalama tekniği kullanılarak çinko sülfatın [$\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$] Cu^{2+} katalizörlüğünde 200 μM hidrojen peroksit (H_2O_2) konsantrasyonunda elde edilen DNA-nitron bileşiği üzerindeki etkilerinin (oksidant ve antioksidant) gösterilmesi. Burada, yeşil renkli grafik DMPO varlığında, siyah renkli grafik ise DMPO yokluğunda yapılan ölçüm sonuçlarını göstermektedir. Burada dört farklı deney sonuçları örnek olarak (A-D) verilmiştir

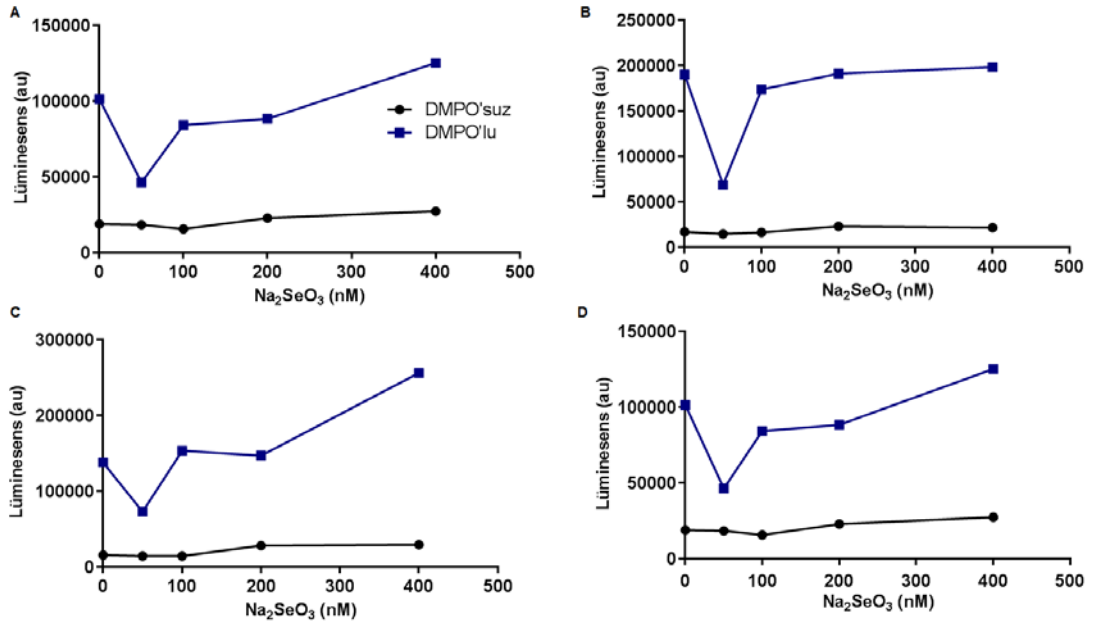
Bu elde edilen bulgular bize, 200 μM H_2O_2 varlığında elde edilen DNA-nitron oluşumunun 100 μM $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ varlığında durduğunu, buna karşılık artan konsantrasyonlarda daha da hızlanarak devam ettiğini göstermektedir. Burada, 100 μM $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ ile elde edilen eğrinin bize bu değerin bir antioksidan türden etki olabileceğini, diğer konsantrasyonların ise pro-oksidan gibi etki gösterdiğini düşündürmüştür.



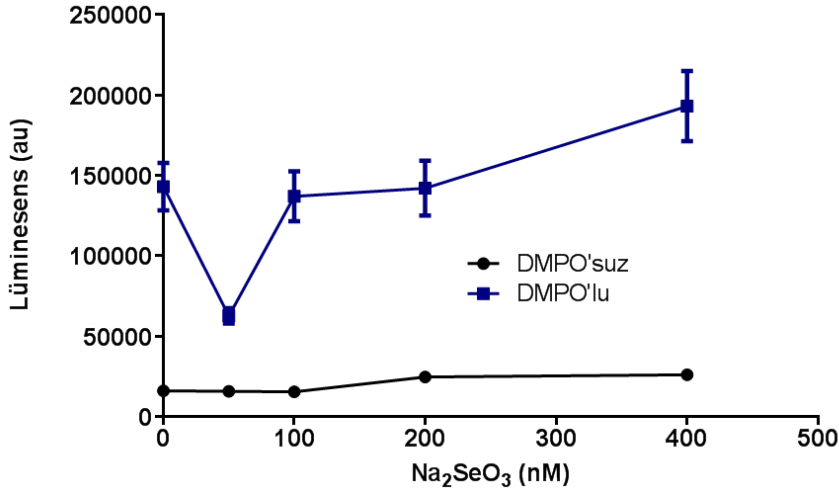
Şekil 3.4. Immuno-spin yakalama tekniği kullanılarak çinko sülfatın [$\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$] Cu^{2+} katalizörlüğünde 200 μM hidrojen peroksit (H_2O_2) konsantrasyonunda elde edilen DNA-nitron bileşiği üzerindeki etkilerinin (oksidant ve antioksidant) ortalama ($\pm\text{SEM}$) lüminesens değişimi olarak gösterilmesi. Burada, yeşil renkli grafik DMPO varlığında, siyah renkli grafik ise DMPO yokluğunda yapılan ölçüm sonuçlarını göstermektedir. Ortalama değerler 6 farklı ölçümden elde edilmiştir.

3.3. Selenyum varlığında oluşturulan DNA-nitron bileşiklerine ait luminesens yanıtlarının karşılaştırılması

Bölüm 3.2’de açıklanan şekilde tüm ölçümler bu grup incelemelerimizde ise bir başka antiokisan olarak bilinen element olan selenyum etkisi incelenmiştir. Selenyum bileşiği olarak sodyum selenit [Na_2SeO_3] seçilmiştir. Sodyum selenit için yine farklı konsantrasyonlar denemiştir (0-, 50-, 100-, ve 200-nM). Yine 4 farklı ölçüm için elde edilen lüminesans değişim eğrileri Şekil 3.5’te sunulmuştur. Elde edilen ortalama yanıt eğrileri incelendiğinde (Şekil 3.6.), örneğin, 50 nM Na_2SeO_3 varlığında gözlenen sinyalin hemen hemen ortadan kalktığını, buna karşın artan Na_2SeO_3 konsantrasyonlarında (100-, 200- ve 400- μM gibi) sinyalin artmaya devam ettiği gözlenmiştir.



Şekil 3.5. Immuno-spin yakalama tekniği kullanılarak sodyum selenitin [Na_2SeO_3] Cu^{2+} katalizörlüğünde 200 μM hidrojen peroksit (H_2O_2) konsantrasyonunda elde edilen DNA-nitron bileşiği üzerindeki etkilerinin (oksidant ve antioksidant) gösterilmesi. Burada, mavi renkli grafik DMPO varlığında, siyah renkli grafik ise DMPO yokluğunda yapılan ölçüm sonuçlarını göstermektedir. Burada dört farklı deney sonuçları örnek olarak (A-D) verilmiştir.



Şekil 3.6. Immuno-spin yakalama tekniği kullanılarak sodyum selenitin[Na₂SeO₃] Cu²⁺ katalizörlüğünde 200 µM hidrojen peroksit (H₂O₂) konsantrasyonunda elde edilen DNA-nitron bileşiği üzerindeki etkilerinin (oksidant ve antioksidant) ortalama (±SEM) lüminesens değişimi olarak gösterilmesi. Burada, mavi renkli grafik DMPO varlığında, siyah renkli grafik ise DMPO yokluğunda yapılan ölçüm sonuçlarını göstermektedir. Ortalama değerler 6 farklı ölçümden elde edilmiştir.

Bu elde edilen bulgular bize, 200 µM H₂O₂ varlığında elde edilen DNA-nitron oluşumunun 50 nM Na₂SeO₃ varlığında durduğunu, buna karşılık artan konsantrasyonlarda daha da hızlanarak devam ettiğini göstermektedir. Burada, 50 nM Na₂SeO₃ ile elde edilen eğrinin bize bu değer bir antioksidan türden etki olabileceğini, diğer konsantrasyonların ise pro-oksidan gibi etki gösterdiğini düşündürmüştür.

3.4. Protein-nitron bileşikleriyle gerçekleştirilen Western blotlama bulguları

Bölüm 3.1, 3.2 ve 3.3'te DNA üzerindeki immuno-spin-yakalama tekniği ile elde edilen protein-nitron bileşiklerinin tespitinde bir temel basamak olması amacıyla yapılmıştır. Daha önceki bölümlerde yapılan incelemelerle elde edilen sonuçlarla, immuno-spin-yakalama tekniğinin DNA-nitron bileşiklerinin tespitinde kullanılabileceği, çinko ve selenyum gibi elementlerin oksidan/antioksidan etkileri tespit edilmiş ve gösterilmiştir.

İncelemelerimizin bu aşamasında, immuno-spin-yakalama tekniğinin, protein-nitron oluşumunda kullanılıp kullanılmayacağı incelenmiştir. İncelememizde kullanılan proteinler, Anabilim Dalımızda mevcut olan normal ve besleme yoluyla metabolik sendrom oluşturulmuş sıçanların kalp dokularından izole edilmiştir. Bu yolla, bu tekniğin metabolik sendrom indüklü kalp dokusu proteinlerinde hasar olup olmadığını inceleme olanağı elde edilmiştir.

3.4.1. Sıçan kardiyomiyositlerinden izole edilen toplam proteinlerde protein-nitron oluşumunun Western blotlama ile gösterilmesi

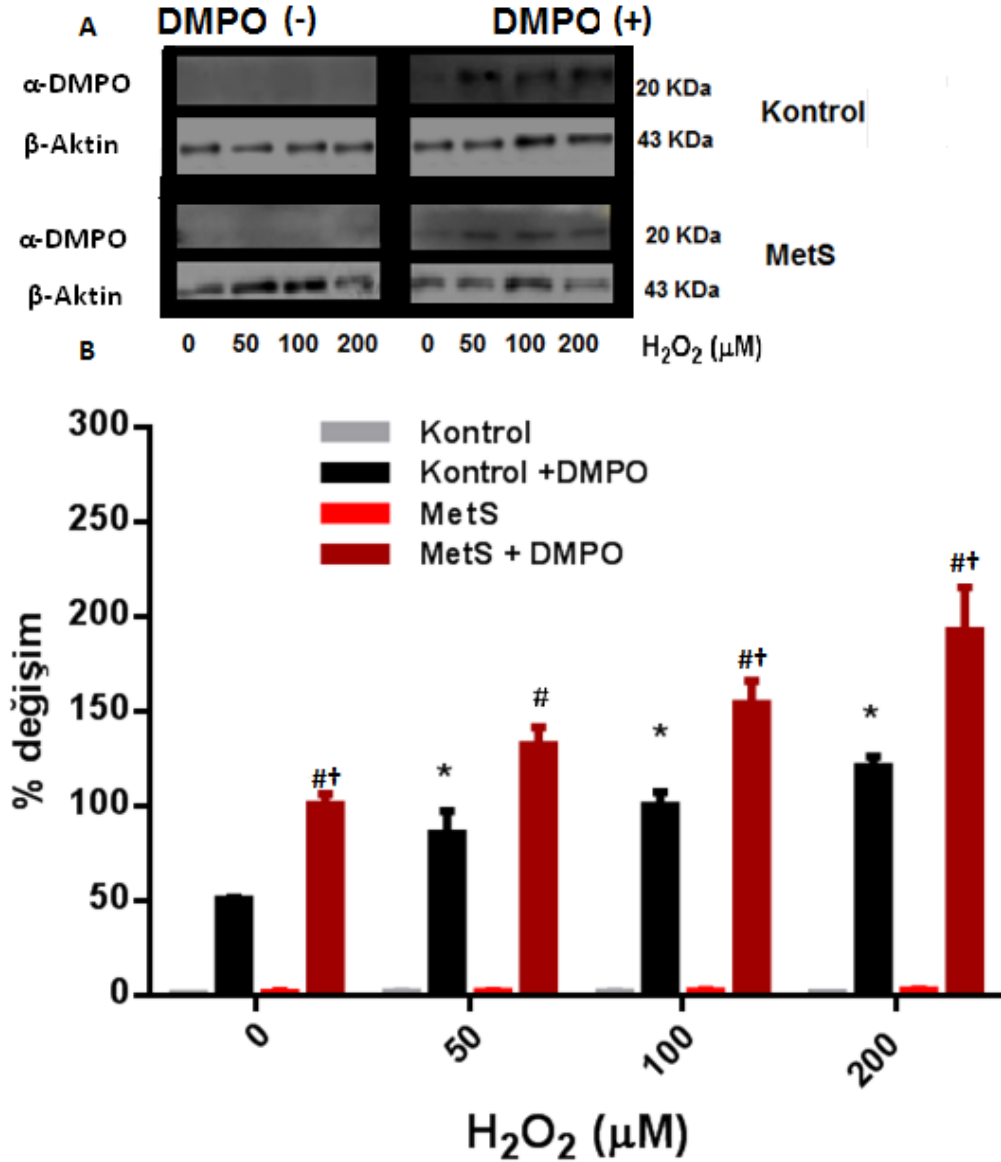
Deneyleerde kontrol ve metabolik sendromlu sıçan sol ventrikülünden izole edilmiş kardiyomiyositlerden elde edilen protein örnekleri kullanılarak, bunlardan protein-nitron bileşikleri oluşturulmuştur. Değişmeyen miktarlarda protein içeren örnekler 0-, 50-, 100-, ve 200- μ M konsantrasyonlarda H_2O_2 ile muamele edilmiştir. Western blotlama yöntemi ile bileşenlerine ayrılan protein örnekleri, PVDF membrana aktarılmış ve X-Ray film ile görüntülenmiştir. Şekil 3.7. A'da kontrol grubu sıçanlar için oluşturulmuş olan protein-nitron bileşiklerinin anti-DMPO antikoru ve β -aktin ile inkübasyonlarına ait Western blot ile elde edilen orijinal bant görüntüleri verilmiştir.

Anti-DMPO antikorusunun bağlandığı proteine yaklaşık 11 kDa'luk bir ağırlık kazandırdığı bilinmektedir (Gomez-Mejiba, 2009). Elde edilen bant görüntüleri filmde protein belirtecinin yaklaşık 20 kDa düzeyinde görüldüğü için DMPO-protein nitron bileşiğinin ağırlığı 20 kDa olarak gösterilmiştir. Şekil 3.7.A'da metabolik sendromlu sıçanlara ait proteinler ile oluşturulmuş protein-nitron bileşiklerinin anti-DMPO antikoru ve β -aktin antikoru ile inkübasyonu sonucu elde edilen orijinal bant görüntüleri verilmiştir.

Her bir deney grubu önce ayrı ayrı kendi içerisinde değerlendirmeye alınmış olup, her bir grubun H_2O_2 uygulaması için konsantrasyon bağımlı protein-nitron bileşiklerinin artışında önemli bir etken olup olmadığı incelenmiştir. Hem kontrol grubunda hem de metabolik sendrom proteini grupları için DMPO varlığında sinyal

görülebildiği, bu sinyalin ortamda DMPO olmadığı durumlarda görülmediği tespit edilmiştir. Artan H₂O₂ konsantrasyonu varlığında hem DMPO ve hem de DMPO'suz olarak kontrol grubu sıçan kardiyomiyosit proteinlerinde nitron oluşumu incelendiğinde, tüm konsantrasyonlardaki 50, 100, 200 µM H₂O₂'nin her biri ortamdaki H₂O₂ bulunmayan kontrol grubu proteinleri ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar görülmüştür. Benzer şekilde, metabolik sendromlu sıçan gruplarına ilişkin proteinlerinden DMPO varlığında elde edilen protein-nitron bileşiklerinin her bir H₂O₂ konsantrasyonunda gözlenen lüminesans sinyalinin H₂O₂'suz olan metabolik sendrom grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farklı olduğu görülmüştür (P<0,05).

Bu durumdan çıkarılabilecek sonuç metabolik sendromlu grubun proteinlerinde meydana gelen oksidatif hasar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, meydana gelen oksidatif hasara göre daha yüksek seviyelerde olduğunu düşündürmüştür.



Şekil 3.7. Kontrol ve metabolik sendromlu sıçan kalplerinden elde edilen proteinlerinde H_2O_2 'nin 50, 100, 200 μ M konsantrasyonları ile oluşturulan protein-nitron bileşiklerinin immuno-spin-yakalama yöntemi ile tespit edilmesi. Kontrol grubuna ait Western blotlama bant görüntüleri (A) α -DMPO antikoruna ve aynı örneklerin β -aktin antikoruna ait bant görüntüleri; metabolik sendrom grubuna ait Western blotlama bant görüntüleri (B) n=3 örnek sayısına göre ortalama % değişim grafiği. *P<0,05 Kontrol grubunda 0 μ M H_2O_2 'ye göre, #P<0,05 Metabolik sendrom grubunda 0 μ M H_2O_2 'ye göre, †P<0,05 Her bir konsantrasyon için metabolik sendrom grubunun kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık farkını belirtmektedir.

3.4.2. $Zn_3(PO_4)_2$ varlığında oluşturulan protein-nitron bileşiklerine ait Western blotlama sonuçlarının değerlendirilmesi

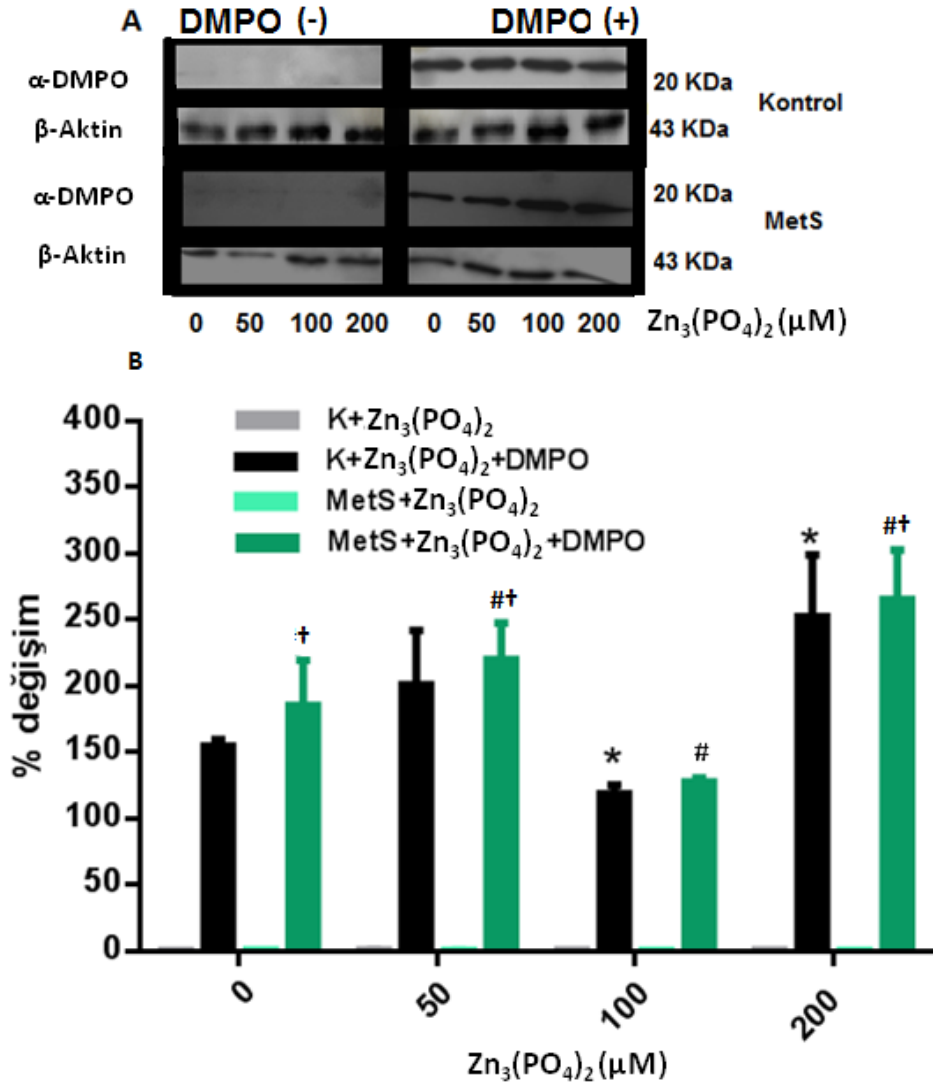
Aynı miktarlarda protein içeren örnekler, $200 \mu M H_2O_2$ varlığında ve değişen (0-, 50-, 100-, ve $200\text{-}\mu M$) $Zn_3(PO_4)_2$ miktarlarına maruz bırakılarak, protein-nitron bileşikleri oluşturulmuş ve oluşturulan protein-nitron bileşiklerinin düzeyi ve farklı $Zn_3(PO_4)_2$ konsantrasyonlarına verdiği yanıtlar belirlenmeye çalışılmıştır. Bu grup ölçümler için elde edilen Western blot bantlarına ait görseller Şekil 3.8. A'da ve tüm ölçümler için elde edilen band-şiddet değerlerinin ortalamaları ($\pm SEM$) bar-grafikleri olarak B'de verilmiştir. Bu grup ölçümlerin tümü yine DMPO yokluğunda ve varlığında yapılmış olup, nitron oluşumu için $200 \mu M H_2O_2$ konsantrasyonu seçilmiştir. Bant görüntülerinden de anlaşılacağı üzere ortamda DMPO'nun bulunmadığı, gerek kontrol proteini gerekse metabolik sendrom proteini gruplarında bant görülmez iken, ortama eklenen DMPO sayesinde bant görüntüleri elde edilebilmiştir (Şekil 3.8.A). Farklı zamanlarda gerçekleştirilmiş olan üç farklı deney sonucu ortalamalarının % değişim grafiğinde de görüldüğü gibi, kontrol grubu sıçan kardiyomyositlerinden izole edilmiş olan proteinlerde, bu oksidan ajan varlığında ($200 \mu M H_2O_2$) oluşan protein-nitron bileşiği, DNA-nitron bileşiği oluşumundakine benzer şekilde, $100 \mu M Zn_3(PO_4)_2$ varlığında minimum değerdedir. Benzer şekilde, metabolik sendromlu sıçan kalp dokusu proteinlerinde de $200 \mu M H_2O_2$ varlığında DMPO'suz ve DMPO'lu nitron oluşumu karşılaştırıldığında, DMPO ve yine $100 \mu M Zn_3(PO_4)_2$ varlığında diğer yanıtlarla karşılaştırıldığında yine bu yanıt minimum değerdedir. Kontrol grubunda gerçekleştirilen istatistiksel hesaplamalar sonucunda $100 \mu M Zn_3(PO_4)_2$ ve $200 \mu M Zn_3(PO_4)_2$, $Zn_3(PO_4)_2$ içermeyen örnek ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farklı bulunmuştur.

Metabolik sendrom grubundaki istatistiksel hesaplamalar sonucunda elde edilen verilere göre $Zn_3(PO_4)_2$ 'ın tüm konsantrasyonları, $Zn_3(PO_4)_2$ bulunmayan örneklere göre istatistiksel olarak farklı bulunmuştur. Kontrol ve metabolik sendrom proteinleri arasındaki gerçekleştirilen istatistiksel hesaplamalara göre $50 \mu M$ ve 200

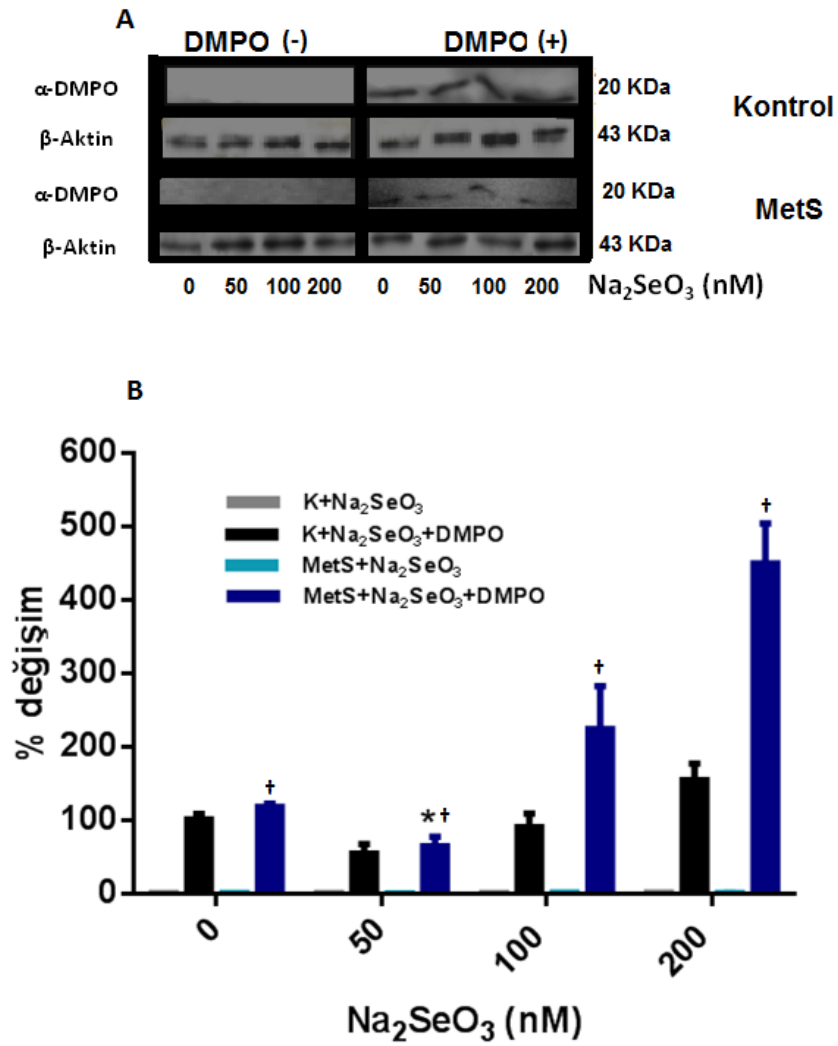
$\mu\text{M Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ bulunan metabolik sendrom proteinli örnekler kontrol grubuna göre istatistiksel olarak fark gösterdiği gözlemlenmiştir ($P < 0,05$).

3.4.3. Na_2SeO_3 varlığında oluşturulan protein-nitron bileşiklerine ait Western blotlama sonuçlarının değerlendirilmesi

Daima aynı miktarda protein miktarı içeren örnekler $200 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ile üzerine 0-, 50-, 100-, ve 200-nM Na_2SeO_3 kullanılarak protein-nitron bileşikleri oluşturulmuş ve oluşturulan protein-nitron bileşiklerinin düzeyi ve farklı Na_2SeO_3 konsantrasyonlarına verdiği yanıtlar belirlenmeye çalışılmıştır. Bu grup ölçümler için elde edilen Western blot bantlara ait görseller Şekil 3.9. A'da ve tüm ölçümler için elde edilen band-şiddet değerlerinin ortalamaları ($\pm\text{SEM}$) bar-grafikleri olarak B'de verilmiştir. Burada, kontrol grubu protein bandları ve metabolik sendrom grubu protein bandları (A)'da verilmiştir. Bu grup ölçümlerin tümü yine DMPO yokluğunda ve varlığında yapılmış olup nitron oluşumu için $200 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ konsantrasyonu seçilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, hem kontrol hem de metabolik sendromlu sıçan kardiyomiyositlerinden izole edilmiş olan proteinlerde, $200 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ oluşan protein-nitron bileşiği, DNA-nitron bileşiği oluşumundakine benzer şekilde, 50 nM Na_2SeO_3 varlığında minimum değerdedir. Kontrol grubu için Na_2SeO_3 bulunmayan gruba göre istatistiksel hesaplamalar sonucunda gruplar arasında fark görülmemiş iken, metabolik sendrom grubunda 50 nM Na_2SeO_3 sinyalinin Na_2SeO_3 bulunmayan örneğe göre istatistiksel olarak farklı olduğu tespit edilmiştir. Buna karşın, metabolik sendromlu sıçan kardiyomiyosit proteinlerinde $200 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ varlığında DMPO'lu nitron oluşumu, kontrol proteinlerinde oluşan nitron bileşiklerine göre 50, 100, 200 nM değerlerinin hepsi için istatistiksel olarak fark göstermiştir.



Şekil 3.8. Kontrol ve metabolik sendromlu sıçan kalplerinden elde edilen proteinlerinde 200 μ M H_2O_2 ile oluşturulan protein-nitron bileşiklerinin $Zn_2(PO_4)_3$ bileşiğinin 50,100, 200 μ M konsantrasyonları uygulandığında verdiği cevabın immuno-spin-akalama yöntemi ile tespit edilmesi. Kontrol grubuna ait Western blotlama bant (A) α -DMPO antikoruna ile inkübasyon ve aynı örneklerin β -aktin antikoruna ile inkübasyonuna ait bant görüntüleri; metabolik sendrom grubuna ait Western blotlama bant görüntüleri (B) n=3 örnek sayısına göre ortalama % değişim grafiği. * $P<0,05$ Kontrol grubunda 0 μ M $Zn_3(PO_4)_2$ 'ye göre, # $P<0,05$ Metabolik sendrom grubunda 0 μ M $Zn_3(PO_4)_2$ 'ye göre, † $P<0,05$ Her bir konsantrasyon için metabolik sendrom grubunun kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık farkını belirtmektedir.



Şekil 3.9. Kontrol ve metabolik sendromlu sıçan kalplerinden elde edilen proteinlerinde 200 μM H_2O_2 ile oluşturulan protein-nitron bileşiklerinin Na_2SeO_3 bileşiğinin 50,100, 200 μM konsantrasyonları uygulandığında verdiği cevabın immuno-spin-yakalama yöntemi ile tespit edilmesi. Kontrol grubuna ait Western blotlama bant (A) α -DMPO antikoruna ile inkübasyon ve aynı örneklerin β -aktin antikoruna ile inkübasyonuna ait bant görüntüleri; metabolik sendrom grubuna ait Western blotlama bant görüntüleri (B) n=3 örnek sayısına göre ortalama % değişim grafiği. *P<0,05 Kontrol grubunda 0 nM Na_2SeO_3 'e göre, #P<0,05 Metabolik sendrom grubunda 0 nM Na_2SeO_3 'e göre, †P<0,05 Her bir konsantrasyon için metabolik sendrom grubunun kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık farkını belirtmektedir.

4. TARTIŞMA

Biyolojik sistemlerde (doku, hücre, protein, DNA gibi) çok kısa ömürlü serbest radikallerin oluşumunu gözlemek amacıyla genel olarak kullanılan elektron spin rezonans (ESR) tekniğine ek olarak geliştirilen immün-spin-yakalama tekniği bu tez çalışması kapsamında laboratuvarımızda kurulmuş ve sıçan kalp dokusundan izole edilen proteinlerde akut oksidan etkisinde serbest radikal oluşumu normal ve metabolik sendromlu sıçan örneklerinden elde edilen veriler karşılaştırılarak gözlenmiştir. Ayrıca bu tez çalışmasında, bu teknik kullanılarak, selenyum ve çinko gibi hem antioksidan hem de pro-oksidan özellikleri taşıyan iz elementlerin hangi konsantrasyonlarda bu özellikleri gösterdikleri yine bu teknik kullanılarak gösterilmiştir.

Biyolojik sistemlerde (doku, hücre, protein, DNA gibi) serbest radikallerin varlığı son ürün analizleri ile veya antioksidant enzimlerin etki çalışmalarından genel olarak elektron spin rezonans (ESR) tekniği kullanılarak anlaşılabilmiştir. Farklı ve çok sayıda *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ESR kullanılarak serbest radikal metabolitleri gözlenebilmişlerdir (Janzen ve Haire, 1990). Daha sonraki gelişmeler ile biyolojik sistemlerdeki kısa ömürlü radikaller için bu tekniğin yeterli olmadığı gösterilerek ve çeşitli çalışmalarla doğrulanan bir teknik daha geliştirilmiştir (Ramirez ve ark., 2006). Spin-trapping tekniği daha kararlı bir serbest radikal, yani bir radikal addüksiyonu yapmak için serbest bir radikalın bir diamagnetik spin trapın çift bağına takmak için kullanılan bir tekniktir (Mason, 2004). Bu nedenle ESR ile daha iyi inceleme yapılabilmesine ve serbest radikal oluşumunu biyolojik sistemlerde gözlemek için uzun yıllar tek bir teknik olarak kabul görmüş olmasına karşın her biyolojik örnek için uygulanabilirliğinin güç olması ve oldukça pahalı bir sistem olması nedenleriyle her laboratuvara katılması mümkün olamamıştır. Buna karşın protein veya DNA radikallerinin nitron addüksiyonlarını gözlemek için bir immunoassay tekniğinin geliştirilmesi immunolojik tekniklerin serbest radikal biyolojisinde çok önemli bir güç kazanmasına yol açmıştır (Gomez-Mejiba ve ark.,

2009). Bu teknik sayesinde protein veya DNA düzeyinde çok hızlı radikal oluşumu çok hassas olarak ölçülebilmektedir (Ramirez ve ark., 2005).

Mason ve arkadaşlarının (2004) ESR tekniğini modifiye ederek, DMPO adı verilen bileşik vasıtası ile gerçekleştirdikleri ölçüm yolları bu tez çalışmasında gerçekleştirilmiştir. DNA'da oluşturulan nitron bileşiği protokolü literatürde belirtildiği gibi uygulanmıştır (Gomez-Mejiba ve ark.,2009). Deney sonuçlarımız literatürde elde edilmiş sonuç ile benzerlik göstermiş olup, DNA'nın H₂O₂ varlığında Cu²⁺ katalizörlüğünde inkübasyonu ile oluşturulan DNA-nitron bileşikleri ortamda DMPO bileşiğinin bulunmadığı durumlarda ELISA deneylerinde sinyal oluşturmaz iken, ortama DMPO eklendiği zaman H₂O₂'nin artan konsantrasyonu ile sinyalin de arttığı sonuçlar elde edilmiştir. Serbest bir radikal olmamasına rağmen Cu²⁺ iyonunun katalizörlüğü ile Fenton-tip reaksiyona benzerlik gösteren tepkimeler ile H₂O₂'yi etkili bir oksidan olarak görmemize neden olmuştur. H₂O₂'nin DNA'da oluşturduğu DNA-nitron bileşiklerinin miktarı, etkili olarak tespit edilebilmesi için DNA-nitron bileşiği ile kararlı bir bileşik oluşturan ve yarılanma ömrü DNA-nitron bileşiğinin tespit edilmesi safhasında yeteri kadar uzun olmasından dolayı DMPO'nun kullanılması büyük avantaj sağlamıştır.

Çalışmamızda kullanmış olduğumuz immüno-spin-yakalama yöntemi, DNA ve protein-bileşikleri için biyolojik örneklerde serbest radikal biyokimyası çalışmalarında etkili olarak, ayrıca hücreler, hayvanlar gibi biyolojik sistemler açısından en az toksik ve en etkili yöntem olarak kullanılmaya uygun bir yöntem olduğu bizim çalışma sonuçları ile de teyit edilmiştir. Ayrıca bu çalışma kapsamında, yine bu yöntem kullanılarak, Zn ve Se gibi iz elementlerinin *in vitro* koşullarda hangi konstanrasyonlarda bir antioksidan veya pro-oksidan gibi davranabildikleri kardiyomiyositlerden izole edilen toplam proteinlerde gösterilmiştir. Redoks biyokimyası araştırmalarında yapılmış olan son çalışma raporlarında antioksidanların diyet ile alınımı ve oksidatif stres hasarı arasında ters bir ilişki olduğunu göstermektedir (Gökalp ve ark., 2003; Sulak ve ark., 2005). Buna göre, antioksidan takviyesinin oksidatif hasarı sınırlandırmak için yeterli

olabileceği belirtilmiştir (Barkat ve ark., 2014). Bu nedenlerle tüm biyolojik sistemlerde eser element olan Se ve Zn bileşiklerinin kombinasyonu besin takviyeleri üretimi yapılmaktadır. Sonuç olarak, Se ve Zn bir organizmanın fonksiyonlarını düzenleyebilecek önemli iz elementler olarak kabul edilmiştir. Ayrıca Zn elementi SOD enziminin ko-faktör tamamlayıcısı olarak 200'den fazla enzim ve transkripsiyon faktörünün tamamlayıcı bileşeni olarak da biyolojik sistemlerde görev yapmaktadır (Barkat ve ark., 2014).

Zn, biyokimyasal olayların geniş bir alanında temel rol oynayan ve memeli merkezi sinir sisteminde düzenleyici öneme sahip olan çeşitli protein, hormon ve hormon reseptörlerinin yapısal bileşeni olarak tanımlanmıştır (Nowak, 2000). Buna ek olarak, Zn bir antioksidan olan SOD enziminin bileşeni olduğu gibi metalotiyoninlerin de fizyolojik işlevlerini düzenleyen bir iyonudur. Ayrıca Zn, serbest radikallerin artışı gerçekleştirilen tiyoller ve Fe arasındaki reaksiyonları engelleyen ve nükleik asit onarıcı enzimler ve membran kararlılığını sağlayıcı faktörlerin önemli bir bileşenidir (Barkat ve ark.)

Çinko iyonunun (Zn^{2+}) biyoloji sistemlerde sinyal yolları, mitokondri metabolizmasını ve hücrenin redoks durumunu etkileyebilen bir molekül olmasından (Tuncay ve ark., 2010) ve hücre proliferasyonu, bağışıklık fonksiyonu ve serbest radikallere karşı hücre savunma mekanizmalarında etkin şekilde görev yapıyor olmasından (Dreosti, 2001; Ho, 2004; Falcchuk, 1998; Bray ve Bettger, 1990; Powell, 2000; Cousins ve ark., 2003) ötürü, bu çalışmada pro-oksidan ve antioksidan özellikleri açısından değerlendirilmeye alınmış olup, ELISA deneyi ile DNA-nitron bileşikleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre Zn^{2+} 'nin pro-oksidan ve antioksidan özelliklerinin bu iyonun konsantrasyonuna bağımlı olarak farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen verilere göre, Zn^{2+} 'nin mikro molar seviyesinde konsantrasyonlarının genel olarak DNA üzerinde H_2O_2 ile birlikte bir pro-oksidan etki gösterdiği, ancak $100 \mu M Zn_2(PO_4)_3$, DNA-nitron bileşiklerinden elde edilen ELISA sinyalinde belirgin azalmalar görülmüştür (Şekil 3.2). Bu sonuç bize DNA-nitron bileşiğinde $100 \mu M Zn_2(PO_4)_3$ bileşiğinin antioksidan etki gösterebileceğini göstermektedir.

Se, GSH-Px enziminin bir ko-faktörü olmasından ötürü (Rotruck ve ark., 1973; Schwarz ve Foltz, 1957) biyolojik olarak öneme sahiptir ve her alt ünitesinde selenosistein şeklinde bir adet Se içeren GSH-Px enzimi, hücre içinde hidrojen peroksidin suya indirgenmesinde önemli rol oynamaktadır (Kralj ve Gorup,2004). Ayrıca Keshan hastalığı gibi endemik fatal kardiyomyopati bulunan bölgede sodyum selenit uygulamasından sonra hastalık insidanzının azalması bu elemenin (Chen ve ark., 1980) biyolojik önemine dikkat çekmektedir. Selenyum takviyesi kronik dejeneratif hastalıkların önleyebilmekte ve bir çok intraselüler sistemin antioksidan kapasitesini arttırarak oksidatif stres yanıtının düzenleyici bir modülatörü olarak gösterilmiştir (Rayman, 2002).

Selenyumun, özellikle hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerin temizlenmesi, zincirleme oksidasyonlarını durdurması ve vücutta oluşturduğu selenoproteinlerin antioksidan özelliğe sahip olması gibi biyolojik işlevlerinden ötürü, deneylerimizdeki bir diğer pro-oksidan ve antioksidan ilişkisi incelemek üzere kullandığımız iyondur.

ELISA deneyi ile gerçekleştirilen H_2O_2 varlığı ve Cu^{2+} katalizörlüğünde DNA-nitron bileşiklerinin oluşturulması deneylerinde, selenyum iyonunun nanomolar konsantrasyonlardaki pro-oksidan ve antioksidan etkileri gözlemlenmiştir. Elde edilmiş olan verilere göre, ortama 50 nM sodyum selenit eklendiği zaman oluşan DNA-nitron bileşiklerinin azalma göstermiş olduğu, ancak daha yüksek konsantrasyonlardaki sodyum selenitin DNA-nitron bileşiklerinin oluşumunu arttırdığı, tıpkı bir pro-oksidan gibi hareket ettiğini göstermiştir (Şekil 3.3).

Yapılan ELISA deneylerinde elde edilen sonuçlar referans alınarak metabolik sendromun proteinlerdeki nitron oluşumu aydınlatılmaya çalışılmıştır. Metabolik sendrom etiyopatogenezi tam olarak bilinmeyen diyabet ve kardiyovasküler sistem hastalıklar için risk oluşturan faktörler topluluğudur. Metabolik sendrom, insülin direnci ile başlayan abdominal obezite, glikoz intoleransı veya diabettes mellitus, hiperglisemi, koroner arter hastalığı gibi sistemik bozuklukların birbirine eklendiği ölümcül bir zinciri temsil etmektedir. Metabolik sendrom üzerinde yapılan deneylerin genel olarak amacı bahsedilen patolojik olaylar zincirinde temel sorun

üzerinde tespit ve tedavi yöntemleri için olanak sağlamaktır. Dolayısı ile elde edilen sonuçlar metabolik sendromdan yola çıkılarak, kardiyovasküler hastalıklar, hiperglisemi ve diabetes mellitus gibi çağımızın yaygın hastalıklarında oksidatif stresin etkisi için ışık tutmamızı sağlayacak bilgiler elde etmemize yarayacaktır.

Bu amaçla metabolik sendromlu ve sağlıklı sıçan kalplerinden elde edilen proteinler üzerine DNA'dakine benzer şekilde uygulanan H_2O_2 bileşiği ile protein-nitron bileşik oluşumu gözlemlenmiş olmasına rağmen DNA-nitron bileşiklerini gözlemlerken elde edilmiş olan belirgin sonuçlar, protein-nitron bileşiklerini gözlemlerken yeterli olamamıştır. Bunun nedeni kardiyomiyositlerde elde edilmiş olan toplam protein üzerinde bu tekniğin kullanılmasının bu şartlar altında uygun ve güvenilir olamayacağını düşündürmüştür.

Buna karşın elde edilmiş olan sonuçlar, H_2O_2 konsantrasyonu artışında elde edilen protein-nitron bileşikleri her iki grup için artış göstermiş olmakla birlikte metabolik sendrom proteinlerinin H_2O_2 'in 200 μM konsantrasyonundan sağlıklı proteinlere göre çok daha fazla etkilendiği gösterilmiştir (Şekil 3.7). Bu durum, metabolik sendromun kardiyomiyosit proteinlerini serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerine karşı oksidatif strese daha yatkın hale getirdiğini düşündürmektedir. Bu da literatürde daha önceden gerçekleştirilmiş olan diyabet ile serbest radikaller (Pitkanen ve ark., 1992; Van Dam ve ark., 1995; Bukan ve ark., 2003) ve kalp fonksiyonları ile serbest radikaller (Bolli ve ark., 1989; Toyokuni, 1999, Lopes ve ark., 2012; Tullio ve ark., 2013) arasındaki ilişkiye yönelik deney sonuçlarını destekler niteliktedir.

Zn^{2+} , redoks inert bir iyon olmasına rağmen hücre içerisindeki redoks değişiminden çok çabuk etkilenebilmekte; hücre içerisinde bir şekilde oksidatif stresin artması Zn^{2+} 'nin bağlı bulunduğu proteinlerden ayrılması veya depolardan salınmasına neden olmaktadır. Ayrıca çinko iyonunun insülinin önemli bir parçası olduğu bilinen bir gerçektir. Hücre içi Ca^{2+} ve Zn^{2+} mekanizmalarının diyabetik kardiyomiyopatiye bozulmuş olduğu literatürde bulunan en önemli bulgulardandır (Ayaz ve ark., 2004; Ayaz ve Turan, 2006). Bununla birlikte artan oksidatif stres ve buna bağlı hücre hasarda Zn^{2+} eksikliğinin katkısı; Zn^{2+} 'nin Fe^{3+} ve Cu^{2+} gibi

redoks aktif metallerin membranlara ve intraselüler alanlara bağlanmasını inhibe etme yeteneğine sahip olması gibi, biyokimyasal olaylar Zn^{2+} antioksidan özelliklerinin bulunduğunu kanıtlar niteliktedir. Buna karşın bazı polimorfizmlerde Zn^{2+} , bulunduğu yerde çok fazla miktarda ise temel olarak bakır eksikliğinden ötürü toksik etki göstermektedir, sonuçta kolesterol ve lipoprotein dağılımı, sitokrom oksidaz C, immünolojik parametrelerde değişimler meydana getirebilmektedir.

Kardiyomiyositlerde yapılan iskemi-reperfüzyon çalışmalarına dayanarak yapılan çalışmalar sonucunda mitokondrinin fonksiyonunu kaybetmesi ve ROS tarafından hasara uğratılması sonucu antioksidan savunmanın tükenmiş olduğu söylenmiştir (Aon, ve Cortassa, S., 2010; Tuncay ve ark., 2010) bu nedenle kardiyomiyositler üzerindeki oksidatif kaynaklı hasarın ve çinko elementinin antioksidan kabiliyetinin işlev mekanizmasının araştırılması gerekmektedir. Ayrıca bir başka çalışma sonuçlarına göre (Tuncay ve ark. ,2010), kısa süreli okside edici koşullarda Ca^{2+} indüklü Zn^{2+} uygulanmasının da kardiyomiyositler üzerinde antioksidan etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Deneysel metabolik sendrom ve sağlıklı kalp proteinlerinde oluşturulan protein-nitron bileşikleri çinkonun farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılmış ve elde edilen verilere göre çinkonun 100 μM konsantrasyonunun oluşan protein-nitron bileşiklerinin vermiş olduğu lüminesens sinyalinin diğer konsantrasyonlara karşın azalmış olduğu görülmüştür. Kontrol ve metabolik sendrom kalp proteinlerinde her iki grup için H_2O_2 'nin oksidan etkisi benzer sonuçlar doğurmuşsa da ortama eklenen 100 μM çinko fosfat sinyalin düşmesine, yani bir diğer deyimle antioksidan etkiye neden olmuştur (Şekil 3.8). Çinkonun konsantrasyonu arttırıldığı zaman ise antioksidan etkinin giderek pro-oksidan etkiye dönüştüğü ve ortamdaki protein-nitron bileşiklerinin artış göstermesine bağlı olarak lüminesens değerlerinin de artış gösterdiği gösterilmiştir.

Turan ve ark. (2005)'te yapmış oldukları çalışmanın ışığında, izole sıçan kalpleri üzerinde oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarı sonrasında sodyum selenit uygulananın kardiyak perfomansı baskıladığı gösterilmiştir. Selenyumun iskemi-reperfüzyon bağımlı değişiklikler üzerindeki bu belirtilen yararlı etkisi, doz bağımlı

şekilde nanomolar konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. Bu amaçla sodyum selenitin 25-1000 nM aralığında değişen konsantrasyonları, perfüzyonu 10 dakika takiben kullanılmıştır. Elde edilen verilere göre de selenyumun kardiyak performansı üzerinde doza bağımlı iyileşme sağlamakta olduğu ve okside glutasyon, glutasyon oranında azalma sağladığı, ayrıca iskemi/reperfüzyona uğramış olan kalpte malondialdehit seviyesinde artışa sebep olduğu gösterilmiştir (Turan ve ark., 2005). Daha önce yapılmış olan çalışmalarda da iskemi-reperfüzyona uğratılmadan hemen önceki selenyum tedavisinin reperfüzyon sürecinde ventriküler kasılmanın düzenlenmesi (Poltronieri ve ark., 1992) ve miyokard enfarktüsü azalttığı (Tanguy, 2004) gösterilmiştir. Ayrıca iskemi-reperfüzyon aracılı kalp fonksiyonları değişimlerinin oksidatif stres ve intraselüler Ca^{2+} artışına bağlı olduğu rapor edilmiştir. Bu duruma istinaden kalbin iskemi-reperfüzyon hasarına karşı hem oksidatif stres hem de hücre içi Ca^{2+} artışına karşı selenyum sayesinde korunmakta olabileceği kanısına varılmıştır. Bu amaç ile in vitro ortamda kontrol, iskemi-reperfüzyon, selenyum uygulanmış (75 nM) deney grupları kullanılmıştır (Turan ve ark., 2005). Bu verilere dayanılarak kardiyak fonksiyonları üzerinde, iskemi-reperfüzyona uğramış olan kalpte selenyumun antioksidan özelliği görülmektedir denilebilir.

Benzer şekilde selenyumun protein-nitron bileşikleri üzerindeki etkisi kontrol edildiğinde 50 nM konsantrasyonda hem kontrol hem de metabolik sendromlu kalp proteinlerindeki sinyallerde azalma görülmüş, selenyum konsantrasyonu arttırıldıkça protein-nitron bileşiklerinin oluşumuna paralel olarak elde edilen lüminesens değerinde de artış olduğu DMPO sayesinde gösterilmiştir. Kontrol grubu için Na_2SeO_3 bulunmayan gruba göre istatistiksel hesaplamalar sonucunda gruplar arasında fark görülmemişken, buna karşın elde edilen veriler metabolik sendromda oluşan nitron oluşumunun selenyumun deneyde kullanılan tüm konsantrasyonları için (50, 100, 200 nM) kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklı olduğu gözlemlenmiştir. (Şekil 3.9). Bu duruma göre selenyumun 50 nM konsantrasyon için antioksidan karaktere sahip olması, metabolik sendrom proteinleri için, 50 nM konsantrasyonda ortamda Na_2SeO_3 bulunmayan örneğe göre

istatistiksel olarak fark gösterdiği verisinden yola çıkılarak, oksidatif strese karşı kullanılacak bir antioksidan olarak kullanılacağı gösterilmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Biyolojik sistemlerde canlılık işlevlerinin fonksiyonları belirli bir düzen içerisinde ilerlemektedir. Bu sistemler üzerinde meydana gelebilecek her hangi bir eksiklik veya hata özellikle nükleik asitler üzerinde oluşmuş ise, sentezlenecek olan proteinler ve buradan da sistemin işlevi için önemli olan biyokimyasal olayların gidişatında ve oluşacak ürünlerde hatalar meydana gelmesine sebep olacaktır. Bu nedenle bu çalışmada gerçekleştirilmiş olan deneylerin temeli DNA ve proteinlerdeki oksidatif hasarlar üzerine dayanmaktadır. Hücre seviyesinde artan radikal oluşumu ve oksidatif strese dayalı hasarları tamir etmek amacıyla hücreler antioksidan maddeler sayesinde kendi savunma sistemlerine sahip olsalar da bu sistemin dışarıdan çeşitli eser elementler ile desteklenmesine ihtiyaç duyulmak gerekebilir. Bahsedilen eser elementler içerisinde çinko ve selenyum önem teşkil etmektedir. Çinko ve selenyumun pro-oksidan ve antioksidan özellikleri literatürde *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir. Redoks biyokimyasının tarihi göz önünde bulundurulduğunda biyolojik sistemlerde çok hızlı reaksiyonlar ile oluşan serbest radikallerin varlığı, son ürün analizleri ile yeni antioksidan enzimlerin, çeşitli eser elementlerin etkilerinin incelenmesi amacıyla elektron spin rezonans (ESR, EPR) tekniğinin kullanımının yaygın olduğu görülebilir. ESR tekniği kullanılarak çok sayıda ve farklı alanda yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, protein veya DNA düzeyinde oluşan serbest radikal metabolitleri gözlemlenmiştir. Daha sonraki gelişmeler ile, biyolojik sistemlerdeki kısa ömürlü radikal metabolitleri için bu tekniklerin yeterli olmadığı gösterilerek, çeşitli çalışmalar ile doğrulanan yeni bir teknik geliştirilmiştir.

İmmüno-spin-yakalama tekniği denen bu yeni teknikte daha kararlı bir serbest radikal oluşturabilmek için bir serbest radikalın bir diamagnetik spin çift bağına takmak için kullanılmaktadır. Bu sayede, ESR ile daha iyi inceleme yapılabilmiş ve ESR serbest radikal oluşumu biyolojik sistemlerde gözlemek açısından yeni ve etkili bir teknik olarak kabul görmüştür. Bu bilgilerin ışığından DMPO denen kimyasal madde vasıtasıyla ESR tekniğinin kombinasyonu sağlanarak biyolojik

DNA ve proteinlerdeki serbest radikaller bu çalışmada da tespit edilmeye çalışılmıştır. İmmüno-spin-yakalama tekniği sayesinde DNA üzerinde oluşturulan DNA-nitron bileşiklerinin tespiti ve hidrojen peroksit konsantrasyonuna bağımlı olarak sinyal değişimi tespit edilmiş, ardından Zn^{2+} ve SeO_3^{-2} gibi iyonların farklı konsantrasyonlarının DNA-nitron bileşiklerinin oluşumundaki rolleri ELISA ile gösterilmiştir.

DNA-nitron bileşikleri ile yapılan deney sonuçlarının ışığında, metabolik sendromlu ve normal kalp dokusu proteinlerinde oluşturulan protein-nitron bileşikleri üzerindeki hidrojen peroksit etkisi çalışılmıştır. Yapılan çalışmada kalp dokusundan izole edilmiş olan total proteinler üzerindeki oluşan protein-nitron bileşikleri tespit edilmeye ve karşılaştırılmaya çalışılmıştır. Ayrıca, metabolik sendrom ve normal kalp dokusu proteinlerinden oluşturulan protein-nitron bileşikleri üzerindeki çinko ve selenyum elementlerinin pro-oksidan ve antioksidan etki gösterdikleri konsantrasyon değerleri immüno-spin yakalama tekniği sonrası Western blotlama yöntemi ile gösterilmeye çalışılmıştır. Elde edilen veriler metabolik sendromlu kalp dokusundan elde edilen proteinlerdeki nitron oluşumunun, normal kalp dokusundan elde edilen proteinlerde meydana gelen nitron bileşiklerine oranla daha fazla olduğunu göstermiş olsa da bu tekniğin toplam proteinler üzerinde yapılan protein-nitron bileşiklerini tespit edebilme etkinliği açısından çok uygun bir teknik olmadığını görmemize olanak sağlamıştır.

Yapılan çalışmaların literatür verilerini desteklemiş olması immüno-spin-yakalama tekniğinin hücre veya canlı hayvan içerisinde oluşan protein ve DNA radikallerinin fonksiyonlarını ve oluşum yerlerinin tespit edilebileceği tek yöntemdir. İmmüno-spin yakalama tekniğinin protein ve DNA merkezli radikallerin tespitinde ESR ve ESR-spin yakalama teknikleri ile karşılaştırıldığında i) bu teknoloji klinik veya akademik laboratuvar çalışmalardaki herhangi bir araştırmada ESR için gerekli olan karmaşık ekipmanlara veya fiziki kimya ve kuantum mekanik uzmanına gereksinim duymaması, ii) yeni sistemleri keşfetmek için genellikle kritik olan gerekli numunenin küçük miktarlarda (mikrogram) kullanımının yeterli olması, iii) en önemlisi de biyomolekül merkezli radikallerin bir çok sistem içerisinde

(biyokimyasal, hücre, doku ve tüm hayvan) tespitinin, karakterizasyonunun, tanımlanması ve yerleşiminin mümkün olması gibi önemli avantajları bulunmaktadır.

Tüm bu bilgiler kapsamında yapılan ve bu kapsamda yapılması planlanan çalışmalar hücreler, dokular ve protein merkezli radikallerin oluşturduğu hastalıklar ve maruz kalma modelleri yapılabilecek ve bunlara karşın daha az toksik tedaviler üretilebilecektir. İmmüno-spin-yakalama yöntemi, hücre ve dokulardaki oksidatif stres patogenezi oluşturan serbest radikallerin belirlenmesi amacıyla karmaşık hücresel yanıt rollerini tanımlamaya belirleyici bir rol olarak kullanılabilir.

ÖZET

Çinko ve Selenyumun Antioksidan Özelliklerinin Oksidatif Stres İndüklü DNA Radikallerinin İmmün-spin-yakalama Yöntemi Kullanılarak İncelenmesi

Bir elektronunu kaybetmiş bir oksijen atomu içeren serbest radikaller, kararsız ve reaktif moleküller olarak, özellikle DNA ve proteinler etrafında bulunan elektronlara afinite göstermelerine neden olmakta, bu durum da DNA ve proteinler ile etkileşim sonrası fonksiyon bozukluğu, mutasyon ve hücre ölümlerine neden olabilmektedir. Serbest radikallerin biyomoleküller üzerinde göstermiş olduğu bu etkiye oksidatif stres adı verilir. Oksidatif stres canlılarda belirli bir seviyenin üstünde ise ve/veya antioksidan aktivitenin yetersiz kaldığı durumlarda çeşitli patolojik durumlar oluşturmaktadır. Serbest radikallerin yanında hücrelerde meydana gelen reaktif oksijen ürünleri (ROS) de DNA, protein, karbonhidrat ve lipidler gibi biyolojik açıdan öneme sahip moleküllere zarar verebilmektedir.

Diyabet ile ilgili yapılan çalışmalarda, diyabetli hastalarda ROS'lerinin peroksidasyonunun artmış olduğu ve oluşan oksidatif stresin diyabetin ilerlemesinde etkili olduğu gösterilmiştir. Redoks biyokimyasında çeşitli modifikasyonların belirlenebilmesi ve sonrasında radikallerin nerede oluşup lokalize olduğunun tespit edilmesi gerekmektedir. Elektron spin rezonans (ESR) biyolojik radikallerin geniş bir bölümünün tespit edilmesi aşamasındaki *in vitro* çalışmalarda kullanılmasına karşın, DNA ve protein radikallerinin hücre içerisinde tespit edilmesi aşamasında yeterli olamamış ve bu nedenle immüno-spin-yakalama adını verdikleri yeni bir teknik geliştirilerek, DNA ve protein merkezli radikallerin yüksek verimlilik ile tespit edilebilmesini sağlamıştır.

Bu çalışmada immüno-spin yakalama tekniği kullanılarak, DNA ve protein düzeyinde serbest radikal oluşumunun tespiti amaçlanmıştır. Ayrıca immüno-spin-yakalama tekniği kullanılarak *in vitro* koşullarda DNA üzerinde, selenyum ve

çinkonun pro-oksidan/antioksidan etki gösterdiği konsantrasyonları belirlenmeye çalışılmıştır. Ek olarak normal ve metabolik sendromlu sıçan kardiyomiyositlerinden izole edilen proteinlerde bu teknik kullanılarak oluşan protein radikallerinin oluşum seviyeleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca, yine protein-oksidan etkileşmesinde çinko ve selenyum elementlerinin hangi konsantrasyonda oksidan ve angi konsantrasyonda pro-oksidan etki gösterdikleri Western-blot tekniği ile de doğrulanmıştır. Böylece, bu çalışma sonuçları, bu tekniğin DNA ve protein gibi moleküllerle serbest radikal etkileşimleri oldukça yetkin bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: Anti-DMPO, antioksidan, bakır katalizli reaksiyon, çinko, DMPO (5,5-Dimetil-1-pirolin-N-oksit), DNA-nitron bileşiği, hidrojen peroksit, , immüno-spin yakalama, oksidatif stres, protein-nitron bileşiği, selenyum, serbest radikaller.

SUMMARY

Investigation of antioxidant properties of zinc and selenium on oxidative stress-induced DNA radicals by immuno-spin-trapping technique

Free radicals are non-stable and reactive molecules that contain an oxygen molecule, occurring through initial abstraction of an electron, in particular, having affinity for the electrons around DNA and proteins. Due to the fact that free radicals that interact with DNA and proteins have been implicated in cellular dysfunction, mutation, cell death and cancer diseases. These effects on biomolecules via free radicals are called oxidative stress. Oxidative stress consists of various pathological conditions when it rises above certain level in cells and/or antioxidants level is insufficient. At the same time, reactive oxygen species (ROS) that occur in the cells can damage the important biological molecules like DNA, protein, carbohydrates and lipids. In studies related to diabetes it has been shown that, the reactive oxygen species have increased together with the oxidative stress effects in the progression of diabetes.

Understanding the role redox biochemistry has in health and disease, requires the identification of a biomolecule that targets such modifications, specific residue where the radical was first generated and their localization in the whole animal. Electron spin resonance (ESR) technique has been used in *in vitro* studies of a wide range of biological radicals but lacks the sensitivity to detect DNA and protein radicals in intact cells. Therefore, a new technique, immuno-spin-trapping, has been developed. It is a very useful technique to detect DNA and protein centered radicals with high efficiency.

In this study, we aimed to detect DNA and protein centered radicals by using immuno-spin-trapping technique. Moreover, by using immuno-spin-trapping

technique as *in vitro*, we aimed to determine selenium and zinc's pro-oxidant and antioxidant effects on DNA. In addition, this technique has been used to compare levels of protein centered radicals on isolated proteins in cardiomyocytes from normal and metabolic syndrome rats. Moreover, it is also confirmed by Western-blotting technique that zinc and selenium have a pro-oxidant as well as antioxidant effects on the interaction between protein and oxidant depending on their concentrations. Thus, our results showed that this technique can be used in a highly competent manner on the interactions between free radicals and molecules like DNA and protein.

Key words: Anti-DMPO, antioxidant, copper catalyzed reaction, DMPO (5,5-Dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide), DNA-nitron radicals, free radicals, hydrogen peroxide, immuno-spin trapping, oxidative stress, protein-nitron radicals, selenium, zinc.

KAYNAKLAR

AIMO, L., CHERR, G.N., OTEIZA, P.I., (2010), Low extracellular zinc increases neuronal oxidant production through nadph oxidase and nitric oxide synthase activation. *Free Radic Biol Med* **48**:1577–1587.

ANZAI K., AIKAWA T., FURUKAWA Y., MATSUSHIMA Y., URANO S, OZAWA T. (2003). ESR measurement of rapid penetration of DMPO and DEPMPO spin traps through lipid bilayer membranes. *Archives of biochemistry and biophysics* **415**:251-256.

AKKUŞ İ., (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, 1.Baskı, Mimoza Yayınları

ALTAN, N., ONGUN, C.Ö., HASANOĞLU, E., ENGİN, A., TUNCER, C., SİNDEL, P., (1994a) Effects of the Sulfonylurea Glyburide on Superoxide Dismutase Activity In Alloxan-Induced Diabetic Rat Hepatocytes, *Diabetes Research and Clinical Practice*, **22(2-3)**, 95-98.

ALTAN, N., ONGUN, C.Ö., ELMALI, E., KILIÇ, N., YAVUZ, Ö., SANCAK, B., (1994b), Effects of the Sulfonylurea Glyburide on Glutathione and Glutathione peroxidase activity in Alloxan Induced Diabetic Rat Hepatocytes, *General Pharmacology*, **25(5)**, 875-87.

ALTAN N, SEPİCİ DİNÇEL A., KOCA C., (2006). Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres, *Türk Biyokimya Dergisi* **31(2)**;51-56

AON, M.A., CORTASSA, S., O'ROURKE, B., (2010), Redox-optimized ROS balance: a unifying hypothesis, *Biochim Biophys Acta*, **1797**: 865-877.

ARAL, H., TÜRKMEN, S., (2002), Oksidatif stres ve hastalıklarla ilişkisi, *Folia*, 2002;4:1-5.

ARICIOĞLU, A., (1994), Serbest oksijen radikalleri ve hücre hasarı. *Doktor*. 2/3 Mayıs: 238-242

AUGUSTO O, MUNTZ VAZ S. (2007). EPR spin-trapping of protein radicals to investigate biological oxidative mechanisms. *Amino acids* **32**:535-542.

AYAZ M., CAN B., OZDEMİR S., TURAN B.,(2002), Protective effect of selenium treatment on diabetes-induced myocardial structural alterations. *Biological Trace Element Research*, **89(3)**: 215-226

BARKAT, L., BOUMENDJEL, A., ABDENNOUR, C., EL FEKİ, A., MESSARAH, M., (2014), Methidathion-induced hematological, biochemical and histopathological

alterations in rat: Ameliorative effects of selenium and zinc, Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University

BATTELL, M.L., DELGATTY, H.L., McNEILL, J.H., (1998), Sodium selenate corrects glucose tolerance and hearth function in STZ diabetic rats, *Mol Cell Biochem*, **179**: 27-34.

BAYNES, J.W., THORPE, S.R., (1999), Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm. *Diabetes* **48(1)**, 1-9

BENJAMIN, I.J., SCHNEIDER, M.D., (2005), Learning from failure: congestive heart failure in the postgenomic age. *J Clin Invest* 2005;**115**:495-9.

BERG, E.A., Wu, J.Y., CAMPBELL, L., KAGEY, M., STAPLETON, S.R., (1995), Insulin like effects of vanadate and selenate on the expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase and fatty acid synthase in diabetic rats, *Biochimie*, **77**: 919-924.

BERGER MM. (2005). Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clinical nutrition* **24**:172-183.

BERK M, NG F, DEAN O, DODD S, BUSH AI. (2008). Glutathione: a novel treatment target in psychiatry. *Trends in pharmacological sciences* **29**:346-351.

BRAY, T.M., BETTGER, W.J., (1990), The physiological role of zinc as an antioxidant, *Free Radic. Biol. Med.* **8**: 281-291.

BOLLI, R., (1990), Mechanism of myocardial "stunning", *Circulation* 1990;**82**:723-38.

BOLLI, R., JEROUDI, M.O., PATEL, B.S., ARUOMA, O.I., HALLIWELL, B., LAI, E.K.B.*et al.* (1989). Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial "stunning" is a manifestation of reperfusion injury. *Circ Res* **65**: 607-622.

BUKAN, N., SANCAK, B., YAVUZ, Ö., KOCA, C., TUTKUN, F., ÖZÇELİKAY, T.A., ALTAN, N., (2003), Lipid peroxidation and scavenging enzyme levels in the liver of streptozotocin-induced diabetes rats. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, **40(6)**, 447-450.

CADENAS E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual review of biochemistry* **58**:79-110.

CADET J, DOUKI T, GASPARUTTO D, RAVANAT JL. (2003). Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutation research* **531**:5-23.

CARTER, J.E., TRUONG-TRAN. A.Q., GROSSER. D., HO, L., RUFFIN, R.E., ZALEWSKI, P.D., (2002), Involvement of redox events in caspase activation in zincdepleted airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **297**:1062–1070.

CHEN, Y.C., SANDEEP PRABHU, K., MASTRO, A.M., (2013), Is selenium a potential treatment for cancer metastasis?, Review, *Nutrients*, **5**, 1149-1168

- CHEUNG J, LEAF A, BONVENTRE J. (1986): Mitochondrial function and intracellular calcium in anoxic myocytes. *Am J. Physiol.* **250**: C15-C18.
- CHUNG M. J., HOGSTRAND C., LEE S. J. (2006): Cytotoxicity of nitric oxide is alleviated by zinc-mediated expression of antioxidant genes. *Exp Biol Med (Maywood)*. **231(9)**:1555-63.
- CLEMENT, I.P., (1998), Lessons from basic research in selenium and cancer prevention, *J.Nutr.*, Nov.1, **vol128**, no.11, 1845-1854.
- COMB, G., (2001), Impact of selenium and cancer prevention findings on the nutrition-health paradigm, *Nutr.Cancer*, **40**: 6-11.
- COMPORTI M. (1993). Lipid peroxidation. Biopathological significance. *Molecular aspects of medicine* **14**:199-207.
- COUSINS, R.J., BLANCHARD, R.K., MOORE, J.B., CUI, L., GREEN, C.L., LUIZZI, J.P., CAO, J., BOBO, J.A., (2003), Regulation of zinc metabolism and genomic outcomes, *J. Nutr.* **133** : 1521S–1526S.
- CUI ,L., TAKAGI ,Y., WASA, M., SANDO, K., KHAN, J., OKADA, A., (1999), Nitric oxide synthase inhibitor attenuates intestinal damage induced by zinc deficiency in rats. *J Nutr* **129**:792–798.
- DALLE-DONNE, I., ALDINI, G., CARINI, M., COLOMBO, R., ROSSI, R., MILZANI, A., (2006) Protein carbonylation, cellular dysfunction and disease progression. *J Cell Mol Med* **2**:389-406, 2006.10
- DAVIES MJ. (2004). Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. Photochemical & photobiological sciences : *Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **3**:17-25.
- DAVIES MJ, GILBERT BC, HAYWOOD RM. (1991). Radical-induced damage to proteins: e.s.r. spin-trapping studies. *Free radical research communications* **15**:111-127.
- DAVIES MJ, HAWKINS CL. (2004). EPR spin trapping of protein radicals. *Free radical biology & medicine* **36**:1072-1086.
- DAVIES MJ, SLATER TF. (1988). The use of electron-spin-resonance techniques to detect free-radical formation and tissue damage. *The Proceedings of the Nutrition Society* **47**:397-405.
- DEMİRBAG, R., YİLMAZ, R., GUR, M., CELİK, H., GUZEL, S., SELEK, S., et al., (2006), DNA damage in metabolic syndrome and its association with antioxidative and oxidative measurements. *Int J Clin Pract*, **60**:1187-93, 2006. 11
- DEMİRCAN, N., GUREL, A., ARMUCTU, F., UNALACAK, M., AKTUNC, A, ATMACA, H., (2008), The evaluation of serum cystatin C, malonildialdehyde and total antioxidant status in patients with metabolic syndrome. *Med Sci Monit*, **14**:97-101.

DE MARTINIS, BS., DE LOURDES PIRES BIANCHI, M., (2002), Methodology for urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine analysis by hplc with electrochemical detection. *Pharmacol Res*, **46(2)** :129-131.

DETWEILER CD, DETERDING LJ, TOMER KB, CHIGNELL CF, GERMOLEC D, MASON RP. (2002). Immunological identification of the heart myoglobin radical formed by hydrogen peroxide. *Free radical biology & medicine* **33**:364-369.

DIZDAROGLU M. (1998). Facts about the artifacts in the measurement of oxidative DNA base damage by gas chromatography-mass spectrometry. *Free radical research* **29**:551-563.

DIZDAROGLU M, JARUGA P, BIRINCIÖGLU M, RODRIGUEZ H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free radical biology & medicine* **32**:1102-1115.

DONALD, M.Y., GROSS, D.J., CESARI, E., KAISER, N., (1999), Hyperglycemia-induced β cell apoptosis in pancreatic islets of Psammoy's obese during development of diabetes, *Diabetes*, **48(4)**, 738-744.

DRAPER HH. (1990). Nutritional modulation of oxygen radical pathology. *Advances in nutritional research* **8**:119-145.

DRAPER HH. (1990). Nutritional modulation of oxygen radical pathology. In *Advances in nutritional research* **Vol.8**. Edited by, Drapper, H.H. *Plenum Press*, New York, :119-145.

DREOSTI, I.E., (2001), Zinc and gene, *Mutat. Res.*, **475** : 161-167.

DURACKOVA Z., (1998), Free radicals and antioxidants in medicine (I) (In Slovak), SAP, Bratislava

DURACKOVA Z. (1998). [Toxicologic importance of iron and copper atoms and their relation to reactive oxygen metabolites]. *Bratislavske lekarske listy* **99**:351-358.

DURACKOVA Z., (2008), Oxidants, antioxidants and oxidative stress. In: Gvozdjakova, A. (ed) Mitochondrial medicine. Mitochondrial metabolism, diseases, diagnosis and therapy. *Springer, Amsterdam*. doi:**10.1007/978-1-4020-6714-3**

ERENEL, G., ERBAŞ, D., ARICIOĞLU, A., (1992), Serbest radikaller ve antioksidan sistemler, *Gazi Tıp Dergisi*, **3**, 243-250.

ESTERBAUER H, SCHAUR RJ, ZOLLNER H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxydesoxyononanal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology & medicine* **11**:81-128.

EVANS MD, DIZDAROGLU M, COOKE MS. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation research-Rev.Mutat.Res.* **567**:1-61.

FALCHUK, K.H., (1998), The molecular basis for the role of zinc in developmental biology, *Mol. Cell. Biochem.* **188** : 41–48.

FERDINANDY, P., SCHULZ, R., (2003), Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *Br J Pharmacol* **138**: 532-543.

FERRARI, R., (1991), Oxygen free radicals and myocardial damage: Protective role of thiol-containing agents, *Am. J of Med.*, **91(3C)**: 95S-105S.

FLOHE, L., BRIGELIUS-FLOHE, R., (2012), Selenoproteins of the glutathione peroxidase family, “Selenium, Its Molecular Biology and Role in Human Health”, 3rd Edition, Chapter 13.

FLOYD RA, KOPKE RD, CHOI CH, FOSTER SB, DOBLAS S, TOWNER RA. (2008). Nitrones as therapeutics. *Free radical biology & medicine* **45**:1361-1374.

FRAZZINI V., ROCKABRAND E., MOCHEGANI E., SENSI S. L. (2006): Oxidative stress and brain aging: is zinc the link? *Biogerontology*. **7(5-6)**:307-14.

FREDERICKSON C. J., KOH J. Y., BUSH A. I. (2005): Is zinc the link between compromises of brain perfusion (excitotoxicity) and Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis.* **8(2)**:155-60.

FRUSTACI A., SABBIONI E., FORTANER S., FARINA M., DEL TORCHIO R., TAFANI M., MORGANTE E., CIRIOLO M.R., RUSSO M.A., CHIMENTI C. (2012): Selenium- and zinc-deficient cardiomyopathy in human intestinal malabsorption: preliminary results of selenium/zinc infusion. *Eur J Heart Fail.* **14(2)**:202-10.

FORD, E.S., MOKDAD, A.H., GILES, W.H., BROWN, D.W., (2003), The metabolic syndrome and antioxidant concentrations. *Diabetes*, **52**: 2346-52.

GIORDANO, F.J., (2005), Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest*, 2005;**115**:500-8

GOMEZ-MEJIBA SE, ZHAI Z, AKRAM H, DETERDING LJ, HENSLEY K, SMITH N, TOWNER RA, TOMER KB, MASON RP, RAMIREZ DC. (2009). Immuno-spin trapping of protein and DNA radicals: "tagging" free radicals to locate and understand the redox process. *Free radical biology & medicine* **46**:853-865.

GÖKALP, O., GÜLLE, K., SULAK, O., ÇİÇEK, E., ALTUNTAŞ, İ., (2003), The effects of methidathion on liver: role of vitamins E and C., *Toxicol Ind Health*, **19**: 63-67.

GRASLUND A, SAHLIN M, SJOBERG BM. (1985). The tyrosyl free radical in ribonucleotide reductase. *Environmental health perspectives* **64**:139-149.

GRIENGLING, K.K., SORESCU, D., USHIO-FUKAI, M., (2000), NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* **86**:494-501.

GUO Q, GAO G, QIAN SY, MASON RP. (2004). Novel identification of a sulfur-centered, radical-derived 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide nitron adduct formed from the oxidation of DTT by LC/ELISA, LC/electrospray ionization-MS, and LC/tandem MS. *Chemical research in toxicology* **17**:1481-1490.

GUTTERIDGE JM. (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-biological interactions* **91**:133-140.

HALL DB, HOLMLIN RE, BARTON JK. (1996). Oxidative DNA damage through long-range electron transfer. *Nature* **382**:731-735.

HALLIWELL, B., CHIRICO, S., (1993), Lipid peroxidation; its mechanism, measurement and significance, *Am J Clin Nut.*, 57 (Suppl): 715S-25S

HALLIWELL, B., (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* **344**:721-724.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC., (1999), *Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd Ed., Oxford University Press.*

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC., (2001), *Free Radicals in Biology and Medicine, Third Edition, Oxford Science Publications, 22-24.*

HALLIWELL B, WHITEMAN M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British journal of pharmacology* **142**:231-255.

HANNA, P.M., MASON, R.P., (1992), *Arch. Biochem. Biophys.* ,**295**, 205-213

HANNA, P.M., CHAMULITRAT, W., MASON, R.P., *Arch. Biochem. Biophys.*, **296**, 640-644

HARRISON, D., GRIENDLING, K.K., LANDMESSER, U., HORNIG, B.(2003), , Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2003;**91(3A)**:7A-11A.

HAWKINS CL, DAVIES MJ. (2001). Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1504**:196-219.

HAWKINS CL, MORGAN PE, DAVIES MJ. (2009). Quantification of protein modification by oxidants. *Free radical biology & medicine* **46**:965-988.

HEINECKE, J.W., (2003), Oxidative stress: new approaches to diagnosis and prognosis in atherosclerosis. *Am J Cardiol* , **91(3A)**:12A-16A.

HILL, M.F., SIGNAL, P.K., (1996), Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Am J Pathol*, **148** : 291-300.

HO, E., (2004), Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk, *J. Nutr. Biochem*, **15** : 572-578.

HOFFMAN, J.W, JR, GILBERT, T.B., POSTON, R.S. & SILLDORFF, E.P., (2004), Myocardial reperfusion injury: etiology, mechanisms, and therapies. *J Extra Corpor Technol* **36**: 391-411.

HOUSLAY, M.D., (1991), 'Crosstalks': a pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways. *European Journal of Biochemistry*, **195(1)**, 9-27.

HOUSTON, M., ESTEVEZ, A., CHUMLEY, P., ASLAN, M., MARKLUND, S., PARKS, D.A., *et al.* (1999), Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. Kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling. *J Biol Chem* **274**:4985-94.

IHARA, Y., TOYOKUNI, S., UCHIDA, K., ODAKA, H., TANAKA, T., IKEDA, H., HIANI, H., SEINO, Y., YAMADA, Y., (1999), Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic β cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes*, **48(4)**, 927-932.

JANZEN EG. (1984). Spin trapping. *Methods in enzymology* 105:188-198.

JANZEN EG, JANDRISITS LT, SHETTY RV, HAIRE DL, HILBORN JW. (1989). Synthesis and purification of 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide for biological applications. *Chemico-biological interactions* **70**:167-172.

JENKINS R. R. (1988): Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports medicine*, **5**: 156-170.

KANEKO, J.J., (1980): Clinical Biochemistry of Domestic Animals, Third Edition, Academic Press. Inc. (London) Ltd.

KASAI H., (2002), Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: formation, repair, and mutagenesis, *Free Rad. Biol. Med.* **33** (2002) 450-456

KAUL, N., SIVESKI-ILISKOVIC, N., HILL, M., SLEZAK, J., SINGAL, P., (1993), Free radicals and the heart. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 1993;**30**:55-67.

KOCA, N., KARADENİZ, F.,(2003), Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, Sayı **16**.

KRALJ, K.N., GORUP, M., (2004), Histochemical investigations of NADPH and NADH-Tetrazolium reductase activity in the liver of selenium and copper treated carp (*Ciprinus crprio L.*) , *Vetirinarski arhiv*, **74(5)**: 331:340.

KUBOW S, JANZEN EG, BRAY TM. (1984). Spin-trapping of free radicals formed during in vitro and in vivo metabolism of 3-methylindole. *The Journal of biological chemistry* **259**:4447-4451.

LEINISCH F, RANGUELOVA K, DEROSE EF, JIANG J, MASON RP. (2011). Evaluation of the Forrester-Hepburn mechanism as an artifact source in ESR spin-trapping. *Chemical research in toxicology* **24**:2217-2226.

LAHER, I., (ed.), (2014), Systems of Free Radicals and Antioxidants, Springer-Verlag Berlin Heiderberg

LIN C. L., TSENG H. C., CHEN R. F., CHEN W. P., SU M. J., FANG K. M., WU M. L., (2011): Intracellular zinc release-activated ERK-dependent GSK-3 β -p53 and Noxa-Mcl-1 signaling are both involved in cardiac ischemic-reperfusion injury. *Cell Death Differ.* **18(10)**:1651-63.

LOPES, RD., LI, L., GRANGER, C.B., WANG, T.Y., FOODY, J.M., FUNK, M. *et al.*, (2012). P. Atrial fibrillation and acute myocardial infarction: antithrombotic therapy and outcomes. *Am J Med* **125**: 897-905.

LUCCHESI, B.R., (1990), Modulation of leukocyte-mediated myocardial reperfusion injury. *Annu Rev Physiol*, **52**: 561-76.

LUFT, F.C., (2005), Somatic DNA oxidative damage and coronary disease. *J Mol Med*, **83**:241-3.

MEANEY, E., VELA, A., SAMANIEGO, V., MEANEY, A., ASBUN, J., ZEMPOALTECA, J.C., et al.(2008), Metformin, arterial function, intima-media thickness and nitroxidation in metabolic syndrome: the Mefisto Study. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **35**:895-903.

MAJIDI, M., KOSINSKI, S., AL-KHATIB, S.M., LEMMERT, M.E., SMOLDERS, L., VAN WEERT, A. *et al.* (2009). Reperfusion ventricular arrhythmia 'bursts' predict larger infarct size despite TIMI 3 flow restoration with primary angioplasty for anterior ST-elevation myocardial infarction. *Eur Heart J* **30**: 757-764

MARKLUND, S.L., (1984), Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase in human tissues and human cell lines, *J Clin Invest*, **74**: 1398-1403

MARKLUND SL. (1984). Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *The Biochemical journal* **222**:649-655.

MARNETT LJ. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation research Fund. Mol. Mech. Mutagen* **424**:83-95.

MARNETT LJ. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* **21**:361-370.

MASON, R.P., (2000), In vivo spin-trapping-from chemistry to toxicology. In: Rhodes, CJ., editor. Toxicology of the human environment. The critical role of free radicals. London: Taylor and Francis; 2000. P.49-70.

MCDORMAN KS, PACHKOWSKI BF, NAKAMURA J, WOLF DC, SWENBERG JA. (2005). Oxidative DNA damage from potassium bromate exposure in Long-Evans rats is not enhanced by a mixture of drinking water disinfection by-products. *Chemico-biological interactions* **152**:107-117.

MC NEILL, J.H., DELGATTY, H.L., BATTELL, M.L., (1991) Insulin like effects of sodium selenate in streptozocin-induced diabetic rats, *Diabetes*, **40**: 1675-1678.

MORRISON R. T., BOYD R. N . (1974): Organic chemistry, Allyn and Bacon, Boston: 727.

MURAKAMI M., HIRANO T. (2008): Intracellular zinc homeostasis and zinc signaling. *Cancer Sci.* **99(8)**:1515-22.

NAKATANI T, NAKASHIMA T, KITA T, HIROFUJI C, ITOH K, ITOH M, ISHIHARA A. (2000): Cell size and oxidative enzyme activity of different types of fibers in different regions of the rat plantaris and tibialis anterior muscles. *Jpn J Physiol.* **50(4)**:413-8

NASH KM, ROCKENBAUER A, VILLAMENA FA. (2012). Reactive nitrogen species reactivities with nitrones: theoretical and experimental studies. *Chemical research in toxicology* **25**:1581-1597.

NEDELJKOVIC, Z.S., GOKCE, N., LOSCALZO, J., (2003), Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction. *Postgrad Med J* 2003;**79**:195--200.

NILES, B.J., CLEGG, M.S., HANNA, L.A., CHOU, S.S., MOMMA, T.Y., HONG, H., KEEN, C.L., (2008), Zinc deficiency-induced iron accumulation, a consequence of alterations in iron regulatory protein-binding activity, iron transporters, and iron storage proteins. *J Biol Chem* **283**:5168–5177.

NOHL H., KOZLOV AV., GILLE L., STANEK K., (2005), The Handbook Environmental Chemistry, Vol 2, Part 0 : 19-31 DOI 10 1007/b101144

NORDBERG, J., ARNÉR, E.S., (2001), Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* ; **31(11)**: 1287-312.

NOWAK, G., (2000), Zinc neurotransmission and the mechanism of antidepressant action. In: Eds: Centeno JA and Collery P Metal ions in biology and medicine, *Eurotext*, Paris, pp 437-439.

OLIN, K.L., SHIGENAGA, M.K., AMES, B.N., GOLUB, M.S., GERSHWIN, M.E., HENDRICKX, A.G., KEEN, C.L., (1993), Maternal dietary zinc influences DNA strand break and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in infant rhesus monkey liver. *PSEBM* **203**:461–466.

OTEIZA, P.I., OLIN, K.L., FRAGA, C.G., KEEN, C.L., (1995), Zinc deficiency causes oxidative damage to proteins, lipids and DNA in rat testes. *J Nutr*, **125**:823–829.

ÖZDEMİR, G., 1993, Reaktif oksijen partikülleri (ROP) (Oksidan moleküller serbest radikaller), *Roche Bilimsel Eserler Serisi*.

PITKANEN, O.M., MARTIN, J.M., HALLMAN, M., AKERBLUM, H.K., SARIOLA, H., ANDERSSON, S.M., (1992) Free radical activity during development of insulin dependent diabetes mellitus in the rat. *Life Science* **50(5)**, 335-339.

PITTS, M.W., RAMAN, A.V., BERRY, M.J., (2012), Schizophrenia, oxidative stress and selenium, "Selenium; Its Molecular Biology and Role in Human Health, 3rd.Edition.Chapter 28.

POLTRONIERI, R., CEVESE, A., SBARBATI, A., (1992), Protective effect of selenium in cardiac ischemia and reperfusion, *Cardioscience*, **3**: 155-160.

PORTER, N.A., (1985), Mechanism of fatty acid and phospholipid autoxidation. In "Chemical Changes in Food During Processing", T. Richardson and J.W. Finley (Eds), pp:73-105. Van Nostrand Reinhold Company, New York.

POWELL, S.R., (2000), The antioxidant properties of zinc, *J. Nutr.*, **130**: 1447S-1454S.

RATHAUS, M., BERNHEIM, J., (2002), Oxygen species in the microvascular environment: regulation of vascular tone and the development of hypertension. *Nephrol Dial Transplant*, **17**: 216-21.

RAYMAN, M., (2002), The argument for increasing selenium intake, *Proc Nutr Soc.*, **61**: 203-15.

REILLY, M., DELANTY, N., LAWSON, J.A., FITZ, G.G., (1996), Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation*, **94**: 19-25.

PACKER L, CADENAS E, DAVIES KJ. (2008). Free radicals and exercise: an introduction. *Free radical biology & medicine* **44**:123-125.

RAMIREZ D.C., GOMEZ-MEJIBA, S.E., MASON, R.P., (2007). Immuno-spin trapping analyses of DNA radicals. *Nature protocols* **2**:512-522.

RAMIREZ D.C., MASON, R.P., (2005). Immuno-spin trapping: detection of protein-centered radicals. *Current protocols in toxicology* / editorial board, Mahin D Maines Chapter **17**:Unit 17 17.

RAMIREZ D.C., GOMEZ-MEJIBA, S.E., MASON, R.P., (2005), Copper-catalyzed protein oxidation and its modulation by carbon dioxide: enhancement of protein radicals in cells, *J. Biol. Chem.*, **280**: 27402-27411

RAMIREZ DC, CHEN YR, MASON RP. (2003). Immunochemical detection of hemoglobin-derived radicals formed by reaction with hydrogen peroxide: involvement of a protein-tyrosyl radical. *Free radical biology & medicine* **34**:830-839.

RAMIREZ DC, CHEN YR, CORBETT J, MASON RP, (2002), Detection of hemoglobin-tyrosyl-radical derived nitron adducts by immuno-spin trapping. A first application to in vivo toxicology, *Free Radic. Biol. Med.* **33** (2002) 434.

RANGUELOVA K, MASON RP. (2011). The fidelity of spin trapping with DMPO in biological systems. *Magnetic resonance in chemistry : MRC* **49**:152-158.

ROBERTSON, R.P., HARMON, J., TRAN, P.O., POITOUT, V., (2004), β -cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* **53**, (Sup.1), 119-124.

ROGERS, J.M., LONNERDAL, B., HURLEY, L.S., KEEN, C.L., (1987). Iron and zinc concentrations and ^{59}Fe retention in developing fetuses of zincdeficient rats. *J Nutr* **117**:1875–1882.

ROTRUCK, J.T., POPE, A.L., GANTHER, H.E., SWANSON, A.B., HAFEMAN, D.G., HOEKSTRA, W.G., (1973), Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase, *Science*, **179** (4073): 588-590.

SABUNCUOĞLU S., ÖZGÜNEŞ H., (2011), Kemoterapi, Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres, *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, Cilt 31/ Sayı 2/ pp.137-150*

SIMOONS, M.L., SERRUYS, P.W., VAN DEN BRAND, M., RES, J., VERHEUGT, F.W., KRAUSS, X.H. *et al.* (1986). Early thrombolysis in acute myocardial infarction: limitation of infarct size and improved survival. *J Am Coll Cardiol* **7**: 717-728.

SINGAL, P.K., BEAMISH, R.E., DHALLA, N.S., (1983), Potential oxidative pathways of catecholamines in the formation of lipid peroxides and genesis of heart disease. *Adv Exp MedBiol*1983;**161**:391-401.

SMITH CD, CARNEY JM, TATSUMO T, STADTMAN ER, FLOYD RA, MARKESBERY WR. (1992). Protein oxidation in aging brain. *Annals of the New York Academy of Sciences* **663**:110-119.

SONG, Y., CHUNG, C.S., BRUNO, R.S., TRABER, M.G., BROWN, K.H., KING, J.C., HO, E., (2009a), Dietary zinc restriction and repletion affects DNA integrity in healthy men. *Am J Clin Nutr* **90**:321–328.

SONG, Y., LEONARD, S.W., TRABER, M.G., HO, E., (2009b), Zinc deficiency affects DNA damage, oxidative stress, antioxidant defenses, and DNA repair in rats. *J Nutr* **139**:1626–1631.

STADTMAN ER., (1992), Protein oxidation and aging, *Science* **257** (1992) 1220-1224

STADTMAN ER. (1995). Role of oxidized amino acids in protein breakdown and stability. *Methods in enzymology* **258**:379-393.

STADTMAN ER. (2004). Role of oxidant species in aging. *Current medicinal chemistry* **11**:1105-1112.

STAINBERG, D., (1991), Antioxidants and atherosclerosis. A current Assessment. *Circulation*, **84** (3) (Sep): 1420-1425.

- SULAK, O., ALTUNTAŞ, İ., KARAHAN, N., YILDIRIM B, AKTÜRK, O., YILMAZ, H. R., DELİBAŞ, N., (2005), Nephrotoxicity in rats induced by organophosphate insecticide methidathion and ameliorating effects of vitamins E and C, *Pestic Biochem Physiol*, **83**: 21-28.
- SUN, Y.X., HU, S.J., ZHANG, X.H., SUN, J., ZHU, C.H., ZHANG, Z.J., (2006), Plasma levels of vWF and NO in patients with metabolic syndrome and their relationship with metabolic disorders. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, **35**:315-8.
- TANG, W.H., CHENG, W.T., KRATSOV, G.M., TONG, X.Y., HOU, X.Y., CHUNG, S.K., CHUNG, S.S., (2010), Cardiac contractile dysfunction during acute hyperglycemia due to impairment of SERCA by polyol pathway-mediated oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* **299**: C643-653.
- TANGUY, S., MOREL, S., BARTHONNECHE, C., TOUFEKTSIAN, M.C., DE LORGERIL, M., DUCROS, V., TOSAKI, A., DE LEIRIS, J., BOUCHER, F., (2004), Preischemic selenium status as a major determinant of myocardial infarct size in vivo in rats, *Antioxid Redox Signal*, **6**: 792-796.
- TOYOKUNI, S., (1999). Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int* **49**: 91-102.
- TULLIO, F., ANGOTTI, C., PERRELLI, M.G., PENNA, C. & PAGLIARO, P., (2013). Redox balance and cardioprotection. *Basic Res Cardiol* **108**: 392.
- TUNCAY, E., OKATAN, E.N., TOY, A., TURAN, B., (2013), Enhancement of cellular antioxidant-defence preserves diastolic dysfunction via regulation of both Zn²⁺ and Ca²⁺ and prevention of RyR2-leak in hyperglycemic cardiomyocytes, *Oxid Med Cell Longev*, **2014**; 290-381.
- TURAN, B., (2010), Role of antioxidants in redox regulation of diabetic cardiovascular complications,.
- TURAN, B., VASSORT, G., (2010), Cardioprotective roles of selenium in diabetes, *Cardiovasc Toxicol*. 2010 Jun; **10**(2):73-86.
- TURAN, B., SAINI, H.K., ZHANG, M., PRAJAPATI, D., ELIMBAN, V., DHALLA, N.S., (2005), Selenium Improves Cardiac Function by Attenuating the Activation of NF-κB Due to Ischemia–Reperfusion Injury, *Antioxidant and Redox Signalling*, **7**: 1388-1397.
- TURAN, B., (2003), Zinc-induced changes in ionic currents of cardiomyocytes. *Biol. Trace Element Res.* **94**(1); 49-60.
- TURAN B., FLİSS H., DESILETS M. (1997): Oxidant-Induced Alteration of Intracellular Free-Zn²⁺ Concentration in Rabbit Ventricular Myocytes, *Am. J. Physiology*, **272**, (*Heart Circ.Physiol.* **41**), H2095-H2106

TURAN, B., DESİLETS, M., AÇAN, L. N., HOTOMAROĞLU, Ö., VANNIER, C., VASSORT, G. , 1996.Oxidative Effects of Selenite on Rat Ventricular Contractility and Ca Movements, *Cardiovascular Research*, **32**, 351-361.

UGUR M., AYAZ M., OZDEMİR S., TURAN B., 2002; Toxic concentration of Selenite shortens repolarization phase of action potential in rat papillary muscle. *Biological Trace Element Research*, **89(3)**: 227-38.

URIU-ADAMS, J.Y., KEEN, C.L., (2010), Zinc and reproduction: Effects of zinc deficiency on prenatal and early postnatal development, Review article, *Birth Defects Research (Part B)* **89**:313–325 (2010)

VALKO M, RHODES CJ, MONCOL J, IZAKOVIC M, MAZUR M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions* 160:1-40.

VAN GELDER, M.M., VAN ROOIJ, I.A., MILLER, R.K., ZIELHUIS, G.A., DE JONG-VAN DEN BERG, L.T., ROELEVELD, N., (2010), Teratogenic mechanisms of medical drugs. *Hum Reprod Update* **16**:378–394.

VAN BLADEREN, P.J., (2000), Glutathione conjugation as a bioactivation reaction, *Chem Biol Interact*, **129(1-2)**: 61-76.

VAN DAM, P.S., VAN ASBECK, B.S., ERKELENS, D.W., MARX, J.J., GISPEN, W.H., BRAVENBOER, B., (1995), The role of oxidative stress in neuropathy and other diabetic complications. *Diabetes Metabolism Reviews*, **11(3)**, 181-192.

VIGUE, A.C., FREI, B., SHIGENAGA, M.K., AMES, B.N., PACKER, L., BROOKS, G.A., (1993), Antioxidant status and oxidative stress during consecutive days of exercise. *Am. Physiological Society*, **93**- 566-572.

VILLAMENA FA, DAS A, NASH KM. (2012). Potential implication of the chemical properties and bioactivity of nitrene spin traps for therapeutics. *Future medicinal chemistry* 4:1171-1207.

WASSMANN, S., WASSMANN, K., NICKENIG, G.,(2004), Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* ,**44(4)**: 381-6.

WEISS, J.N., GOLDHABER, J.I., SEN, J.,(1993), Oxygen free radicals in the pathophysiology of myocardial ischemia/reperfusion, . In: Tarr M, Samson F, editors. Oxygen free radicals in tissue damage. *Boston: Brinkhauser*; 1993. p. 250-66

WELLS, P.G., MCCALLUM, G.P., CHEN, C.S., HENDERSON, J.T., LEE, C.J., PERSTIN, J., PRESTON, T.J., WILEY, M.J., WONG, A.W., (2009), Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. *Toxicol Sci* **108**:4–18.

WEST, N., GUZIK, T., BLACK, E., CHANNON, K., (2001), Enhanced superoxide production in experimental venous bypass graft intimal hyperplasia: role of NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* ,**21**:189-94.

WILDBURGER R., MRAKOVČIĆ L., STROSER M., ANDRIŠIĆ L., BOROVIC SUNJIC S., ZARKOVIĆ KČ, ZARKOVIĆ N., (2009), Lipid peroxidation and age-associated diseases-cause or consequence? : Review Citation

WILLIAMS RJ, SPENCER JP, RICE-EVANS C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free radical biology & medicine* **36**:838-849.

WILLS, E.D., (1987): Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. In: *Biochemical Toxicology*. Edited by, Snell, K. and Mullock, B., *IRL Press Limited*, Oxford England, 127-152

XIE, H., HOLMES, A.L., YOUNG, J.L., QIN, Q., JOYCE, K., PELSUE, S.C., PENG, C., WISE, S.S., JEEVARAJAN, A.S., WALLACE, W.T., HAMMOND, D., WISE Sr., J.P., (2009), Zinc chromate induces chromosome instability and DNA double strand breaks in human lung cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **234** : 293–299.

YAMASAKI S, SAKATA-SOGAWA K, HASEGAWA A, SUZUKI T, KABU K, SATO E, KUROSAKI T, YAMASHITA S, TOKUNAGA M, NISHIDA K, HIRANO T. (2007): Zinc is a novel intracellular second messenger. *J Cell Biol.* **177(4)**:637-45.

YERER, B., AYGOĞAN, S., (2000), Oksidatif stres ve antioksidanlar, *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, **9(1)** 49-53.

YI, T., CHEEMA, Y., TREMBLE, S.M., BELL, S.P., CHEN, Z., SUBMARANIAN, M., LEWINTER, M.M., VANBUREN, P., PALMER, B.M., (2012), Zinc-induced cardiomyocyte relaxation in a rat heart model of hyperglycemia is independent of myosin isoform, *Cardiovascular Diabetology*, **11**:135.

TING, Y., VICK, J.S., VECCHIO, M.J.H., BEGIN, K.J., BELL, S.P., DELAY, R.J., PALMER, B.M., (2013), Identifying cellular mechanisms of zinc-induced relaxation in isolated cardiomyocytes, *Am J Physiol Circ Physiol.*, **5**: 305.

TUNCAY, E., BILGINOĞLU, A., SÖZMEN, N.N., ZEYDANLI, E.N., UĞUR, M., VASSORT, G., TURAN, B., (2010), Intracellular free zinc during excitation-contraction cycle: calcium and redox dependencies, *Cardiovascular Res.*, **89**, 634-642.

YOKUS, B., ÇAKIR, DÜ., (2002), In vivo oksidatif DNA hasarı biyomarkeri; 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *T Kim J Med Sci*, **22**, 535-543.

YOUNG IS, WOODSIDE JV. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology* **54**:176-186.

ZADAK Z, HYSPLER R, TICHÁ A, HRONEK M, FIKROVA P, RATHOUSKA J, HRNCIARIKOVA D, STETINA R. (2009). Antioxidants and vitamins in clinical conditions. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* **58 Suppl 1**:S13-17.

ZHANG L, CHEN CL, KANG PT, GARG V, HU K, GREEN-CHURCH KB, CHEN YR. (2010). Peroxynitrite-mediated oxidative modifications of complex II: relevance in myocardial infarction. *Biochemistry* **49**:2529-2539.

ZHAO, Z.QI, (2004), Oxidative stress-elicited myocardial apoptosis during reperfusion. *Curr Opin Pharmacol* **4**: 159-165

ZHONG, W., OBERLEY, T.D., (2001), Redox-mediated effects of selenium on apoptosis and cell cycle in the LNCaP human prostate cancer cell line, *Cancer Res.*, **61**; 7071.

ÖZGEÇMİŞ

I- KİŞİSEL BİLGİLER

Adı: Vedia
Soyadı: Deletioğlu
Doğum Yeri ve Tarihi: İskenderun- 26.01.1988
Uyruğu: T.C.
Medeni Durumu: Bekar
İleişim Adresi ve Telefonu: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik A.D. – 03123103010

II- EĞİTİMİ

İskenderun Ticaret ve Sanayi Odası İlköğretim Okulu
Kurtuluş İlköğretim Okulu, İskenderun
İbn-i Sina Anadolu Lisesi
Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Lisans (2007-2011)
Yabancı Dili: İngilizce

III- STAJLAR

İskenderun Özel Palmiye Kadın Hastalıkları ve Doğum Hastanesi- Biyolog
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı-
Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı- Biyolog
Doğu Finlandiya Üniversitesi- Fiziyojji Departmanı, Konuk Araştırmacı

IV-KURSLAR ve SERTİFİKALAR

Laboratuvar Hayvanları Kullanım Sertifikası- 14.01.2013-25.01.2013-
ANKUSEM