



T.C
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PLAZMA VE ERİTROSİTLER ARASINDA SİSTİN-SİSTEİN DÖNGÜSÜ

YELİZ ÇAKIR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Antakya/HATAY

OCAK-2008

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PLAZMA VE ERİTROSİTLER ARASINDA SİSTİN – SİSTEİN DÖNGÜSÜ

YELİZ ÇAKIR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Doç. Dr. Deniz YILDIZ danışmanlığında hazırlanan bu tez 03/01/2008 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Deniz YILDIZ
SÖKMEN

Başkan

Yrd. Doç. Erol ATAY

Üye

Yrd. Doç. Bahar

Üye

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. Necat AĞCA
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Tübitak tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 106T299

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	V
ŞEKİLER DİZİNİ.....	VI
ÇİZELGE DİZİNİ.....	VII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
2.1. L-Sistein	8
2.2. L-Sistin.....	9
2.3. Glutasyon Sentezi ve Önemi.....	11
2.4. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar.....	15
2.5. Hücre Membranı.....	18
2.5.1. Membran Proteinleri.....	19
2.5.1. Membran Lipidleri.....	20
2.6. Eritrositler	21
2.6.1. Eritrositlerin Membran Yapısı.....	22
2.6.2. Eritrosit Membranın Fonksiyonları.....	24
2.6.3. Eritrosit Metabolizması.....	25
2.6.4. Eritrositlerde Pentoz Fosfat Yolu ve Önemi.....	26
2.7. Membran Transport sistemleri.....	39
2.8. Memeli Hücrelerinde Amino Asit Transport Sistemleri.....	31
2.8.1. Zwitteriyonik Amino Asitler için Transport Sistemler.....	32
2.8.2. Katyonik Amino Asit Transport Sistemleri.....	34
2.8.3. Anyonik Amino Asit Transport Sistemleri.....	34
2.9. Memelilerin Boşaltım Sistemleri	35
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	39
3.1. Materyal.....	39
3.2. Yöntem.....	45
3.2.1. İstatistiksel Analizler.....	52
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	53

5. TARTIŞMA SONUÇ VE ÖNERİLER.....	65
KAYNAKLAR.....	68
TEŞEKKÜR.....	77
ÖZGEÇMİŞ.....	78

ÖZET

PLAZMA VE ERİTROSİTLER ARASINDA SİSTİN – SİSTEİN DÖNGÜSÜ

Sunulan çalışmanın amacı sistin-sistein döngüsünün eritrositler ve plazma arasında bir işlevinin olup olmadığının belirlenmesidir. Sunulan bu çalışmada farklı ozmolaritelere sahip değişik miktarlarda sistin içeren eritrositler krebs ringer fosfat tamponuna inkübasyona bırakılırlar. Sonuçlar gösteriyor ki; tamponun ozmolaritesi 310 mOsmol/L olduğunda eritrositler sistini çevrelerinden temin etmiyorlar. Ayrıca eritrositlerde sistin-sistein döngüsü bu izomolar tamponda gözlenmemektedir. Bununla birlikte 1200-1400 mOsmol/L arasında değişiklik gösteren böbrek özünde hiperozmolar bir tampona maruz bırakıldıklarında eritrositler sistini çevrelerinden temin etmeye başlarlar ve sistin-sistein döngüsüne yol açarlar. Sistin temini ve sistin-sistein döngüsü, eritrositler ve tampondaki serbest -SH konsantrasyonlarının ölçümlerindeki değişimlerle karakterize edilirler. Eritrositler 1 mM sistin içeren 1250 ve 1300 mOsm/L tamponda inkübe edildikten sonra ortamdaki serbest -SH konsantrasyonları sırasıyla $0,102 \pm 0,002$ ve $0,241 \pm 0,013$ $\mu\text{mol/ml/Eritrosit}$ e ulaşır. Sonuçlarımız, eritrositlerin çoğunlukla böbrek özünde yaygın olan hiperozmolar bölgede sistin-sistein döngüsünü sergilediklerini göstermektedir. Bu sonuçlar ayrıca bu yöntemin biyolojik olarak aktif ve enerjiye bağlı olan bir yöntem olduğunu da göstermektedir. Gözlemlenen sistin-sistein döngüsü eritrositler düşük sıcaklıklarda ve glikoz yokluğunda inkübe edildiklerinde inhibe olmaktadır. Sonuçlarımızın önerdiği nokta; hiperozmolar şartlara maruz kaldıklarında eritrositler sistini temin eder, hücre içinde sistine indirger ve ardından çevrelerine geri salarlar. Eritrositlerin plazmanın sistin ve sistein konsantrasyonlarının düzenlenmesinde bir rolü olabilir ve bu yüzden plazmanın redoks durumunun düzenlenmesine katkıda bulunuyor olabilir.

Anahtar kelimeler: Sistin – sistein döngüsü, Hiperozmolarite, Eritrositler

ABSTRACT
CYSTINE-CYSTEINE CYCLE BETWEEN ERYTHROCYTES AND THE
PLASMA

The objective of the present study was to determine if a cystine-cysteine cycle operates between the erythrocytes and the plasma. In the present study we incubated the erythrocytes in krebs ringer phosphate buffer with different osmolarity containing different amounts of cystine. Our results show that erythrocytes do not uptake cystine from the environment when the osmolarity of the buffer is 310 mOsmol/L. Erythrocytes also do not operate a cystine-cysteine cycle in this isoosmolar buffer. However when exposed to hyperosmolar buffer in the ranges that occur in the kidney medulla which is in between 1200-1400 mOsmol/L erythrocytes start to uptake cystine from the environment and induce a cystine-cysteine cycle. The cystine uptake and cystine-cysteine cycle were characterized by measurement of changes in the free-SH concentrations in erythrocytes and in the buffer. Following incubation of erythrocytes in 1 mM cystine containing 1250 and 1300 mOsmol/L buffer, the free-SH concentrations in the buffer reached to 0.102 ± 0.002 and 0.241 ± 0.013 $\mu\text{mol/ml/erythrocyte}$ respectively. Our results demonstrate that erythrocytes display a cystine-cysteine cycle in hyperosmolar environment which is prevailed mainly in the kidney medulla. Our results also display that this process is biologically active and energy dependent. The observed cystine-cysteine cycle is inhibited when the erythrocytes are incubated at lower temperatures and in the absence of glucose. Our results suggest that erythrocytes uptake cystine, intracellularly reduce it to cysteine and release it back to the environment when exposed to hyperosmolar conditions. Erythrocytes may have a role in the regulation of plasma cystine and cysteine concentrations and thus may contribute to the regulation neoplasma redox status.

Keywords: Cystine-cysteine cycle, Hyperosmolarity, Erythrocytes

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AIDS	Acquired Immuno deficiency syndrome (Kazanılmış İmmün sistem yetersizliği sendromu)
ASC	Alanin, Serin, Sistein taşıma sistemi
ATP	Adenozin trifosfat
BSO	Buthionin sülfoksimin
CDND	1-kloro-2,4-dinitrobenzen
DMAP	4- dimetil aminofenol
DTNB	5,5'-dithiobis (-nitrobenzoate)
DNA	Deoksiribonükleik asit
Hb	Hemoglobin
HbA1c	Glikozillenmiş hemoglobin
H ₂ O ₂	Hidrojenperoksit
ETDA	Etilendiamin tetraasit
GABA	Gammaaminobutirik asit
GSSG	Okside glutatyon
GSH	Redükte glutatyon
GGT	γ-glutamil transpeptidaz
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
GS-DNP	S-(2,4-dinitrofenil)glutatyon
G6PD	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
G6P	Glukoz-6-fosfat
NAC	N-Asetil-L-sistein
NAD	Nikotinadenin dinükleotid
O ₂ ⁻	Süperoksit
ROS	Reaktif oksijen ürünleri
SH	Sülfidril
SA	Salisilik asit
TCA	Trikloroasetikasit

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Plazma ve eritrositler arasında sistin-sistein döngüsü.....	3
Şekil 1.2. L-Sistein ve L-Sistin kimyasal yapısı.....	10
Şekil 1.3. Glutatyonun kimyasal yapısı.....	12
Şekil 1.4. Glutatyon sentezi.....	14
Şekil 1.5. Eritrosit membranının yapısı.....	23
Şekil 1.6. Eritrosit membranında bulunan proteinler.....	.24
Şekil.1.7. Eritrositlerdeki başlıca glikoz metabolizma yolları.....	28
Şekil. 4.1. Eritrositlerde izoosmolar ortamda, L-sistin girişi.....	.54
Şekil.4.2. Eritrositlerde sistin-sistein döngüsü.....	.55
Şekil 4.3. Eritrositlerde, sistin konsantrasyonunun, sistin-sistein döngüsüne etkisi ..	.57
Şekil.4.4. Eritrositlerde hiperosmolar ortamda, L-sistin girişi.....	58
Şekil.4.5. Eritrositlerde sistin-sistein döngüsünün enerjiye bağıllığı.....	59
Şekil.4.6. Eritrositlerde glutamat ve aspartat ın sistin-sistein döngüsüne etkisi.....	.62
Şekil.4.7. Eritrositlerde, CDNB ile ön inkübasyonun sistin-sistein döngüsün etkisi..	.63
Şekil.4.8. Eritrositlerde, sükröz hiperozmolaritesi ve sistin-sistein döngüsü.....	.64

ÇİZELGELERİN DİZİNİ

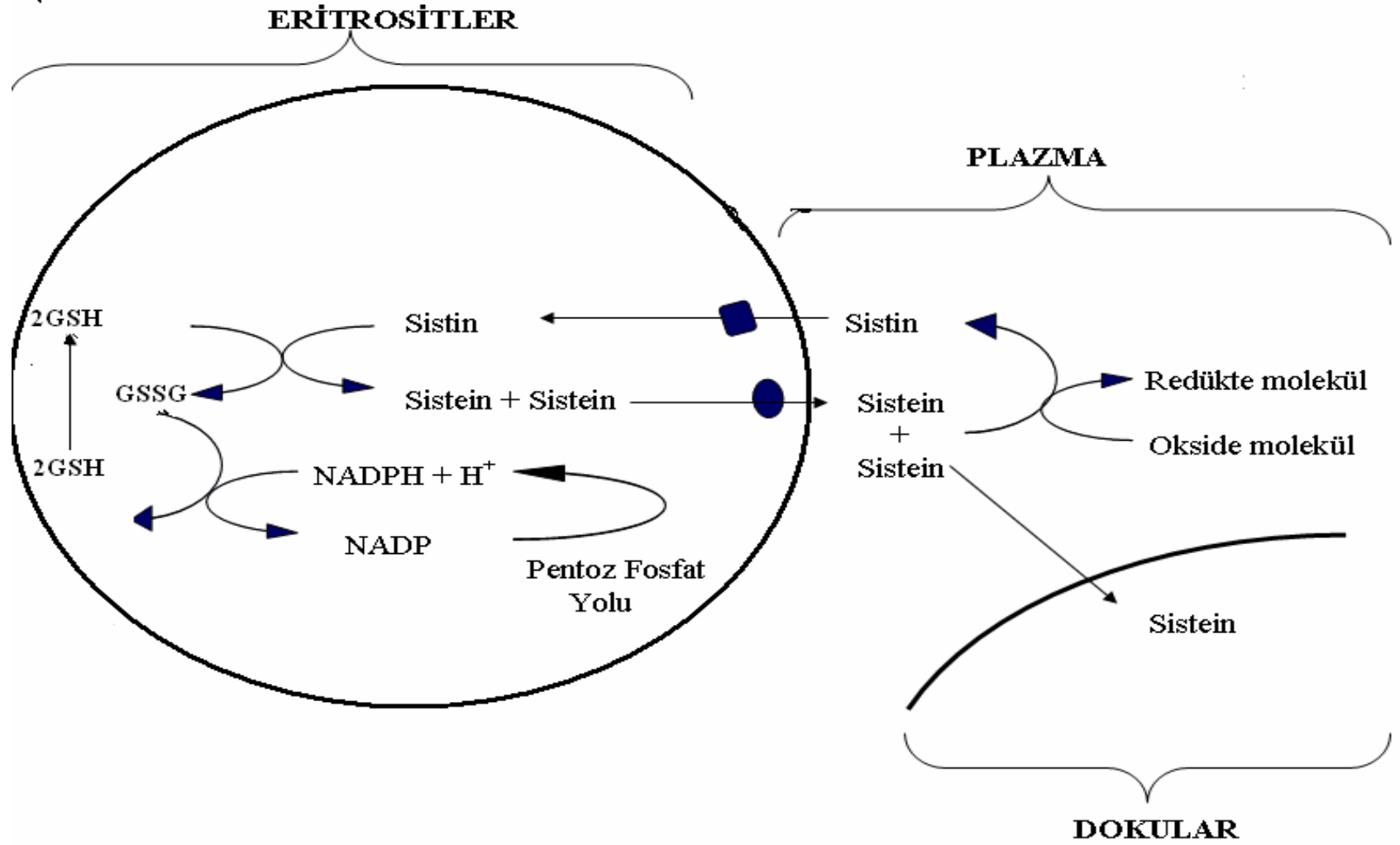
	Sayfa
Çizelge 4.1. Eritrositlerde sistin-sistein döngüsüne sıcaklığın etkisi.....	60

1. GİRİŞ

Sistin transportu birçok dokuda sistein amino eldesinin ilk adımıdır. Sistin birçok dokuda sodyuma bağlı olmayan mekanizmalarla hücre içerisine alınmaktadır (Mcbean ve ark., 2002; 2001). Sodyuma bağlı mekanizmada sistin glutamat taşıyıcıları tarafından alınmakta, sodyuma bağlı olmayan mekanizmada ise glutamatla birebir değişim şeklinde hücre içerisine alınmaktadır. Sistin hücre içerisine alındıktan sonra sisteine redüklenmektedir. Sistein amino asidi hücrelerde GSH (glutatyon) sentezi için gereklidir (Griffith, 1999). Sistein amino asidi GSH yapısına katılmak dışında, hücre içi ve hücre dışı redoks durumunun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. GSH, glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden sentezlenen bir tripeptittir. Yapısında üç amino asit bulunmasına karşılık GSH sentezinin hızı sistein amino asidinin hücre içi miktarına bağlıdır (Griffith, 1992). GSH eriyebilen bir antioksidandır ve hücreleri serbest radikallere karşı korumakla görevlidir (Gille ve Sigler, 1995; Clemens ve Waller, 1987). Ayrıca çeşitli ksenobiotiklerin hücresele detoksifikasyonunda da rol oynar. Bu reaksiyonlar çoğunlukla glutatyon S-transferaz enzimi tarafından katalizlenen konjugasyon reaksiyonlarını içerir (Eckert ve ark 1986). Oluşan glutatyon konjugatları daha sonra hücreden dışarı atılırlar (Ansari ve ark., 1987). Bu reaksiyonlarda, sistein reaktif bir sülfid gurubu sağlayıcısı ve GSH'ın fonksiyonel gurubu olarak davranır. Sistein GSH sentezine katılmakla kalmaz aynı zamanda N-Asetil-L-sistein olarak kullanıldığında serbest radikallere karşı antioksidan olarak işlev görür (Vries ve ark., 1993). GSH eritrositlerde aktif olarak sentezlenmektedir ancak sentezlenen GSH eritrositlerin dışına transport edilmemektedir (Lunn ve ark., 1979). Böylece karaciğerin aksine eritrositler plazmaya GSH temin edemezler (Lu ve ark., 1996). Sistin hücre içerisindedir çoğunlukla sisteine redüklenmektedir. Hücre dışı ortam daha okside edici olduğundan sistein plazmada çoğunlukla sistin halinde bulunmaktadır. Sisteinin kendi başına GSH gibi bir antioksidan olarak etki ettiği bilinmektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar sistein amino asidinin plazma ve bakteri periplazmalarındaki redoks homostazinin düzenlenmesinde rol aldığını göstermektedir. E. coli hücrelerinin CydDC transporterları tarafından periplazmaya redoks dengesini düzenlemek üzere sistein amino asidini transport ettikleri gösterilmiştir (Pittman ve ark., 2002). CydDC mutantlarının periplazmasında gözlenen redoks durumundaki bozukluk bunu desteklemiştir. Plazma tiyol seviyelerinin vasküler hastalıklarla ilişkili olduğu

gösterilmiştir. Plazmadaki redükte sistein miktarının, plazmadaki redükte homosistein miktarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Anderson ve ark., 1999). Bu çalışmalar plazmadaki redükte sistein amino asidinin plazma redoks durumunun düzenlenmesinde rolü olduğunu desteklemektedir. Plazmadaki redükte sistein amino asidi bu şekilde plazmada bulunan birçok molekülün okside/ redükte durumunu belirleyebilir. Bu anlamda plazmada sistin yerine sistein konsantrasyonlarının yüksek tutulması tercih edilen bir durum olacaktır. Plazmada bulunan sistinin dokular tarafından alınıp sistine dönüştürüldüğü bilinmektedir. Ancak şimdiye kadar plazmada bulunan sistinin sistine dönüşümünü sağlayabilecek bir döngünün veya başka bir mekanizmanın varlığı tartışılmamıştır.

Çalışmamızda plazma ve eritrosit arasında bir sistin- sistein döngüsünün olmadığı araştırılmıştır. Öngörülen bu döngü şekil 1.1 de şematize edilmiştir. Eritrositlerde muhtemelen plazmadan başka moleküllerin redüklenmesi sonucu sistein amino asidinden oluşan sistin moleküllerini alan ve sistine dönüştürdükten sonra sistini tekrar plazmaya transport eden bir mekanizma bulunabilir. Böyle bir döngünün olabileceği son zamanlarda yapılan çalışmalarla desteklenmektedir. Çalışmalar, eritrositlerin sistein amino asidini konsantrasyona bağlı olarak dışardan aldığı ve daha sonra ortamda sistein bulunmaması durumunda alınan sistein amino asidini tekrar dışarıya transport ettiğini göstermiştir. Bu sonuçlar eritrositlerin plazma redoks durumunun düzenlenmesinde rolü olduğunu göstermiştir. Çalışmalar plazma ve eritrositler arasında bulunacak muhtemel bir sistin-sistein döngüsünün varlığını da desteklemektedir.



Şekil 1.1: Plazma ve eritrositler arasında sistin-sistein döngüsü

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Srivastava ve Beutler, (1969) insan hücrelerinden okside glutatyonun transportunu araştırmışlar, normal eritrositlerde, glukozun bulunmadığı ortamda inkübasyon ve hidrojen peroksitle difüzyona maruz bırakılma sonucunda, GSH düzeylerinin düştüğü, GSSG düzeylerinin arttığı gözlenmiştir. Aynı şekilde ATP düzeylerinde, dört saatlik inkübasyon sonrası kademeli bir düşüş saptanmıştır. Ortama PBS- glukoz eklendiğinde ise GSH, GSSG ve ATP düzeylerinde değişim olmadığını ve inkübasyon ortamında GSSG' nin oldukça az miktarda bulunduğunu saptamışlardır (Srivastava ve Beutler, 1969).

Lunn ve ark, (1979) eritrositlerin redoks tepkimeleri sonucu meydana gelen süperoksit radikallerini ve ilaçların toksik etkilerinin uzaklaştırılmasında rol oynayan GSH' u yüksek miktarda içerdiklerini belirtmişlerdir. GSH' un, eritrositlerin ortalama \pm 120 günlük yaşamlarını sürdürmeleri ve kendilerini toksik maddelerden koruyabilmeleri için gerekli antioksidan bir molekül olduğunu göstermişlerdir (Lunn ve ark., 1979).

Board, (1981) insan eritrositlerinden S-konjugatlarının transportu üzerine çalışmalar yapmıştır. Çalışmasında konjugasyon reaksiyonlarının, glutatyon –S- transferaz enzimi tarafından katalizlendiğini belirtmiştir. Çalışmalarının sonucunda tespit edilen GSH ve GSSG, önceki GSH'ın % 70'nin glutatyon S- konjugatlara dönüştüğünü ve hücrelerden transport edildiğini göstermiştir (Board, 1981).

Eckert ve Eyer, (1986) eritrositlerde ksenobiyotik ve glutatyon S-konjugatlarının oluşumunu ve transportunu incelemişlerdir. Aminofenollerin reaksiyonları üzerine yaptıkları çalışmada DMAP üzerine yoğunlaşmışlardır. DMAP (4-dimetil aminofenol) yüksek oranlarda in vivo ve in vitro ferrihemoglobin oluşumunu katalizlediğini bu nedenle de bu kimyasalların siyanür zehirlenmeleri tedavisinde kullanımını bildirmişlerdir. DMAP ve glutatyon S- konjugatlarının oluşumunun in vitro olarak meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Çalışmalarının sonucunda GSSG ve GS-DNP (S-(2,4-dinitrofenil)glutatyon)'nin ATP bağımlı transport edildiğini gözlemlemişlerdir (Eckert ve Eyer, 1986).

Ohutsuka ve ark, (1988) eritrositlerde sistin transportu üzerine araştırma yapmışlardır. Normal eritrositlerin oluşum safhasından sonra nükleuslarını ve birçok sitoplazmik enzimlerini kaybettiklerini ve bu yüzden protein sentezi yapamadıklarını

ancak, hücelere taşınan amino asitlerin GSH sentezi için gerekli olduğunu ileri sürmüşlerdir (Ohutsuka ve ark., 1988).

Gevondyan ve ark, (1989) domuz böbreğinden izole edilen Na⁺- K⁺ ATPaz' daki serbest sülfidril gruplarının ve disülfid bağlarının analizi üzerine çalışmışlardır. Na⁺- K⁺ ATPaz domuz böbreğinin dış medüllasından izole edilmiş, saflaştırılan Na⁺- K⁺ ATPaz' daki serbest -SH grupları ve disülfid bağları gümüş nitrat ile ammetrik titrasyon yapılarak saptanmıştır (Gevondyan ve ark., 1989).

Ulakoğlu ve ark, (1998) strese bağlı mide mukozası hasarında endojen glutasyon tükenişinin enerji metabolizması ile ilişkisini incelemiştir. Çalışmada hareketsizlik nedeniyle stres ülseri gelişen sıçan mide mukozalarında, ATP değişiminin GSH düzeyini nasıl etkilediği ve serbest radikallerin detoksifikasyonu sırasında indirgenmiş GSH' ın, oksitlenmiş GSSG' a dönüşümünü katalizleyen GPx aktiviteleri araştırılmıştır. Sonuç olarak stres ülseri gelişen sıçanların mide mukozasında GSH ve ATP düzeylerinde kontrol gruplarındakilere oranla anlamlı azalmalar olduğu gözlenmiştir (Ulakoğlu ve ark., 1998).

Pacalın ve ark, (1998) memeli plazma membranındaki amino asit taşıyıcılarının moleküller biyolojisi üzerine yaptıkları çalışmada, amino asit taşıyıcılarının, doku özgüllüğü, transportun tipik özellikleri, yapı-fonksiyon ilişkisi ve taşıyıcıların varsayılan fizyolojik rolleri tanımlanmıştır (Pacalın ve ark., 1998).

Skrzydewska ve ark, (1999) ratlara metanol verilmesi ile birlikte lipid peroksidasyon yapılarında artış, karaciğer glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz aktivitelerinde azalma görülmüştür. Ancak metanolden sonra NAC kullanılması ile lipid peroksidasyonunda azalma, karaciğer ve eritrositlerde GSH seviyesinde artma ve serumdaki GSH'a bağlı enzimlerin aktivitelerinde artma kaydedilmiştir (Skrzydewska ve ark., 1999).

Griffith, (1999) düşük moleküller ağırlığa sahip GSH' ın hüceleri oksidatif stres ajanlarına ve reaktif elektrofollere karşı koruyan önemli bir antioksidan olduğunu ileri sürmüştür. Sistein GSH' un sentezinde ihtiyaç duyulan ve sentezi sınırlayan bir amino asittir. Bu nedenle sistein, etkili hücre içi bir antioksidan olarak bilinir (Griffith, 1999).

Sies, (1999) hücrel fonksiyonlarda glutasyonun rolünü incelemiştir. GSH' ın tiyol redoks durumunu kapsayan biyolojik olaylarda görev alan bir tripeptit yapısı

olduğunu belirtmiştir. Salınımının karaciğerde gerçekleştiğini ve GSSG' nin salınımında olduğu gibi diğer dokulara kan yoluyla ulaştırıldığını ve bu yolun merkapturik asit biyosentezinde zorunlu bir basamak olan S-konjugatların transportu içinde kullanıldığını bildirmişlerdir (Sies, 1999).

Aslan ve Dündar, (2000) kan viskozitesi ve oksidatif stres ilişkisini incelemiş ve viskozite üzerine etkili olan faktörler, oksidan - antioksidan denge, serbest radikal artışı ve antioksidan kapasite baz alındığında viskositenin özellikle eritrosit ve oksidan-antioksidan tablosu ile ilişkisini ortaya koymayı amaçlamışlardır. Kan viskozitesinin oksidatif stres ile ilişkili olduğu, hiperviskositenin oksidatif stres ve hücre oksidatif statüsünün göstergesi olduğunu ya da kan oksidatif stresinin hiperviskosite habercisi olabileceği sonucuna varılmıştır (Aslan ve Dündar, 2000).

Cengiz ve Cengiz, (2000) tip 2 diyabetli hastalarda C vitamini HbA1c ve GSH düzeyleri üzerine etkisini incelemişler. 30. gün ve 60. gün sonunda HbA1c düzeylerinde anlamlı bir azalma ve GSH düzeylerinde anlamlı bir artma görülmüştür. Sonuçlara göre, C vitamini antioksidan etkiyi arttırmış ve nonenzimatik glikolizlenmeyi azaltmıştır (Cengiz ve Cengiz, 2000).

Sagne ve ark, (2001) küçük nötral amino asitler için lizozoma taşıyıcıların tanımlanması ve karakterize edilmesi üzerinde çalışmışlardır. Çalışmalar sonucunda, lizozomların enzimatik olarak sindirilen proteinlerden elde edilen amino asitleri hücre dışına taşıyan bir sisteme sahip olduklarını belirtmişlerdir. LYAAT-1 olarak adlandırılan bu sistemin γ - aminobütrik asit, L- alanin ve L- prolin gibi nötral amino asitlerin organel lümeninden sitozole doğru taşınımını sağladığını tespit etmişlerdir (Sagne ve ark., 2001).

Zou ve ark, (2001) CDNB' nin kırmızı kan hücreleri üzerindeki etkilerini belirlemek için çalışmışlardır. CDNB' nin glutatyon azaltıcı bir ajan olduğu ve eritrosit membran düzenini bozucu bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bu çalışmalarda, yüksek konsantrasyonlarda CDNB' nin eritrositlerin hemolizine sebep olduğu, membran tiyollerinde kuvvetli bir indirgenme sebebi olduğu ve membran proteinlerinin fragmentasyon ve polimerizasyonun sebebi olduğu belirlenmiştir (Zou ve ark., 2001).

Badaloo ve ark, (2002) şiddetli malnütrisyon görülen çocukların normalden daha fazla oksidan hasara sahip olduklarını belirtmişlerdir. Bu çocuklarda GSH' ın düşük konsantrasyonlarda bulunduğu bildirilmiştir. Bunun nedeni GSH sentezinin çok

yavaş olması ve öncü amino asit olan sisteinin hücre içi ve hücre dışı konsantrasyonlarının azlığı olarak gösterilmiştir. Çalışmada, tedavinin erken evresinde ek besin olarak sistein amino asidi alımının çocuklarda normal GSH sentez oranı ve GSH konsantrasyonu sağlayıp sağlamadığı araştırılmıştır. Eritrositlerin sistein ve GSH konsantrasyonları ayrıca GSH sentez oranı iki grup şiddetli malnütrisyonlu çocukta ölçülmüştür. İlk gruba NAC, diğer gruba ise alanin ek besin olarak verilmiştir. Çalışmaların sonunda NAC grubunda GSH konsantrasyonu ve sentez oranındaki artışın kontrol grubundan sırasıyla % 150 ve % 510 daha fazla olduğu saptanmıştır. NAC grubundaki bu artış ek besinin eritrosit sistein konsantrasyonu üzerinde etkili olmasıyla sağlandığı bildirilmiştir (Badaloo ve ark., 2002).

Pittman ve ark, (2002) *Escherichia coli*'nin redoks durumunda denge sağlamak amacıyla sisteini sitoplazmadan periplazmaya taşıdığını ve bu taşınımın ATP bağımlı kaset tipi taşıyıcı olan CydDC tarafından gerçekleştiğini bildirmişlerdir (Pittman ve ark., 2002).

Zhang ve ark, (2003) sistein ve sistein türevlerinin meme kanseri üzerinde bir etkisinin olup olmadığını araştırmışlardır. Meme kanserli hastalarda yapılan çalışmada, sistein ve sistein türevlerinin meme kanserinde koruyucu bir etkiye sahip olduğu, yüksek plazma sistein konsantrasyonunun meme kanseri riskindeki bir azalmayla yakından ilişkili olduğunu ve sistein türevi olan NAC'ın antikarsinogenik ve antigenotoksik özellik gösterdiğini ve bu nedenle karsinogenez yolunun çeşitli basamaklarında etkin rol oynayabileceğini bildirmişlerdir (Zhang ve ark., 2003).

Armutçu ve ark, (2004) alkol alışkanlığı olan 25 erkek grubu eritrositlerin oksidan-antioksidan durumunu değerlendirmişlerdir. Aşırı alkol tüketimi veya alkol alışkanlığı sonucunda hepatik steatozis, alkolik hepatit, hepatik fibrozis ve siroz yer almaktadır. Yapılan çalışmada, alkol alışkanlığının eritrosit oksidan – antioksidan dengesini etkilediğini lipid peroksidasyonuna bağlı olarak meydana gelen bu değişikliklerin alkolle ilişkili hastalıklar ve komplikasyonlarda rolü olabileceği bildirilmiştir (Armutçu ve ark., 2004).

Wu ve ark, (2004) glutatyon metabolizması ve sağlık açısından önemi üzerine araştırma yapmışlardır. Hayvanlar ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, besinlerle alınan proteinlerin vücuttaki GSH dengesinin devamlılığının sağlanmasında son derece önemli olduğu saptanmıştır. Besinlerle ek olarak alınan sistin, methionin, NAC ve L-2-

oxothiazolidin -4-karboksilat' ın doku glutatyon sentezi için etkili sistein öncülleri olduğu belirtilmiştir. Ayrıca bu çalışmada oksidatif stresin yaşlanma ve Alzheimer, Parkinson, karaciğer, orak hücre anemisi, AIDS, kanser, inme, kalp krizi, diabet gibi birçok hastalığın gelişmesinde anahtar rol oynadığı ve glutatyonun, oksidatif strese karşı savunmada görev aldığını bildirmişlerdir (Wu ve ark., 2004).

Zalups ve Lash, (2006) deneysel sıçanlara damar içine sistin amino asidi verilmesinin ardından, plazma sistein düzeylerindeki değişiklikler araştırılmıştır. Çalışma sonucunda plazma sistein konsantrasyonlarının 50 kat arttığı gösterilmiştir (Zalups ve Lash, 2006)

2.1. L- Sistein

L- Sistein, serbest –SH grubu içeren bir aminoasittir. Hücrede protein sentezi için gerekli olmakla birlikte, önemli bir tripeptit olan glutatyonun fonksiyonel –SH grubu bu aminoasitin varlığından kaynaklanmaktadır (Yıldız ve ark., 2005; Griffith, 1999). Sisteindeki sülfidril grubu, methionin amino asitinin homosisteinden, karbon iskeleti ise serin amino asitinden gelmektedir. Bu iki amino asit birleşerek sistein amino asitini meydana getirmektedir (Conway ve ark., 2000).

Vitamin B₆, B₁₂ ve folat, sistein sentezini düzenleyen pek çok reaksiyonda yer alır. Homosistein ve methionin birbirine dönüşümü çok hızlı gerçekleşir. Hücrede methionin artışı zaman, homosistein sistatyonin sayesinde sisteine katalizlenir (Zang ve ark., 2003). Sistein besinlerle alınan esansiyel olmayan bir amino asittir (Conway ve ark., 2000). Hücresel ortamda methionin amino asiti var olduğu sürece sistein methioninden sentezleneceği için sistein esansiyel bir amino asit olarak kabul edilmemektedir. Şekil 1.2' de sisteinin kimyasal yapısı görülmektedir. Sistein, bütün hücrelerin sitozolünde GSH sentezine katılan bir amino asittir (Lu ve ark., 1996). Olgunlaşmış insan eritrositleri sitoplazmik organellerini ve birçok enzimlerini kaybettikleri için protein sentezi yapamazlar. Fakat eritrositler çeşitli kimyasalların elimine edilmesinde rol alan GSH' u yüksek miktarda ihtiva ederler (Luun ve ark., 1979).

Hücre içerisine alınan sistein, oksidatif stres ve çeşitli toksik ajanlara karşı hücreleri koruyan glutatyonun sentez hızını sınırlar ve hücre içi konsantrasyonun

dengede tutulmasında rol oynar (Bender ve ark., 2000). Sistein, hücre içi antioksidan olarak karsinojenlerin detoksifiye edilmesinde de görev alır. Sistein ve sistein türevleri fizyolojik şartlar altında reaktif oksijen türleri tarafından oluşturulan transkripsiyon faktör nükleer faktör K_B bağlı genlerin ekspirasyonunu inhibe eder. Daha çok aktif sitotoksik T hücreleri ve T hücre klonlarının DNA sentezini stimüle eder. Bu sayede T hücreleri aracılığıyla immün tepkimelerde düzenleyici rol oynar (Zhang ve ark., 2003).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, oksidasyon sonucu büyük moleküllerde geri dönüşümsüz hasar meydana geldiğini ve uyarı mekanizmalarında hasar oluşumuna neden olduğunu göstermektedir (Jones ve ark., 2002). Daha çok sistein tiyollerini hedef alan oksidasyonun, enzimlerin, reseptörlerin, iyon kanallarının, taşıyıcılar ve transkripsiyon faktörlerinin fonksyonları için tehdit oluşturduğu tespit edilmiştir (Jones ve ark., 2002). Sistein, memeli sistemlerinde normalin üstündeki konsantrasyonlarda toksik bir etki meydana getirdiğinden dolayı ortamdaki hızlıca otookside edilerek uzaklaştırılır. Bu sayede plazmada daha az konsantrasyonlarda tutulması sağlanmış olur (Jones ve ark., 2002).

Sisteinin hücre içerisine alınımı, genelde Na⁺ ve ATP'ye bağımlı ASC sistemi ve Na⁺ dan bağımsız taşıyıcı sistemler tarafından gerçekleşmektedir (Palacın ve ark., 1998). Sodyumdan bağımsız anyonik amino asit taşıyıcı sistem X_c⁻ 1:1 sitokiyometri ile L- glutamat için L- sistin değişimine aracılık eder. Sistin kalıntılarının polipeptid zincirine katılması sonucu NADP bağımlı sistein redüktaz ile oksidasyon sonucu oluşur (Onat ve ark., 2002).

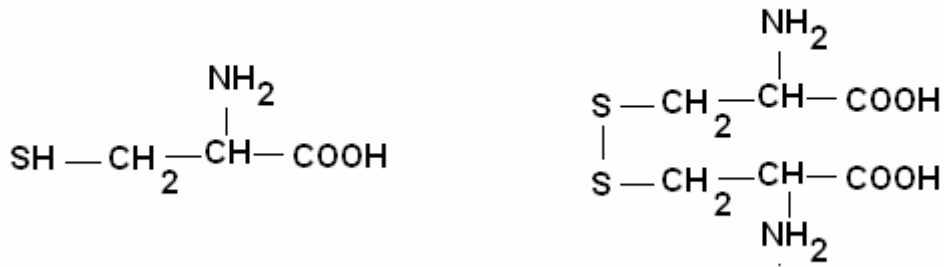
2.2. L- Sistin:

Sistin, iki molekül sisteinin disülfid bağlarıyla bağlanması sonucu şekillenir. Genel formülü (SCH₂CH(NH₂)₂COOH)₂ dir. 1810 yılında William Hyde Wolloston tarafından keşfedilmiştir. Ancak 1899 yılında ineklerin boynuzlarından izole edilene kadar proteinlerin bir parçası olarak tanımlanmamıştı. Şekil 1.2'de sistinin kimyasal yapısı görülmektedir.

Sisteine nazaran sistin suda çok az çözünen bir amino asit olduğundan böbrek tübüllerinde çökmesi sonucu sistin taşları oluşur. Sistinin lizozomlardan ATP-bağımlı taşınmasındaki bir kusur nedeniyle, ender fakat çok daha ciddi bir durum olan sistinozis

ortaya çıkar. Sistinozise genellikle yaygın bir aminoasidüri de eşlik etmektedir (Onat ve ark., 2002). Sistin sinir, kas ve bazı dokuların yapı taşlarından olan aminoasitlerden biridir. Ender görülen ailevi bir hastalık olan sistinüri de böbrekler de sistin taşları oluşur. Tüm taşların % 1-2 sini oluşturmaktadır. Sistinin plazma membranından taşınımında bir çok transport sistemi aracılık eder. X_c^- transport sistemi anyonik amino asitler olan sistin ve glutamat için spesifik bir değişim ajanı olarak bilinir. Sistem X_c^- aktivitesi intraselüler glutatyon ve redoks bir sistin ve sisteinin ekstraselüler dengesinin sağlanmasında önemli rol oynar (Sato ve ark., 2002).

Koplementer DNA'lar X_c^- transport sisteminin iki kısımdan ibaret olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalar, insan fibroblast kültürlerinde ve farelerin peritoneal makrofajlarında sistin ve glutamat için yüksek spesifiteye sahip, Na^+ bağımsız anyonik amino asit transport sistemi olarak tanımlanmıştır. X_c^- sistemin aktivitesi kültüre edilen hücrelerde elektrofilik ajanlar ve oksijen tarafından indüklenir. X_c^- sistem aracılığı ile ortamdan alınan sistin hücre içerisinde sisteine indirgenir, glutatyon ve protein sentezinde kullanılır (Sato ve ark., 2002). Alınan sisteinin bir kısmı doğal transport yoluyla geri salınır. Böylece X_c^- sistem aktivitesi sistin ve sistein döngüsüne karışarak kültür ortamında sistin ve sistein dengesinin sürdürülmesinde önemli rol oynar (Sato ve ark., 2002). Böylece kültür hücrelerinde anyonik transport sistem X_c^- nin aktivitesi, antioksidan bir ajan olan intraselüler glutatyonun devamlılığı için esas olarak kabul edilmiştir (Sato ve ark., 2002)



L-Sistein

L-Sistin

Şekil. 1.2. L-Sistein ve L-Sistin Kimyasal yapısı (Gözükara; 2001).

2.3. Glutasyon Sentezi ve Önemi

Glutasyon (γ -glutamilsisteinilglisin), düşük moleküler ağırlıklı bir tripeptittir. GSH, Glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşan, ilk olarak 1921 yılında Hopkins tarafından keşfedilmiştir. Daha önce glutamil ve sisteinden ibaret bir dipeptid olduğu düşünülmüş ve 1929 yılında kristal halde elde edildikten sonra yapısının tripeptid olduğu anlaşılmıştır. 1935 yılında ise Harrington ve Meod tarafından γ -L-glutamil–sistein-glisin halinde sentez edilmiştir (Gözükara, 2001; Sies, 1999).

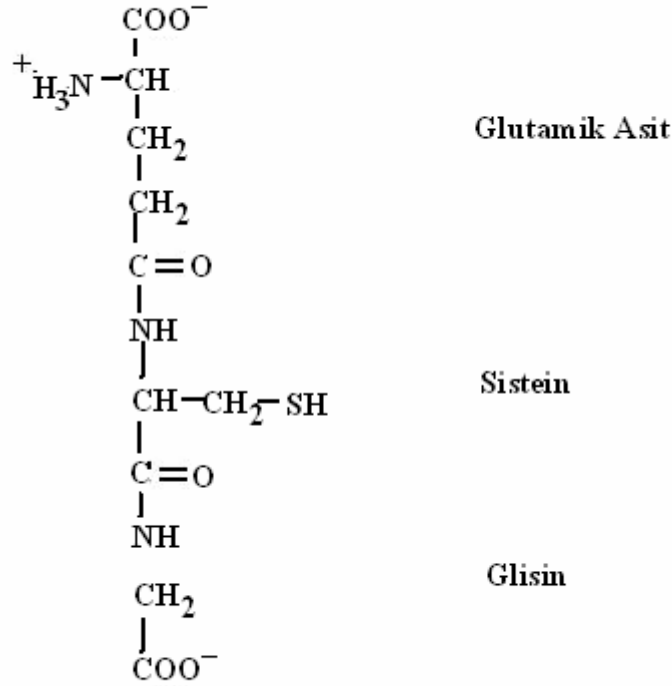
Şekil 1.3' de glutasyonun kimyasal yapısı verilmiştir. Moleküler ağırlığı 307 gram olan bu bileşik tüm bitki ve hayvan hücrelerinde bulunmaktadır. Hücre içi antioksidan olarak görev yaptığı bilinmektedir. GSH' daki peptidil γ -bağlantısı, tripeptid yapısını aminopeptidazların yıkımından korur (Gözükara, 2001).

Glutasyon, sistein, glisin ve glutaminden γ - glutamilsistein sentaz ve Glutasyon sentetaz enzimlerinin birbirini takip eden faaliyetleri sonucunda sentezlenir (Griffith, 1999). DNA ve protein sentezleri enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, detoksifikasyon, hücre içi ve dışı taşınım gibi hücrel fonksiyonlar dışında başlıca antioksidan olarak hücre savunmasında da önemli rol alır (Ulakoğlu ve ark., 1998). GSH, amino asit taşıyıcısı olarak ve hücrel proteinlerdeki –SH gruplarının indirgenmiş halde tutulmasında rol oynar ve bu sayede eritrositleri oksidatif hasardan korumaktadır (Onat ve ark. 2002; Mazzar ve ark., 1996).

Hücrelerde Glutasyon konsantrasyonu sabit tutulup bu miktarın 1-8 mM arasında olduğu belirtilmektedir (Griffith, 1999; Labbella ve ark., 1986).

Glutasyon sentezi 2 basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta, glutamil sistein sentetaz enzimi, glutamat ve sisteinden, glutamilsistein oluşumunu katalizler. İkinci basamakta ise glutasyon sentetaz, glisinglutamilsisteinden glutasyonu oluşturur. Glutasyon negatif feed–back ile glutamilsistein oluşum hızını ve böylelikle kendi sentezini denetler. Bu sentez sırasında bir molekül glutasyon için 2 ATP' nin hidrolizi gerekmektedir. Şekil 1.4' de glutasyon sentezi verilmiştir.

Birçok enzim glutasyonu etkilemezken pankreatik karboksipeptidazlar glutasyondan glisini kopararak yapıyı bozmaktadır. Eriyebilir bir antioksidan olan glutasyon lipid peroksidasyonu ve ilaçların toksik etkilerine karşı hücrelerin savunmasında görev almaktadır (Ulakoğlu ve ark., 1998)



Şekil 1.3. Glutatyonun Kimyasal Yapısı (Gözükara; 2001)

. Bunun yanında birçok kimyasalın toksik etkisinin inhibe edilmesinde ve hücre hasarının engellenmesinde önemli bir role sahiptir.

Glutatyon sentetaz enzimi aracılığıyla hücrelerde bir kere sentezlenen glutatyon biyolojik zarlardan transporta maruz kalır. GSH salınımı karaciğerde gerçekleşir (Murray ve ark., 1998). Hücrelerde, lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres durumunda hızlıca okside olur ve GSSG formuna dönüşür. GSSG formu aktif taşıma ile hücreden uzaklaştırılır. Glutatyonun insan eritrositlerinde yarı ömrünün 3-4 gün olduğu belirtilmiştir (Olive ve Board, 1994).

Eritrositler yüksek miktarda glutatyon içerir (Kalra ve ark., 1981). Glutatyon eritrosit membranı için hayati öneme sahip bir bileşiktir. Glutatyon, oksidatif stres altında hemoglobin ve diğer tiyol içeren proteinlerin bozulmasını önler (Srivastava ve ark.,

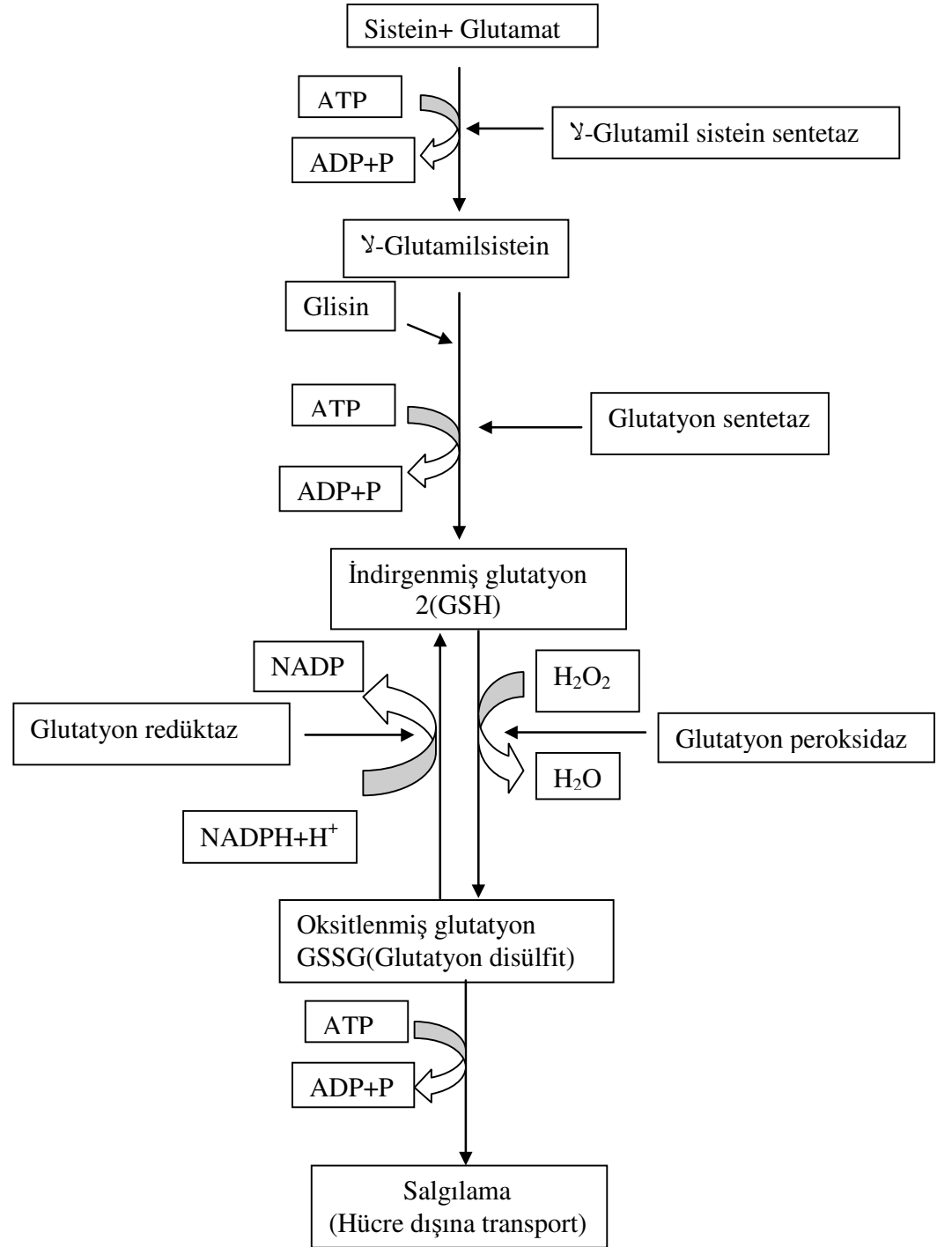
1970). Glutamat, sistin ve glisin eritrosit hücrelerine taşınarak GSSG' un azalan konsantrasyonunun yeniden redüklenmesi için kullanılır (Ohtsuka ve ark., 1988).

Yaşlı eritrosit hücreleri yeterli NADPH sentezi yapamadıkları için hemen hemoliz olurlar. Yeterli NADPH üretilmediğinden zardaki –SH gruplarının oksidasyonu ve lipid radikal etkileşimi sonucu peroksidasyon oluşumuyla eritrosit zararir (Murray ve ark., 1998)

Oksidatif stres vücudun oksidan–antioksidan dengesini bozarak hücre içi antioksidan olan GSH azalmaya ve hücrelerin yoğun bir şekilde oksijen radikallerine maruz kalmasına sebep olmaktadır (Onat ve ark. 2002). Bunun sonucunda membran lipitleri ve hücrenin çeşitli yapısal proteinlerinde hasar oluşumu meydana gelmektedir. Oksidan– antioksidan dengenin bozulması sonucunda ortamda biriken GSSG'de –SH içeren yapılarla etkileşerek hasar oluşumu meydana gelmektedir (Ulakoğlu ve ark., 1998).

İnsanlarda Alzheimer veya Parkinson gibi serebro vasküler hastalıkların glutatyonun indirgenme yükseltgenme basamaklarındaki bir bozukluktan yada glutatyon eksikliğinden kaynaklandığı bilinmektedir (Wegrzynoicz ve ark., 2007).

Antikanser ilaçların etkisi incelenirken, ilaç direnci, DNA tamiri (özellikle topoizomeraz) ve GSH'ın etkileri üzerinde yoğunlaşmıştır (Kouvar ve ark., 1998). Yapılan çalışmalar ile glutatyonun antikanser ilaçların detoksifikasyonunda rol oynadığı, ilaç dirençli insan kanser hücrelerinde artmış GSH düzeyleri ile gösterilmiştir (Nogato ve ark., 2001; Demirtaş ve ark., 1997).



Şekil 1.4. Glutasyon Sentezi (Ulakoğlu ve ark.,1998).

2.4. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron bulunan, kısa ömürlü, reaktif atom veya moleküllerdir. Halojen atomlar, oksijen metabolizması ara ürünleri olan oksijen türleri, Cl veya Br gibi tek atomlu yapılar, Na, K gibi alkali metal atomları, bir orbitalinde tek elektron bulunduran NO, NO₂ gibi atom kombinasyonları radikaller olarak sınıflandırılmaktadır. Ancak, Cu⁺², Fe⁺³, Mn⁺², Mo⁺⁵ gibi geçiş metalleri dış yörüngelerinde birer elektron bulundurmalarına rağmen radikal kabul edilmezler. Radikaller elektrik yük olarak; pozitif, negatif yada nötr olabilirler. (Akkuş, 1995; Sen, 1995).

Aeorobik organizmaların yaşamlarını sürdürebilmeleri için organik moleküllerden enerji açığa çıkarmada moleküler oksijeni kullanmak zorunda olmaları, bu canlıları doğal olarak oksijenin toksik metabolit ürünleriyle birlikte yaşamak durumunda bırakmıştır. Oksijen canlı organizmaları oluşturan moleküllerin yapısına girmesi, besin kaynağı maddelerde temel element olması ve aerobik canlılardaki oksidasyon reaksiyonları ve solunumda rol alması nedeniyle önemlidir (Thumham, 1990; Erenel ve ark., 1992).

Metabolizmada oksijenin % 98'i oksidazlar yoluyla suya çevrilmektedir. Geriye kalan kısım ise oksijenazlar yoluyla hücre içi organellerin yapılarını ve fonksiyonlarını değiştiren membranlarda oksidatif hasara neden olan reaktif toksik ürünlere dönüştürülür (Wickens, 2001; Özdem ve Şadan, 1994).

Oksijenin indirgenmesi sonucunda süperoksit (O₂⁻) oluşur. Mitokondriyal elektron transportu esnasında oluşan süperoksit anyonları, süperoksit dismutaz enzimi tarafından hidrojen peroksit (H₂O₂) dönüştürülerek elimine edilir (Dillioğlugil ve ark., 2005). Hidrojen peroksit (H₂O₂) katalaz yada glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleri tarafından suya dönüştürülerek hücre ortamından uzaklaştırılması sağlanır (Champe ve ark., 1997).

Hidrojen peroksit (H₂O₂) hücreler için toksik olmakla beraber, özellikle indirgenmiş metal iyonlarıyla reaksiyona girdiğinde önemli serbest radikal hasarına neden olmaktadır (Erenel ve ark., 1992). Hidrojen peroksit (H₂O₂) indirgenmiş glutatyonun kofaktörlüğünü yaptığı glutatyon peroksidaz enzimi tarafından ortamdan uzaklaştırılır (Ulakoğlu ve ark., 1998).

Oksijen radikalleri arasında en reaktif ve en toksik etkili olanı hidroksil(OH) radikalidir (Kılınç, 1986; Erenel ve ark., 1992). Miyokard hücreleri ve kandaki akyuvarlar tarafından üretilen hidroksil (OH⁻) radikalleri, lipid peroksidasyonu, DNA ve proteinlerdeki -SH gruplarıyla oksidasyonu sonucunda hücrelerde oksidatif hasara neden olmaktadır (Murray ve ark., 1996).

Serbest radikaller başlıca oksijenin normal metabolizma basamaklarında indirgenmesi ile açığa çıkmaktadır. Bunun dışında organizmaya ani ve aşırı miktarda oksijenin girişi, epinefrin ve diğer ketokolaminlerin artışı, laktik asit, laktat dehidrogenaz, kreatin fosfokinaz gibi enzimlerin aktivitelerinin yükselmesi,; gebelik, egzersiz gibi fizyolojik haller; kimyasal çevre kirliliğinin yoğun olduğu ortamlarda uzun süre yaşam, yoğun stres, sigara ve alkol kullanımı, diyetle doymamış ve kolay peroksilenebilen yağların fazla miktarda bulunması, antioksidan savunma sistemi yetmezlikleri veya savunma duvarının aşılması gibi durumlarda oksidan - antioksidan denge bozulabilir. Bu durum serbest radikallerin oluşumunun artışından yada antioksidan aktivitesinin yetersizliğinden oluşabilir (Dündar ve ark., 1999a; Akkuş, 1995). Ayrıca pestisit ve herbisitler, X- ışınları, ilaçlar, güneş ışınları ve yiyeceklerde bulunan bazı bileşikler de serbest radikal oluşturabilirler (Alessio ve Blası,1997).

Serbest radikaller başta membran fosfolipitleri olmak üzere, hücrel bileşiklerin tümüne (karbonhidrat, lipit, protein, DNA) zarar vermekte, membranlar depolarize olmakta, parçalayıcı enzimlerin aktivitesi artmakta, hücre zarının permabilitesi ve elektrik yük dengesi değişmektedir (Sinclair ve ark., 1990; Kavas, 1989). Serbest radikaller başta mitokondrium olmak üzere hücre membranı, lizozomlar, peroksizomlar, çekirdek ve endoplazmik retikulumda lokalize olurlar (Bendick, 1990).

Enzimatik ve nonenzimatik antioksidan savunma sistemleri serbest radikal reaksiyonlarını kontrol ederek belirli düzeylerin üzerine çıkmasına engel olmak üzere görev yapmaktadır. Organizma değişen koşullara karşı hücrel homeostazisi korumak durumundadır. Serbest radikal ve lipid peroksidasyonuna karşı bu yolla antioksidan bir savunma sistemi oluşturarak hücrel dengeyi korumaya çalışmaktadır (Thomas, 1995).

Antioksidan özelliği bulunan maddeler, radikalleri etki alanından temizleme, radikal üreten kimyasal reaksiyonları durdurma, reaksiyon hızını baskılama, moleküler hasarı onarma, hücrel enzim kinaz kayıplarını önleme, endojen antioksidan kapasiteyi

artırma gibi mekanizmalardan en az biri ile çalışarak oksidan–antioksidan dengeneyi korurlar (Dündar ve ark., 1999a).

Eritrosit hücreleri, katalaz, sistein, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz gibi enzimsel antioksidan sistemlerine sahiptirler (Gültekin ve ark., 2001). Enzimatik antioksidanlar eritrositlerde oksidatif stres oluşumunu engelleyebilirler. E vitamini ve C vitamini gibi enzimatik olmayan antioksidanlarda serbest radikallerin hücre membranından temizlenmesinde biyolojik olarak büyük öneme sahiptirler.

Eritrositler çoklu doymamış yağ asitleri ve hemoglobin demirinden dolayı oksidatif hasara yatkındırlar (Armutçu ve ark., 2000).

Eritrositelerde hemoglobinin methemoglobine oksidasyonu ile süperoksit anyonu oluşur. Nötrofiller bakteri ile temas ettirildiğinde, fagositoz olduktan sonra lökosit hücre membranında yerleşmiş olan NADPH oksidaz sistemi çevre dokulardaki moleküler oksijeni süperokside dönüştürür. Süperoksit kendiliğinden H_2O_2 ve O_2 vermek üzere dismutasyona uğrar. Glutatyon peroksidaz, okside glutatyon ve H_2O vermek üzere indirgenmiş glutatyon ve H_2O_2 ye etki eder. Bu enzim diğer peroksitlere de etki edebilir. H_2O_2 sonuçta glutatyon peroksidaz ve glutatyonun kendisi tarafından elemine edilir. Glutatyon, karbon, nitrojen ve sülfür kaynaklı radikalleri de elemine edebilmektedir (Murray ve ark., 1996).

Kısa süreli ağır egzersizlerden sonra lenfosit hücrelerinde vitamin E ve antioksidan enzim aktivitelerindeki değişim araştırılmış ve ağır egzersize bağlı olarak vitamin E ve antioksidan enzim aktivitelerinde bir artış olduğu tespit edilmiştir. Bu antioksidan bileşiklerin serbest radikallere karşı bir koruma sağladıkları belirtilmektedir (Gültekin ve ark., 2001).

Melatoninin, epifiz bezinden salgılan N-asetil–5-metoksitriptamin immun sistem uyarıcısı ve uykuya neden olan bir madde olarak bilinir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, bu maddenin serbest radikallerin uzaklaştırılmasında antioksidan olarak işlev gördüğü ve oksijen radikallerinden membran lipidlerini, sitozolik proteinleri ve DNA'yı koruduğunu göstermiştir (Gültekin ve ark., 2001).

Tiyol içeren antioksidan bir bileşik olan NAC, reaktif oksijen türlerinin detoksifitesini ve GSH sentezinin devamlılığını sağlayarak eritrositleri oksidatif strese karşı korumaktadır. NAC hücre içi tiyol düzeyini artırarak GSH sentezini devam

ettirmektedir. Bu özelliğinden dolayı miyokardial hasarda, kanser, mukolitik ve parasetamol zehirlenmesinden sonra oluşan akut akciğer yetmezliklerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin hücrelerden uzaklaştırılmasında antioksidan ilaç olarak da kullanılmaktadır (Gustafsson ve ark., 2005; Yıldız, 1996).

NAC, Benzopyren, asetilaminoflorans ve sigaranın kanserojen maddelerinin DNA'ya bağlanmasını bloke eder. Pestisitler ve ksenobiotiklerin kullanımına bağlı olarak açığa çıkan serbest oksijen türleri lipid perosidasyon oluşumuna tetikleyici ajanlar olarak bilinmektedir. Lipid peroksidasyonu, serbest oksijen türleri ile membran lipitlerinin etkileşimi sonucu oluşmakta ve daha çok moleküller düzeyde doku hasarına neden olmaktadır (Robbins ve Kumar, 1990). Lipid peroksidasyonun eritrositlerin antioksidan savunma mekanizmalarını etkilediği endojen ve ekzojen antioksidan miktarlarında önemli derecede azalmaya neden olduğu ileri sürülmüştür (Gültekin ve ark., 2001).

2.5. Hücre Membranı

İster prokaryotik ister ökaryotik olsun tüm hücreler, hücreyi sınırlayan ve hücre içeriğini çevre dokudan ayıran bir plazma membranı ile sarılmıştır. Moleküllerin geçişinde seçici bir bariyer olan plazma membranı, spesifik moleküllerin hücre içi veya dışına hareketini düzenleyerek sitoplazmanın kompozisyonunu belirler. Ayrıca membranın yapısındaki bazı proteinler hücreler arası etkileşimleri kontrol etme ve hücreye gelen çevresel sinyalleri alma fonksiyonlarını yürütür (Cooper, 2004; Murray, 2003; Devlin, 1992).

1972 yılında plazma membranının yapısını ortaya koymak için Singer ve Nicholsan tarafından ileri sürülen sıvı-mozaiik zar modeli günümüzde hala geçerliliğini korumaktadır (Singer ve Nicholsan, 1972). Bu modele göre membranlar; asimetric, akışkan bir fosfolipid çift tabakasında yayılmış olan integral proteinlerden oluşmuştur ve membranın dış yüzeyine yerleşmiş az sayıda karbonhidrat molekülü içerirler. Fosfolipid çift tabakası arasına gömülmüş olan proteinler hücrelerin birbirini tanınmasını ve moleküllerin seçici tansportunu sağlar. Fosfolipid çift tabaka yapısı kararlı olmasına rağmen, herbir fosfolipid ve sterol molekülü zar düzleminde serbest olarak hareket eder.

Zar lipidleri gibi proteinler de ikili tabaka düzleminde lateral olarak serbest bir biçimde hareket ederler (Devlin, 1992).

Membrandaki karbonhidratlar özellikle hücrelerin yüzey kısımlarında alıcı olarak görev yapmaları nedeniyle hücrelerin dış yüzeyinde yoğun olarak bulunurlar. Karbonhidratlar lipidler ve proteinlerle, glikolipid ve glikoproteinleri oluştururlar. Glikolipid ve glikoproteinler membran kitlesinin yaklaşık olarak % 5-10'unu oluşturur. Bu karbonhidratlar glukoz, galaktoz, mannoz, N-asetilgalaktozamin, N-asetilglukozamin ve siyalik asittir. Membran karbonhidratları hücrelerin birbirini tanımasını ve adezyonu sağlar (Öztaş, 2004; Devlin, 1992). Karbonhidratlar kendilerine benzer hücreleri tanırlar ve doku oluşmasını sağlarlar. Yabancı yapıları tanıyarak immun yanıt oluşumuna yol açarlar (Şimşek, 1994).

2.5.1. Membran Proteinleri

Lipidler membranların temel yapısal elemanı olmasına karşın proteinler spesifik fonksiyonların yerine getirilmesinden sorumludur. Çoğu plazma membranlarının ağırlığının yarısı protein yarısı ise lipidlerden oluşmuştur. Proteinler lipidlerden daha büyük olduklarından dolayı bir protein molekülüne karşılık yaklaşık 50-100 lipid molekülü bulunur (Cooper, 2004).

Membran proteinlerinin birçoğu spesifik hücre membranlarının üzerinde veya içinde yerleşmiş olan enzimlerdir. Diğerleri ise moleküllerin membran içinden transportunu sağlayan veya hormon ve büyüme faktörleri için reseptör olan proteinlerdir (Devlin, 1992).

Membrandaki başlıca yapıtaşı olan proteinler iki gruba ayrılırlar. Membran yüzeyi ile gevşek ilişki gösteren çevresel (perifer) proteinler ve doğrudan lipid tabakası içinde gömülü olan içsel (integral) proteinlerdir (Junqueira ve ark., 1998).

Perifer membran proteinleri lipid çift tabakanın hidrofobik kısmının içine girmez. Primer olarak membranın sitoplazmaya bakan tarafında yerleşmişlerdir. Bu proteinler zara bağlı enzimlerin fonksiyonlarının düzenlenmesini ve integral proteinlerin hücre içi yapılara tutunmalarını sağlarlar (Nelson, 2004).

İntegral membran proteinleri lipid çift tabakasının içine gömülmüş ve membran lipidlerinin hidrokarbon zincirleri ile etkileşim halindedirler (Nelson, 2004).

Katalitik aktivite için gerekli ligant bağlama bölgesi ve karbonhidrat veya lipidlerin bağlanması için spesifik bölgeler içerebilirler. Membranın sitozolik yüzeyinde daha çok proteinin amino ucunun, miristik asit (C14) veya sistein amino asitlerinin yan zinciri üzerinden palmitik asit (C16) veya pirenil grupları (farnesil C15) ile kovalent bağlanmaktadır. Membran kalınlıkları 7.5-10 nm arasında değişmektedir ve sadece elektron mikroskobu ile görülebilirler (Onat ve ark., 2002). Bazıları kısmen membran içine gömülü oldukları halde birçoğu transmembran proteindir. Transmembran proteinleri membranın her iki yüzeyi ile ilişkili olacak şekilde lipid çift tabakasını boydan boya katederler. Bunlar genellikle membran içindeki kısımları 20-25 hidrofobik aminoasit; lösin, izolösin, valin ve fenilalanin gibi amino asitleri içeren, α - heliks yapısında ve hücre yüzeylerinde kalan kısımlarına oligosakkarit bağlı glikolipidlerdir (Cooper, 2004; Devlin, 1992). Plazma membranı boyunca yerleşim gösteren proteinler, hücre dış ortamından hücre içine gerekli organik ve inorganik maddelerin alımını, metabolizma sonucu meydana gelen hücre için zararlı atıkların dışarı atılmasını sağlar (Onat ve ark., 2002).

2.5.2. Membran Lipidleri

Memeli hücrelerde plazma membranlarının üç major lipid komponenti şunlardır:

- 1- Gliserolipidler : Fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin.
- 2- Sfingolipidler : Sfingomiyelin, serebrosidler, gangliosidler.
- 3- Kolesterol.

Gliserofosfolipidler ve sfingomiyelin, fosfolipidler başlığı altında toplanır (Onat ve ark., 2002).

Fosfolipidler fosforillenmiş bir alkol grubunun oluşturduğu polar bir baş kısmı ve buna bağlı nonpolar iki yağ asidi zincirinden oluşmuştur. Hidrofilik ve hidrofobik kısımlara sahip olmalarıyla çift tabakalı yapıyı oluştururlar. Hidrofilik polar baş kısımları çift tabakanın dış yüzeylerine yerleşirken hidrofobik yağ asidi zincirleri iç kısımda yer alırlar.

Kolesterol ve fosfolipidler membranların her iki tarafında yer alırlarken, sfingomiyelin ve fosfotidilkolin dış tabakada, fosfotidilserin ve fosfotidiletanolamin iç tabakada yer alır. Fosfolipidler membranın temel yapısal bütünlüğünün ve seçici geçirgenliğinin sağlanmasından sorumludurlar (Şimşek, 1994)

Kolesterol, membran akışkanlığının belirleyicisidir. İki yağ asidi arasına girerek Van der Wals çekim kuvvetini azaltarak membrana akışkanlık sağlamaktadır (Onat ve ark., 2002).

2.6. Eritrositler

Eritrositler, sulu ortamda hareket halindeki özelleşmiş hücrelerden oluşan kan dokusunda bulunurlar ve ilk olarak 1665 yılında Malphigi tarafından tanımlanmışlardır. 1673 yılında Leeuwenhock, kana kırmızı rengini eritrositlerin verdiğini tesbit etmiştir. İnsan eritrositleri çekirdeksiz, bikonkav disk şeklindedir ve yapısında % 34 Hb ve Fe^{+2} molekülü bulunmaktadır. Eritrosit yapısındaki Hb'in varlığını Funke, demirin varlığını ise Menghini bulmuştur (Özer,1985).

Eritrosit hücreleri "stem cell" olarak adlandırılan temel hücrelerden oluşmaktadır. Bu temel hücreler birçok değişim aşamalarından sonra retikulositleri oluşturur (Shohet,1986). Nukleus dışında memeli hücre organellerinin tümünü ihtiva eden retikulositler; glikoliz, krebs döngüsü, pentoz fosfat yolu, oksidatif fosforilasyon, kolesterol, fosfolipit, hemoglobin, triaçil gliserol ve pürin nükleotit sentez enzimlerini bulundururlar (Thomas, 1986). Retikulositler kemik iliğinden kan sirkülasyonuna salındıktan üç gün içinde organellerini kaybederek (mitokondri, golgi cisimciği ve RNA'nın hücreden uzaklaşmasıyla) olgun eritrositlere dönüşürler (Shohet, 1986; Thomas, 1986). Olgun eritrositlerin biyosentez yetenekleri yoktur. Bu nedenle ortalama 120 günde yaşlanan eritrositler 120 gün sonrasında RES hücreleri tarafından dolaşımdan alınarak yıkılmaktadırlar (Shohet, 1986).

Erkek ve kadında eritrosit miktarı farklı olup sırasıyla erkekte 5.4×10^6 kadında 4.8×10^6 olup, eritrosit sayısı ve eritrositlerdeki hemoglobin düzeyi oksijen temini için belirleyici bir faktördür (Milan Ve ark., 2004; West , 1995).

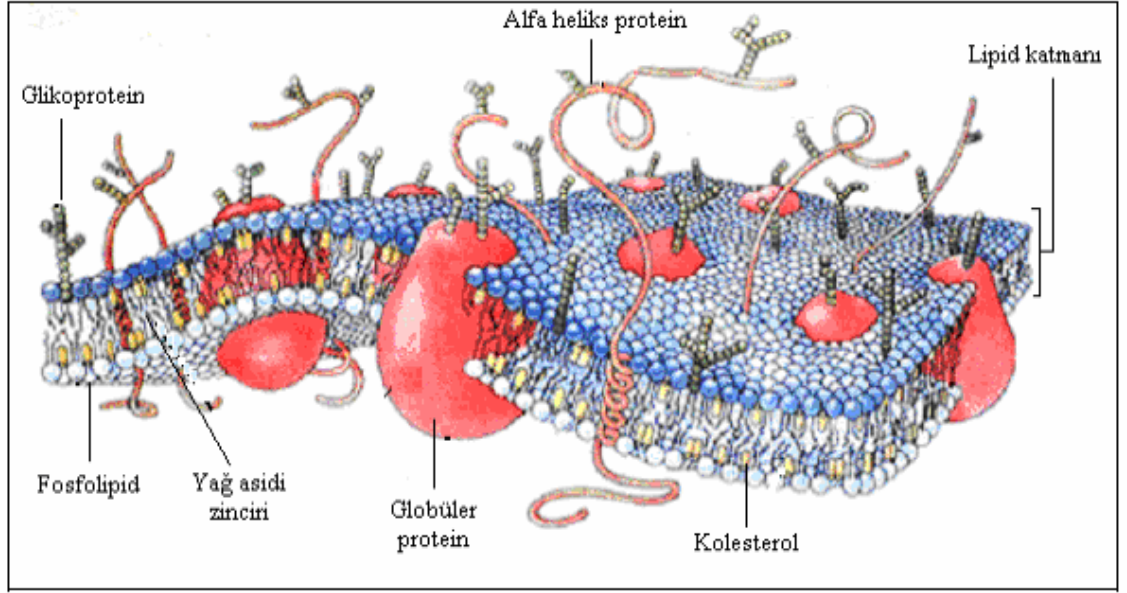
Eritrositler, organizmanın ihtiyacı olan oksijenin (O_2) sağlanması, karbondioksitin (CO_2) uzaklaştırılması, kan pH'sının ayarlanması gibi, oldukça önemli

görevleri olan hücrelerdir. 120 günlük yaşam süreleri boyunca, değişen çevre koşulları ile karşılaşır. Çekirdek, mitokondri, ribozom gibi organelleri olmadığı için nükleik asit, protein ve lipid sentezi yapamazlar. İyon dengesinin sürdürülmesi, hemoglobin yapısının korunması, hücre zarının esnekliği ve bütünlüğünün sağlanabilmesi için eritrositlerin çok fazla miktarda enerjiye ihtiyaçları vardır. Taşıdıkları yüksek miktardaki O₂ nedeniyle oksidatif zarara uğrama olasılığı en yüksek olan hücrelerdir (Aslan, 2002 ; Yalın ve ark., 2001; Keskin, 2001). Reaktif oksijen ürünleri (ROS) eritrositler için oldukça zararlıdır. Bu ürünlerin başlıca hedefleri hemoglobin ve hücre zarıdır. Bu oksidan ajanlar hemoglobinin β zincirlerini, zar proteinlerini ve bunların taşıdıkları –SH (sülfidril) gruplarını oksitleyerek oksidatif hasara sebep olurlar. Hemoglobinde hem gruplarının oksidasyonu ile methemoglobin oluşumuna neden olurlar. Ayrıca globinin sistein (Cys) yan zincirindeki –SH gruplarının oksidasyonu ile disülfid köprülerinin oluşumuna neden olurlar. Hücre zarı üzerindeki etkisi ise; zar lipidlerinin peroksidasyonu sonucunda proteinlerin oksitlenmesi sitoskelette değişikliklerin meydana gelmesine neden olur. Meydana gelen değişiklikler sonucunda zar bütünlüğü bozularak eritrositler parçalanır ve bireylerde akut hemolitik anemi meydana gelir (Aslan, 2002 ; Yalın ve ark., 2001; Keskin, 2001).

2.6.1. Eritrositlerin Membran Yapısı

Eritrosit membranı protein, lipid ve karbonhidratlardan oluşur. Özellikle fosfolipid ve serbest kolesterolden oluşan lipidler membranın yaklaşık % 50' sini oluşturur (Yenerel, 2004). Fosfolipidler lipid katmanı içerisine asimetrik bir şekilde dağılmışlardır. Lipid katmanının dış kısmı sfingomyelin, glikolipid ve fosfatidilkolin içerirken, sitoplazmaya bakan iç kısmı ise fosfatidilinositol, fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamin gibi lipidlerden oluşmaktadır. Hücre içi ve hücre dışı sıvılarla temas edecek şekilde çift tabakalı olarak dizilmiş olan bu lipid yapısı sayesinde hücre içeriği dış ortamdan korunabilmektedir. Kolesterol ise membranın esnekliğinin ve kararlılığının devam ettirilmesinde görev yapmaktadır (Sadava, 1993). Bu lipid yapısı dışında eritrosit membranında 12 major ve yüzlerce minor protein mevcuttur. Proteinler membranın dış yüzeyine gevşek olarak yapışmış halde (periferik proteinler) ve lipid tabakanın içinde boylu boyunca gömülü (integral proteinler) haldedir. İntegral proteinler, özellikle eriyik haldeki maddelerin hücre içi ile dışı arasındaki iletişimi sağlar. Bunlar

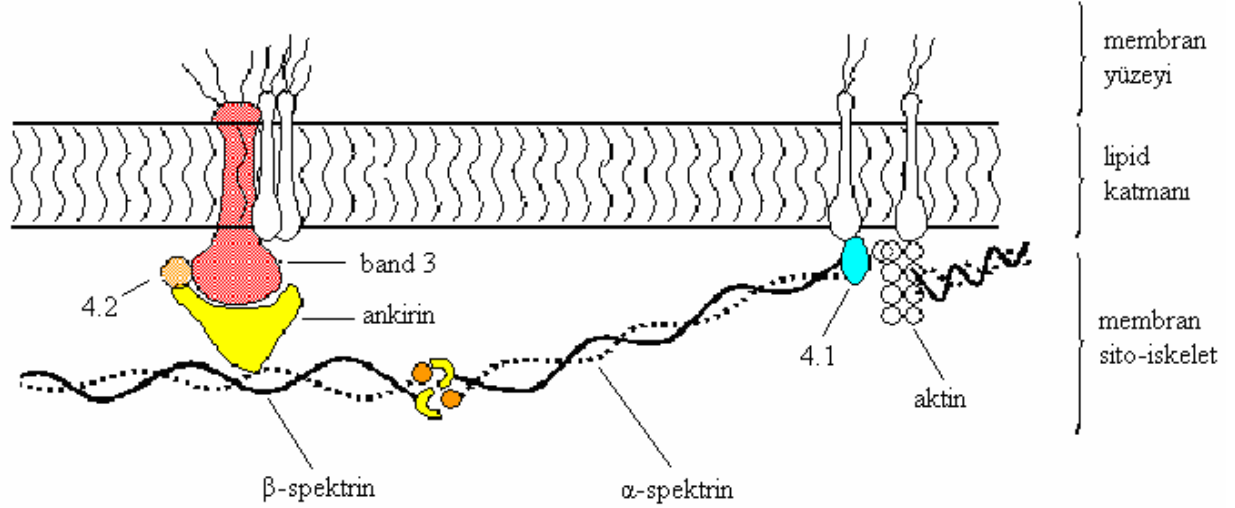
içinde en önemlileri spektrin, aktin, ankirin, band-3, glikoporin-A ve glikoporin-B dir. Hücre membranı ayrıca içerden hücre iskeleti olarak adlandırılan ve proteinlerden oluşan ağ şeklinde bir yapı ile güçlendirilmiştir (Discher ve ark., 2001). Hücre iskelet proteinleri membran proteinlerinin % 50-60' lık kısmını oluşturmaktadır ve sodyum dodesil sülfat jel elektrofezi ile birbirinden ayırt edilebilirler (Yenerel, 2004).



Şekil 1.5. Eritrosit membranın yapısı (Agre ve ark.,1989)

Spektrin, kırmızı hücre zarı sito-iskelet bileşeni olup alfa ve beta izoform yapılarında bulunabilmektedir. Birbirlerine gevşekçe sarılı olan bu iki heliks biçimindeki bu yapılar her iki uçta birleşerek bir tetramer oluştururlar. Oluşan bu spektrin tetramerleri ise membrana ankirin proteinleri ile bağlıdır (Agre, 1989; Yalın ve Aksoy, 1997).

Ankirin kendisi ise band 3 adı verilen bir membran proteine bağlıdır. Band 4.2 adı verilen proteinin, ankirin ile band 3 proteini arasındaki bağlantıyı sağlamlaştırdığı düşünülmektedir (Sadava, 1993).



Şekil 1.6. Eritrosit membranında bulunan proteinler (Discher ve ark., 2001; Sleep ve ark., 1999).

2.6.2. Eritrosit Membranının Fonksiyonları

Eritrosit membranı klorür/bikarbonat değişimi esnasında pH'ın sabit düzeyde tutulması, organik fosfatlar ve indirgenler gibi hayati önem taşıyan bileşiklerin korunması ve çeşitli metabolik artıkların organizma dışına atılması gibi birçok hayati önem taşıyan fonksiyonları yerine getirir (Patrick ve ark., 2004). Ayrıca glikolitik enzimleri inaktive ederek eritrosit metabolizmasının düzenlenmesini sağlar. Eritrosit membranının dış yüzünün kaygan olması kırmızı kan hücrelerinin endotel hücrelerine yapışmasına engel olmaktadır (Sikorski ve ark., 2000).

Eritrosit membranı, hücreye esneklik ve dayanıklılık özelliği kazandırarak döngüsel stres esnasında hücrenin bütünlüğünün korunmasına imkan verir. Hemogloblin sentezi için hücre içine demir alınmasını sağlar (Yalın ve Aksoy, 1997).

Eritrosit membranının ağırlıkça % 10'unu şekerler oluşturur. Eritrosit membranında bulunan glikoprotein ve glikolipidlerin büyük bölümü ise N-asetilnöraminik asit olup tanınma, haberleşme ve adezyon faaliyetlerini düzenler. Bu görevlerin yanı sıra reseptör fonksiyonlarının düzenlenmesi, transport işlemleri, hücrenin büyümesi ve antijenik aktiviteyi kontrol etmek gibi hayati görevler yapar (Malgorzata ve ark., 1987). SA'ler, eritrosit membranında glikoprotein ve glikolipidlerin uç kısımlarına bağlı olarak bulunurlar. Bu konumlarından dolayı SA'ler, membran kararlılığının sürdürülmesinde önemli görevler yüklenirler. SA'ler katyon

değişimi, reseptör fonksiyonları, membran polaritesinin sürdürülmesi ve hücre içi etkileşimler gibi olaylarda rol alırlar (Stibler ve ark., 1983).

2.6.3. Eritrosit Metabolizması

Eritrositlerin görevi, yapısındaki hemoglobin ile oksijeni dokulara taşımak ve vücut için tampon özelliği sağlamaktır. Bu görevi yerine getirebilmeleri için şekillerini, iç yapılarını ve membran aktivitelerini koruyacak enerjiye ihtiyaç duyarlar.

Mitokondrileri olmayan eritrositler, oksidatif fosforilasyon ve krebs döngüsü aktivitesine sahip olmadıklarından eritrosit içi enerji üretimi çok sınırlıdır (Aslan, 2002). Gerekli olan enerji, eritrositlerin tek yakıtı olan glukozun glikoliz yolu ile parçalanması sonucu sağlanmaktadır. Şekil 1.7. de görüldüğü gibi eritrosit glukozunun % 90'ı glikoliz yolunda kullanılır. Reaksiyonda glukoz, laktata parçalanırken 2 ATP elde edilir. Diğer % 10 miktarındaki glukoz, pentoz fosfat yoluna girerek redüktif sentezlerde kullanılan NADPH ve pentoz fosfatları meydana getirir. Pentoz fosfat yolunda glukoz 6-fosfat dehidrogenaz ve 6-fosfoglukonat dehidrogenazın kataliz ettiği oksidatif tepkimeler sonucu NADPH üretilir (Aslan, 2002). Eritrosit içi gerçekleşen tüm bu reaksiyonlar sonucu oluşan NADPH ile birlikte NADH ve ATP; hemoglobin demirinin indirgenmesinde, hücre içi membranlardaki –SH (tiyol) gruplarını oksidasyona karşı korumada, hücre ve membranın yapı bütünlüğünü korumada, okside glutatyonu glutasyon redüktaz enzimi varlığında redükte glutatyonu indirgenmesi reaksiyonunda, hücre içi iyon bütünlüğünü korumada ve pentoz fosfat yolu için NADP+'yı rejenere etmede kullanılır. Pentoz fosfat yolunun aktivitesini uyaran oksidan ilaçlar, enzim eksikliği veya yetersiz GSH durumunda hemoglobinin oksidasyonuna sebep olmaktadır. Okside olan hemoglobin denatüre olur ve heinz cisimcikleri halinde çökerek membrana yapışır ve bu durum eritrosit membranının parçalanmasına sebep olmaktadır.

Organizmanın diğer dokularında olduğu gibi glutatyonu indirgenmiş halde tutabilmek için NADP+'ya bağımlı malat dehidrogenaz gibi alternatif NADPH kaynaklarına sahip olmayan eritrositler, oksidan strese (ilaçlar, infeksiyon) pentoz fosfat yolundaki enzim eksikliklerine bağlı olarak hemoliz olmaktadır. Bundan dolayı eritrositler düşük stabiliteli enzim varyantlarına karşı özellikle savunmasızdırlar (Champe ve Harvey, 1997).

2.6.4. Eritrositlerde Pentoz Fosfat Yolu ve Önemi

Eritrositler kemik iliğinde kök hücrelerden olgunlaşmaları esnasında nükleus, ribozom ve mitokondri gibi organellerini kaybederler. Mitokondrileri olmadığı için eritrositlerde enerji üretimi çok sınırlıdır. Oksidatif fosforilasyon ve krebs döngüsü aktiviteleri olmadığı için enerji ihtiyacını glikolitik yoldan sağlamaktadır. Oksidatif stress altında olmayan eritrositlerde glukozun % 90 kadarı Embden – Mayerhof yolu ile piruvat ve laktata parçalanmaktadır. Bu olay sırasında net 2 ATP elde edilmektedir. Eritrositlerin iyonik dengesinin sağlanması için Na^+ - K^+ ATPaz sisteminde, membran yapısının korunması ve eritrositlerin bikonkav şeklinin korunması için bu enerjiye ihtiyaç duyulmaktadır (Yalın ve ark., 2002; Onar, 2002; Akkuş, 1995).

Pentoz fosfat yolu ile NADPH ve pentoz fosfatlar sağlanmaktadır. NADPH üretimi GSH metabolizmasında rol oynadığı için eritrositler için hayati önem taşımaktadır. Oksijen ve türevleri hemoglobini methemoglobine dönüştürmekte ve ayrıca moleküller oksijen, membran lipitlerinde aktivitesi yüksek peroksitler oluşturmaktadır. Pentoz fosfat yolunda üretilen NADPH, eritrositlerin oksidatif hasara karşı korunmasında kullanılmaktadır (Yalın ve ark., 2002; Onar, 2002; Akkuş, 1995).

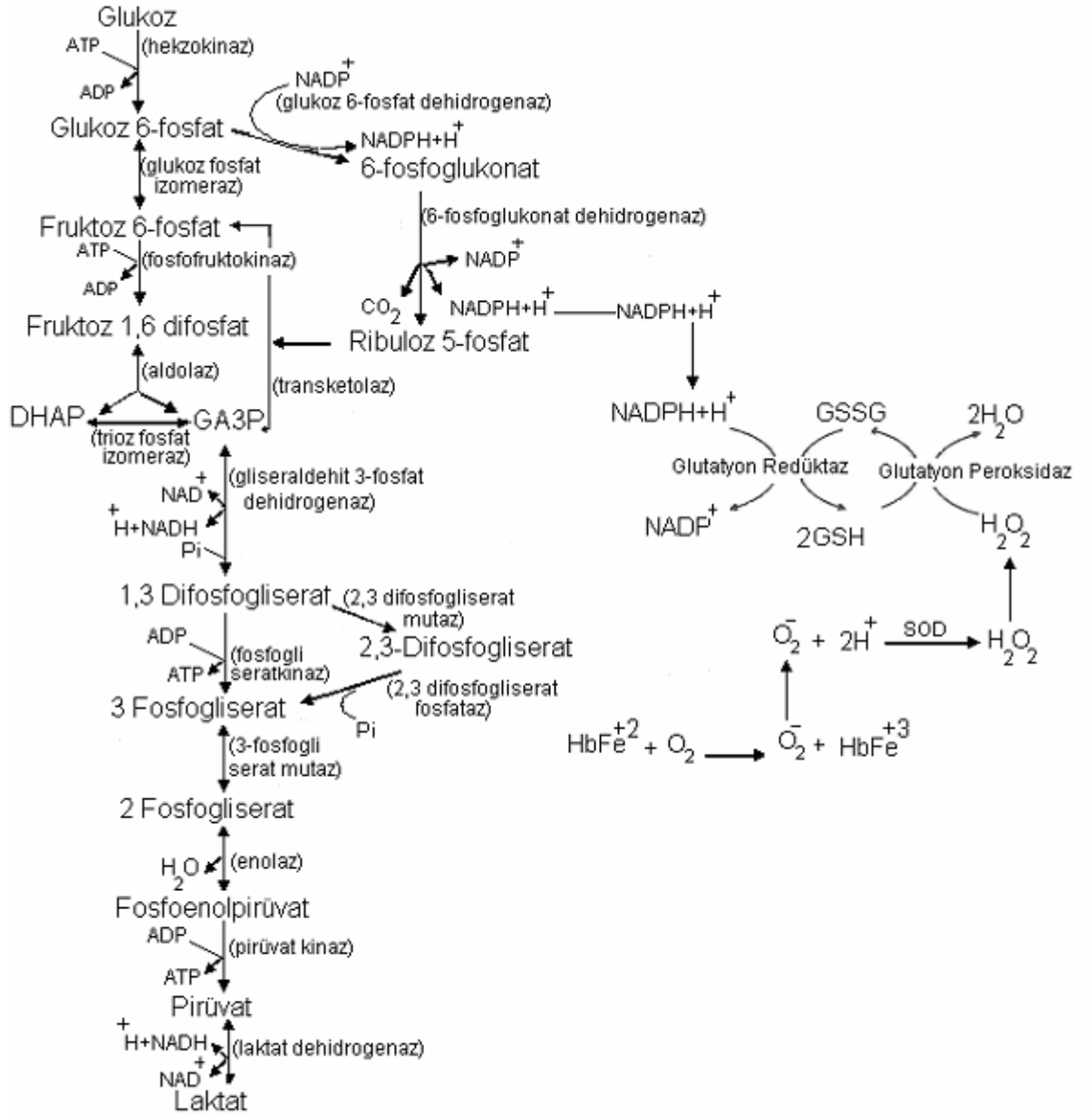
Eritrositlerde hemoglobinin oksijene ilgisini Rapoport–Luebering döngüsü düzenlemektedir. Glikolitik yolda 1 mol ATP üretilen fosfogliserat kinaz tepkimesinin atlandığı yolda bisfosfogliseratmutaz tarafından katalizlenen tepkime ile eritrositlere özgü olan 2,3- difosfogliserat elde edilmektedir. Allosterik etkileyici olarak etki gösteren 2,3-difosfogliserat, hemoglobinin oksijene affinitesini düzenlemektedir. Eritrositlerde Na^+ - K^+ ATPaz sistemi ile 3 Na^+ un hücre dışına çıkarılmasına 2 K^+ ve 1 Cl^- un hücre içine alınması sırasında 1 ATP harcanmaktadır (Yalın ve ark., 2002; Onar, 2002; Keskin, 2001; Akkuş, 1995).

Peroksitler normalde, bir tripeptit olan GSH' ın redüksyonu ile inaktive olurlar. Birçok hücrede bol miktarda bulunan GSH' da serbest bir tiyol grubu bulunur ve bu grup oksidatif strese karşı koruyucu görev görür. GSH'ın kolay okside olma özelliğinden dolayı redükte silfidil grupları $-\text{SH}$ taşıyan bazı enzimlerin, hücre zarının ve hemoglobinin otooksidasyonundan korunarak, yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü sağlanır (Onar, 2002; Keskin, 2001; Serteser,1999; Akkuş, 1995).

GSH serbest -SH grubunu sisteinden almıştır. Bir proteinin iki tiyol grubu okside olacak olursa, bu protein GSH tarafından enzimatik olmayan reaksiyonla redükte edilebilir. Yani GSH, -SH grubunu okside olan proteine vererek, proteinlerdeki sistein -SH gruplarının redükte durumda tutulmasına yardımcı olmaktadır (Onar, 2002; Keskin, 2001; Serteser,1999; Akkuş, 1995).

Hücre zarında bulunan bazı enzimler hidrojen peroksit gibi ajanlarla okside olurlarsa GSH, -SH grubunu proteine vererek oksidatif stresi önler. GSH peroksitlerin redüksiyonunu sağlar. Lipid peroksidasyonunu selenyum içeren GPx (glutasyon peroksidaz) eritrosite oluşan peroksit gruplarını zararsız hidroksil gruplarına çevirirken, GSH indirgenmektedir. Tripeptid yapısındaki GSH'ın methemoglobin ve peroksitlerin indirgenmesi sırasında disülfitle bağlı okside glutatyona (GSSG) yükseltgenmektedir. GSSG'ın tekrar kullanılabilmesi için NADPH'a bağlı GPx ile indirgenmesi ve GSH'a dönüşmelidir. Pentoz fosfat yolunun birinci basamağında G6PD enzimi aracılığıyla NADPH üretilir ve bu GSSG'ın GSH'a dönüşümünü katalize eden Glutasyon redüktaz tarafından gerekli Hidrojeni NADPH molekülünden alarak GSSG'ye transfer eder. Normal şartlarda glutasyonun % 99.8 i redükte formda (GSH), sadece % 0.2 si okside formdadır (GSSG). G6PD enziminin G6P'ı 6-fosfoglukonolaktana dönüştürmesi sırasında G6P'nın 1. karbonundaki hidrojen NADP'ye aktarılarak NADPH oluşturulur. NADPH, GSH'ın sağlanması için glutasyon redüktazın koenzimi olarak çalışır. G6PD eksikliğinde, hücrenin redüktif kaynağı olan NADPH üretiminde bozukluk olacağından hücrede oksidatif stres oluşur.

Pentoz fosfat yolunda NADPH'ın sürekli üretilmesi ile GSH dönüşümünün sürdürülmesi eritrositlerin yaşam sürecinde hayati bir öneme sahiptir (Yalın ve ark., 2002; Onar, 2002; Aslan, 2002; Keskin, 2001; Serteser,1999; Akkuş, 1995).



Şekil 1.7. Eritrositlerdeki başlıca glüköz metabolizma yolları

2.7. Membran Transport sistemleri

Hücre zarında bulunan taşıma mekanizmaları ile hücre için gerekli maddelerin hücre içine alınarak hücrenel faaliyetlerde kullanılması sağlanır ve hücrede oluşan atık ve toksik maddelerin hücre dışına atılması sağlanır. İyon ve moleküllerin hücre içinde ve dışında belirli konsantrasyonlarda tutulması da taşıma mekanizmaları aracılığıyla yapılmaktadır (Palacin ve ark., 1998). Hücre dışından hücreye madde alımı endositoz, hücre dışına madde taşınımı ekzositoz olarak adlandırılır (Noyan, 2000).

Enerji gereksinimi olmaksızın maddelerin konsantrasyonun fazla olduğu taraftan, az olduğu tarafa doğru hareketine basit difüzyon denir. Basit difüzyon sadece küçük ve nispeten nonpolar moleküllerin taşınımını sağlar (Berker, 2002; Lehninger ve ark., 1993). Maddelerin hücre içi konsantrasyonu eşit oluncaya kadar basit difüzyon devam eder (Noyan, 2000). Bunun nedeni iç kısmının hidrofobik olmasıdır (Lehninger, 2005).

Bazı maddeler membrandan, basit difüzyonla taşınamayacak kadar büyük ve polar özelliğe sahiptir. Bu maddelerin membran geçişi proteinler aracılığıyla olmaktadır. Membranda taşıma işini proteinlere transporterlar veya permeazlar adı verilir. Taşıyıcı proteinler bir yada daha fazla maddeye bağlanırlar ve konformasyonel değişikliğe uğrayarak maddeyi membranın bir tarafından diğer tarafına transfer ederler. Kanal proteinleri ise konformasyonlarında değişim olmadan membran içinde hidrofilik kanallar oluşturarak maddelerin membrandan geçişini sağlarlar (Milton ve Sarer, 2000).

CO₂ ve H₂O gibi moleküller geçirgenlik katsayılarına bağlı olarak hücre içine ve dışına geçişleri olmaktadır. Taşıyıcı sistemler çevresel değişimlere rağmen hücre içindeki yakıt moleküllerinin, metabolitlerin, Cl⁻, Na⁺, K⁺, Ca⁺² ve PO₃⁻ gibi önemli iyonların sabit değerde kalmasını sağlamakla da görevlidir (Pamuk, 2000). Bu iyonlar (Cl⁻, Na⁺, K⁺, Ca⁺² ve PO₃⁻) membran içerisinde bulunan kanal proteini tarafından taşınmaktadır. İyonların membranın bir tarafından diğer tarafına geçişi elektriksel gradient farkına dayalı olmaktadır. Membranın iki tarafı arasında elektriksel potansiyel meydana gelir. Ligand kapılı kanallarda hücre içi ve hücre dışı küçük moleküller allosterik taşıyıcı bir proteine bağlanır, bu bağlanmaya bağlı olarak kanallar açılır ya da kapanır (Lehninger, 2005).

Hücre dışı ve içi arasındaki osmotik basıncın ayarlanması sonucu hücre hacmi sabit tutulması sağlanır (Pamuk,2000).

Kolaylaştırılmış taşınım da termodinamik açıdan ikiye ayrılır. Bunlar Pasif kolaylaştırılmış taşınım ve aktif kolaylaştırılmış taşınımdır. Gerek pasif gerek aktif taşınımında taşıyıcı proteine ihtiyaç vardır. Pasif taşınımında enerji gerekmez, ancak aktif taşınım konsantrasyon–yük gradientine karşı yapıldığından enerji gerekir. Taşıyıcı proteinler taşınacak madde için seçicilik özelliği gösterir (Berg ve ark., 2002; Pamuk, 2000). Taşıyıcılar bağlantılarını difüzyonla zarda dönmek suretiyle kanalcıklar oluşturarak veya konformasyonel değişikliğe uğrayarak karşı tarafa geçirirler. Pasif taşınımında madde konsantrasyon farkına göre her iki yönde taşınabilir.

Aktif taşıma yapan sistemlerde taşıyıcı, zarda özel bir yerleşim sonucu taşıma işlemini belli bir yönde yapar. Bu şekildeki aktif taşımayı üçe ayırabiliriz.

Uniport taşıma : Her defasında bir molekül bir yönde taşınır.

Simport taşıma : Taşıyıcı aynı anda iki molekülü aynı anda taşır.

Antiport taşıma : Taşıyıcı aynı anda iki molekülü zıt yönde taşır (Onat ve ark., 2002; Milton ve Sarer, 2000; Pamuk, 2000).

ATP hidroliziyle çalışan transport proteinleri ATPaz yada ATPaz pompaları olarak isimlendirilirler. Hücre membranından madde geçişi sırasında üç farklı enzim grubu iyon taşınımı için ATP ile beraber çalışmaktadır. Bunlar ATPaz'ın P, V ve F sınıf enzimleridir. Bu grup enzimler hücre iç ve dış kısımları arasındaki elektrokimyasal farklılığa bağlı olarak iyon taşınımında görev alırlar (Öztaş,2000).

Hayvansal hücrelerde hücre içi K^+ seviyesi oldukça yüksek ve sabit konsantrasyonda tutulurken Na^+ seviyesi düşüktür. Hücre içinde K^+ seviyesinin yüksek kalması enerji harcanarak Na^+ iyonlarının dışarı pompalanması ve yerine K^+ iyonlarının geçmesi ile sağlanır. Na^+ ve K^+ iyonları çok yavaş olmakla beraber zardan difüze olabildiklerinden bu gradientin korunması Na^+ - K^+ ATPaz ile sağlanır (Pamuk, 2000).

Na^+ - K^+ ATPaz $\alpha_2\beta_2$ alt birimlerinden oluşur. α alt birimi ATP' nin hidrolizini sağlar. Bu işlem sırasında hücre zarında 2 K^+ iyonu hücre içine doğru pompalanırken, 3 Na^+ iyonu da hücre dışına doğru pompalanır. Bu da sodyum potasyum dengesinin korunmasında çok önemlidir (Öztaş, 2000). α alt birimi büyük alt birimdir ve üzerinde Na^+ , K^+ , ATP ve bağlandığında enzimi inhibe eden Quabin'in bağlanacağı bölgeler

vardır. Küçük alt birim olan β , siyalik asit, glikoz, galaktoz ve diğer heksozları içeren periferik bir glikoproteindir.

Na^+ - K^+ Pompası hücre içi ve dışı arasındaki ozmatik dengenin sağlanmasında, hücre hacminin sabit kalmasında, hücre içi bazı enzimler için seviyesinin yüksek tutulmasında ve sinir impluslarının iletiminde kullanılır (Pamuk, 2000).

Hayvansal hücrelerde sitoplazmik Ca^{+2} ayarlanması oldukça karmaşık bir olaydır. Ca^{+2} iyonları kasların kasılması, nörotransmitlerin salgılanması ve glikojen yıkımının uyarılmasında görev alırlar. Hücre içinde Ca^{+2} konsantrasyonu düşüktür. Yüksek olması durumunda önemli bir enerji taşıyıcısı olan fosfat iyonlarının çökmesine sebep olur. Bundan dolayı Ca^{+2} nin konsantrasyonun yüksek olduğu hücre dışına pompalanması Ca^{+2} -ATPaz tarafından gerçekleştirilir (Pamuk, 2000). Bu yolla Ca^{+2} -ATPaz, hücrelerdeki kalsiyum konsantrasyonunun azaltılmasını sağlar, bu enzim hücre zarında yerleşik halde bulunur. Kas hücrelerinde bunun tersine Ca^{+2} -ATPaz, Ca^{+2} iyonlarını sitozolden sarkoplazmik retikuluma pompalar ve kalsiyum pompası her ATP hidrolizinde Mg^{+2} katalizörlüğünde 2 Ca^{+2} iyonu taşır. Kalmodulin Ca^{+2} -ATPaz'ın allosterik aktivasyonunu sağlar ve hücreden Ca^{+2} salınımını artırır (Noyan, 2000).

ATPaz'ın V ve P sınıfı enzimleri daima proton taşınımında görev alırlar. V sınıfı ATPaz'lar, bitki ve mantar vakuollerinde düşük pH seviyesinin korunmasına yardımcı olurlar. Hayvanlarda ise lizozomlar, endozomlar, golgi vakuülleri ve salgı granüllerinin iç kısımlarının asidik özelliklerinin korunmasını sağlar (Öztaş, 2000; Lehninger ve ark., 1993).

F sınıfı ATPaz' lar bakteri, mitokondri ve kloroplastlardaki enerji ATP hidrolizi ile gerçekleşir. Ancak daha sonra, ATP hidrolizinin tersine; ADP ve P' den ATP yeniden sentezlenir. Bu rol içerisinde, F tipi ATPaz daha uygun olarak ATP sentetaz olarak isimlendirilir (Lehninger ve ark., 1993).

2.8. Memeli Hücrelerinde Amino Asit Transport Sistemleri

Hücre için gerekli olan amino asitlerin plazma membranından hücre içine alınımı ve tekrar hücre dışına transferi bu amino asitlere özgü transport sistemleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Amino asit transport sistemleri bu iyonik besinlerin hücreye girişine aracılık ederek bu besinlerin hayati önem taşıyan hücresel faaliyetlerde

kullanılmasını sağlar. Nörotransmitter, sinaptik modülatör yada nörotransmitter öncülü olarak etki gösteren spesifik amino asitlerin plazma membranıyla taşınımı ve sinaptik yarıktan yeniden alınımı bunların hücre dışı konsantrasyonlarının belirli bir aralıkta kalmasını ve bu öncüllerin merkezi sinir sisteminde kaynak teşkil etmesini sağlamaktadır (Christensen, 1993; 1990; 1982; Smith ve Cooper, 1992).

Amino asitlerin plazma membranından taşınımları proteinler aracılığıyla olmaktadır. Proteinler amino asitleri tanır, onlara bağlanır ve amino asitleri hücre dışından hücre içine alır. Bu konuda yapılan çalışmalardan sonra memeli hücrelerinde özellikle eritrosit, hepatosit ve fibroblastlarda farklı substrat spesifitesine sahip transport sistemleri tanımlanmış ve bunların genel özellikleri açıklanmıştır. Bu özellikler stereospesifite (transport L-steroisomer için daha hızlıdır) ve geniş substrat spesifitesi (çeşitli amino asitler bir transport sistemini paylaşırlar). Amino asit transportunun asıl fonksiyonunun belirlenmesinde amino asidin tipi (asidik, bazik, zwitteriyonik) transportun termodinamik özellikleri temel kriter olarak kabul edilmiştir (Palacın ve ark., 1998).

Yapılan fonksiyonel çalışmalar, transportun doygunluğunu, substrat spesifitesini, kinetik hareketini, enerji kullanımını, çeşitli organlardaki düzenleme mekanizmalarını, izole edilmiş hücreler ve saflaştırılmış plazma membranlarında çok sayıda transport faaliyeti tespit edilmiştir (Christensen, 1990;1985; Bannaı ve ark., 1984).

2.8.1. Zwitteriyonik Amino Asitler İçin Transport Sistemleri

Zwitteriyonik amino asitlerin taşınımında 2 grup sistem tanımlanmıştır. Zwitteriyonik amino asitler için ortak sistemler olan A, ASC ve L sistemleri bütün hücrelerde mevcuttur. Sistem A ve ASC küçük yan zincirli amino asitlerin sodyumla simport taşınmasına ve sistem L büyük yan zincirli amino asitlerin uniport taşınmasına aracılık etmektedir (Christensen, 1990).

Sistem A için tercih edilen substratlar alanin, serin ve glutamin sistem ASC için ise alanin, serin ve sisteindir (Christensen, 1965). Sistem L'nin L₁ ve L₂ olmak üzere iki alt tipi mevcuttur. Bunlar farklı yaşlarda hepatosit ve hepatoma hücrelerinde bulunurlar. Buna göre zwitteriyonik amino asitler pek çok hücrede Na ile birlikte

taşınmaz. Epitel hücrelerinde geniş spesifiteli sistemler Na' un elektriksel gradientine bağlı olarak bu amino asitleri toplarlar. N- metilenmiş amino asitlerin transportu, sistem A' nın ayırımı için önemli bir ölçüttür. Sodyuma bağlı alanin transportunun N- metilaminobütirik asit tarafından inhibisyonu sistem A aktivitesinin belirlenmesi için kullanılmaktadır. Sistem A ve ASC farklı özelliklere sahiptir. Sistem A elektrojeniktir ve trans – inhibisyon özelliği gösterir. Sistem ASC elektronötral olabilir ve trans – stimülasyon özelliği gösterir (Guidotti ve Gazzola, 1992). Sistem A pH' a duyarlıyken sistem ASC kısmen duyarlıdır.

Zwitteriyonik amino asitlerin transportu için tanımlanan sistemlerden ikincisi, dokuya özgül sistemlerdir. L- Glutamin, L- histidin ve L- Asparajin amino asitlerinin hepositlere transportunun N adı verilen sodyuma bağlı transport sistemiyle gerçekleştirilmektedir (Kilberg ve ark., 1980). Sistem A'ya benzer özellikte sistem N iskelet kaslarında keşfedilmiş olup N^m olarak adlandırılmıştır (Hundal ve ark., 1987).

Sistem Gly, glisin ve sarkozin için özel olup, birçok hücre tipinde bulunur (Eavenson ve Christensen, 1967). Nörotransmitterlerin sodyum ve klorid bağımlı taşıyıcılarından GLYT₁ ve GLYT₂ sistem Gly'nin varyantları olarak kabul edilmektedir. Sistem BETA; β- alanin , taurin ve GABA için spesifik bir transport sistemi olup birçok dokuda tanımlanmıştır ve bu hücrelerde farklı substrat affinitesi ve spesifitesi gösterir (Miyamoto ve ark., 1990). Nörotransmitterlerin sodyum ve klorid bağımlı taşıyıcılarından GAT1–3, BGT–1 ve TAUT sistem BETA'ın varyantları olarak düşünülmektedir.

Epitel hücrelerine özgül çeşitli zwitteriyonik transport sistemleri tanımlanmıştır. Bağırsak fırçamsı kenar hücrelerinin membranlarında nötral amino asitlerin taşınımına aracılık eden sodyuma bağlı bir transport sistemi bulunmaktadır (Palacın ve ark., 1998). Bu sistem ilk olarak NBB olarak adlandırılmış daha sonra geniş spesifiteli sistemlere uygunluğu nedeniyle sistem B olarak yeniden adlandırılmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, sığırların böbrek fırçamsı kenar hücrelerinin membranlarında nötral amino asitlerin sodyuma bağlı transportunu gerçekleştiren bir sistem keşfedilmiş ve bu sistem B⁰ olarak adlandırılmıştır (Lynch ve Mcgivan, 1987). Bu sistemlerin zwitteriyonik amino asitlerin bağırsaklarda emiliminden ve böbreklerde geri emiliminden sorumlu oldukları düşünülmektedir. Sistem IMINO, böbrek, bağırsak ve epitelyum hücrelerinde keşfedilmiştir. Prolin, hidroksiprolin ve N- metil glisin gibi

amino asitler için özgül olup bu amino asitlerin sodyuma bağlı transportunu gerçekleştirir.

2.8.2. Katyonik Amino Asit Transport Sistemleri

Katyonik amino asitlerin alınma aracılık eden beş adet transport sistemi tanımlanmıştır. Bu sistemlerin aktivitesi zwitteriyonik amino asitlerle paylaşım kapasitesine ve sodyuma bağılıkları ile katyonik amino asitlere karşı olan affinitelerine göre ayırt edilmektedir (Closs, 1996).

Sistem y^+ yüksek affiniteli katyonik amino asitlerle, düşük affiniteli zwitteriyonik amino asitlerin sodyum varlığında transportunu sağlar. Sistem y^+L insan eritrositlerinde keşfedilmiş olup (Deves ve ark., 1992) ayrıca plasentada tanımlanmıştır (Eleno ve ark., 1994; Fei ve ark., 1995). Sistem y^+L farklı dokular arasında yaygın bir dağılım gösterir. Bundan dolayı insan fibroblastlarında da tespit edilmiştir (Palacın ve ark., 1998). Sistem y^+L katyonik amino asitleri hücre dışı ortamda sodyuma gereksinim duymadan yüksek affinite ile transport etmektedir. Küçük ve büyük zwitteriyonik amino asitleri sodyum varlığında yüksek affinite ile transport etmektedir. Sodyum yokluğunda zwitteriyonik amino asitleri düşük affinite ile transport etmektedir. Sistem y^+ ve y^+L aktiviteleri eritrosit ve plasentada N-etylmaleimid ile muamele edilerek ayırt edilebilmektedir. Sistem y^+ ve y^+L çok yüksek trans stimülasyon kapasitesi gösterir. Sistem y^+ katyonik amino asitlerin plazma membranından giriş çıkışını dengeler. Birçok çalışmada oositlerde 4F2hc yüzey antijeni ile sistem y^+L transport aktivitesi tespit edilmiştir (Ruiz ve ark., 2003).

Sistem B^{0+} , b^{0+} , ve b^+ ilk olarak fare blastosistlerinde keşfedilmiştir. Embriyonik sodyumdan bağımsız olan sistem b^+ katyonik amino asitler için transport aktivitesine sahiptir. Sistem B^{0+} , b^{0+} katyonik ve zwitteriyonik amino asitler için yüksek affiniteli geniş bir spesifite gösterir (Palacın ve ark., 1998).

2.8.3. Anyonik Amino Asit Transport Sistemleri

Birçok hücrede biriktirilen (nöronlar, glial hücreler, hapotositler, enterositler, fibroblastlar, ve plasenta trofoblastları) L-Glutamat ve L-Aspartat, yüksek affiniteli

sodyum ve potasyum bağılı sistem X_{AG}^- tarafından transport edilir (Palacın ve ark.,1998; Guidotti ve Gazzola, 1992). Bu sistem aspartat amino asidinin D ve L stereoizomerleri için belirli bir affinite gösterir. Özellikle hepatositler, fibroblastlar ve embriyonik hücreler L- glutamat ve L- sistin sodyumdan bağımsız X_C^- antiport sistem aracılığıyla transport ederler. Bu sistem 100- 200 μ M oranında bir Km değerine sahip olup, stans stimülasyon özelliği gösterir (Guidotti ve Gazzola, 1992). Glutatyon sentezinin desteklenmesi için gerekli sistin giriş-çıkışı ve hücrelerin oksidatif hasardan korunması, oksidatif stresin indüklendiği X_C^- yoluyla olmaktadır.

2.9. Memelilerin Boşaltım Sistemleri

Vücutta iç ortamın düzenlenmesi işi birçok organ tarafından sağlanır. Hücre varlığını devam ettirebilmek için bulunduğu otamdan devamlı olarak madde alış verişinde bulunmaktadır. Hücre metabolizması işlevi esnasında meydana gelen bazı maddeler hücreden uzaklaştırılmazsa, vücut dengesini bozar. Hücrenin çalışmamasına hatta ölümüne sebep olan metabolizma artıkları çeşitli yollarla ve organlar aracılığıyla ya zararsız hale getirilmekte yada dışarı atılmaktadır. Boşaltım işlevinin büyük kısmını böbrekler sağlamaktadır (Demirsoy, 1993).

Böbrekler idrar çıkararak organizmada metabolizma artıklarının atılmasını, su ve elektrolit dengesinin düzenlenmesini, ekstraselüler sıvıların kristalloid osmotik basıncının normal sınırlarda tutulmasını, toksik maddelerin atılmasını ve kan pH' nın sabit tutulmasını sağlayarak iç hemostazinin korunmasını sağlar (Bozkırlı, 1999, Aksoy, 1976).

Dış ortamdan alınan besinler, organizma için gerekli enerjiye dönüşürken bir takım zararlı maddeler ortaya çıkmaktadır. Protein metabolizmasında bu durum çok önemlidir. Böbrekler metabolizma atıklarının dışarı atıldığı ve sıvı tuz dengesinin sağlandığı yerdir (Bear, 1964; Romer ve Porsond, 1986; Tanyolaç ve Tanyolaç, 1990).

Böbrekler karın boşluğunda, karın arka duvarında, bel omurlarının iki yanında 12. göğüs ve 1. ve 2. bel omurları arasında yapışık dururlar. Sağ böbrek sola göre 1-2 cm aşağıdadır. Her böbreğin bel omurlarına bakan kenarlarında pelvis olarak adlandırılan bir çukurluk vardır (Mcewen, 1949, Kuru, 1990).

Böbrek dışta korteks ve içte medulla olmak üzere iki bölüme ayrılabilir. Medullada 10-18 adet medüller piramit yer alır. Her medüller piramitin tabanında kortekse uzanan birbirine paralel tübül demetleri, modüller ışın böbreğin işlev gören birimleri olan nefron grubunun, düz kısımları ile birlikte bir yada daha çok sayıda toplayıcı kanaldan oluşur.

Böbrekler nefron adı verilen yapılardan oluşmaktadır. Her böbrek 1-4 milyon nefron içerir. Nefron böbreğin en küçük fonksiyonel ünitesidir. Glomerül, proksimal tübül, henle kulbu, distal tübül ve toplayıcı kanaldan oluşur. Toplayıcı kanallar birleşerek renal kaliksleri oluşturur (Junqeria ve Ark., 1998).

Glomerül, değişik hücrelerden oluşmuş özelleşmiş bir kapiller ağdır. Tek sıra halinde bulunan endotel hücreleri birbirleriyle temas halinde olmasına rağmen birçok por içerir. Kapiller kan ve glomerüler filtrat arasında bulunan bazal mambran plazmanın serbest geçişine izin verir.

Glomerülerde günde 180 litre plazma ultrafiltratı oluşturulur. Bu filtrat içeriği plazma proteinleri hariç kana benzer (Noyan, 2000)..

Bowman kapsülü, proksimal tübülün başlangıcını oluşturur. Tübülü oluşturan epitel hücreler yüzey alanını genişletmek için milyonlarca mikrovillüse sahiptir. Proksimal tübül, glomerüler filtratın % 60-80 ni, süzülen Na^+ ve Cl^- % 70' ni, K, glukoz, bikarbonat, fosfat ve sülfatın çoğunun ve hidrojen iyonun % 90'nın geri emildiği bölümdür (Noyan, 2000).

Henle kulbu, inen ince, çıkan ince ve çıkan kalın olmak üzere 3 kısımdan oluşur. Bu üç kısmın hücreleri benzerdir ancak su geçirgenliklerinde farklılık vardır. Glomerül, afferent ve efferent arteriol ile ilişkilidir. Buradaki özel hücrelere makule densa denir. Henle kulbunda orijinal filtrattaki suyun % 25'i, Na^+ ve Cl^- un % 20-25'nin geri emilimi yapılır (Noyan, 2000).

Distal tübül, makule densadan başlayan toplayıcı kanal sistemidir. Na^+ - K^+ ATPaz ve karbonik anhidraz aktivitesi vardır. Distal tübülde antidiüretik hormon (ADH) aracılığıyla suyun ve aldosterona bağlı Na^+ un geri emilimi yapılır (Noyan, 2000).

Toplayıcı kanallar, kortekste sekiz distal tübül birleşerek medullaya iner, en alt kısımda böbrek papillasının ucundan pelvise açılır. Bu tübüllere toplayıcı kanallar denir. Toplayıcı sistemde ADH aracılığıyla suyun aldosteron aracılığıyla Na^+ un geri emilimi yapılır.

Üreter, böbrekten aşağıya uzanan iki adet tübüldür. Yaklaşık 25 cm olup 4 yerde darlık gösterir. Peristaltik hareketlerle idrar aşağıya akar (Snell, 1998).

Nefronun tübül kısımları, özellikle proksimal kıvrımlı tübüller filtrat içindeki vücut metabolizmasında yararlı olan maddeleri emer, bu sayede iç ortamdaki dengenin devamını sağlar. Tübüller aynı zamanda idrarla atılan belli zararlı maddeleri kandan tübül lümenine aktarır. Toplayıcı kanallar, belli koşullar altında suya geçirgen hale gelerek kan plazmasında daha hipertonic olan idrarın konsantrasyonunu artırır. Bu yolla organizma suyunu, intraselüler sıvısını ve osmatik dengesini kontrol eder (Aktaç, 1993; Barlas ve Kolankaya, 1996).

Böbrek medullalarındaki interstisyel sıvının ozmolaritesi çok daha yüksektir, gittikçe artarak medullanın pelvik ucunda 1200-1400 mOsm/L'ye kadar ulaşır. Bu durum renal medulla interstisyumunda erimiş maddelerin sudan daha fazla biriktiğini ifade eder.

Renal medullada madde konsantrasyonunun oluşturulmasına katkıda bulunan dört faktör vardır.

- 1- Henle kıvrımının çıkan kolunun kalın kısmından, sodyumun aktif taşınmasıyla potasyum, klor ve diğer iyonların birlikte taşınmayla medüller interstisyuma taşınması.
- 2- Toplayıcı kanallardan medulla interstisyumu içine iyonların aktif taşınması
- 3- İç medulla toplayıcı kanallardan medulla interstisyumu içine büyük miktarda ürenin pasif difüzyonu
- 4- Medüller tübüllerden medüller interstisyuma, geri emilen sölütlere oranla daha az miktarda su difüzyonu olması.

Yüksek medulla osmolaritesinin en önemli nedeni henle kıvrımının kalın çıkan kolundan sodyumun aktif olarak, potasyum, klorür ve diğer iyonların birlikte taşınmasıyla interstisyum içine transportudur. Kalın çıkan kol suyu hiç geçirmediği için, erimiş maddelerin interstisyum içine pompalanmasına osmotik su akışı eşlik etmez. Bu sayede, çıkan koldan dışarı sodyum ve diğer iyonların aktif taşınması, sudan çok daha fazla erimiş maddenin renal medulla interstisyumuna ilave olmasına neden olur. Henle kıvrımının, suya geçirgen olmayan, çıkan ince kolunda renal medulla interstisyumu erimiş madde konsantrasyonunu daha da yükselten pasif sodyum geri emilimidir.

Çıkan kolun tersin, henle kıvrımının inen kolu suya çok geçirgendir ve tübüler sıvı osmolaritesi renal medulla osmolaritesiyle hızlı bir şekilde eşitlenir. Bundan dolayı henlenin inen kolundan renal medulla interstisyum içine su difüzyonla dışarı itilir ve tübüler sıvı osmolaritesi henle kıvrımının ucuna doğru kademeli olarak yükselir.

Bu olay sürekli olarak tekrarlandığında, net etki, sudan çok daha fazla erimiş katı maddelerin artarak medullaya geçişidir. Bu işlem basamak basamak erimiş maddeleri medullada tutar ve henle kıvrımının kalın çıkan kolundan dışarı iyonların aktif pompalanması ile oluşturulan konsantrasyon gradientini çoğaltarak sonuçta interstisyel sıvı osmolaritesini 1200- 1400 mOsm/L'ye yükseltir (Guyton, 2000; Noyan 1998).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

L-sistin, L-aspartik asit, L-glutamik asit, sükröz, 5,5'-dithiobis (nitrobenzoate) (DTNB), 1- kloro-2,4 dinitrobenzen (CDNB), Buthionin sülfoksimin (BSO) (Sigma Chemical Co.St. Louis, Missouri, U.S.A). Deneylerde kullanılan kan, SSK Hastanesi kan bankasından, sağlıklı vericilerden 300 ml'lik üniteler şeklinde elde edilmiştir.

Spektrofotometrik ölçümler için, Shimatzu 1200 spektrofotometre cihazı kullanılmıştır.

Eritrositlerin Hazırlanması:

Sağlıklı insanlardan alınan heparinize kan, 2500 g de 5 dak. santrifüj edilerek plazma ve eritrositler birbirinden ayrılmıştır. Plazma ve beyaz kan hücrelerini ihtiva eden tabaka ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Elde edilen eritrosit yığını üç defa iki hacim 8 mM glukoz içeren potasyum-fosfat- tuz tamponuyla (PBS) (9 hacim 0.15 M NaCl 1 hacim 0,1 M potasyum fosfat buffer, pH 7,4) yıkanmış ve deneylerde kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

DENEY 1: Eritrositlerde izoosmolar ortamda, L-sistin girişi

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları:

1. % 0.9'lük NaCl (1 lt)
2. Potasyum fosfat tamponu (0.1 M, pH 7.4)
3. Potasyum fosfat tuz tamponu(9 kısım 0.15 M NaCl, 1 kısım 0.1 M potasyum fosfat tamponu, pH 7.4)
4. 8 mM glukoz içeren potasyum-fosfat-tuz tamponu (pH 7.4)
5. KREBS-fosfat Ringer tamponu (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)

6. 20 ml hacimde 0.5 mM ve 1 mM L-sistin içeren Krebs Ringer fosfat tampon (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
7. 10'lukTCA(Trikloroasetik asit) 100 ml
8. 2 ml, 0,6 µmol / ml DTNB (2.5 ml metanolde çözülmüş)
9. Tris EDTA tamponu (pH 8.9)

DENEY 2: Eritrositlerde sistin-sistein döngüsü

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları:

1. 8 mM glukoz (C₆H₁₂O₆) içeren potasyum fosfat tuz tamponu (pH 7.4)
2. 20 ml hacimde 310 mOsm/L Krebs Ringer fosfat tamponu (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
3. 20 ml hacimde 1mM L-sistin içeren 310 mOsm/L Krebs Ringer fosfat tamponu (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
4. 20 ml hacimde 1200 mOsm/L Krebs Ringer fosfat tamponu (579.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4).
5. 20 ml hacimde 1 mM L- sistin içeren 1200 mOsm/L Krebs Ringer fosfat tamponu (579.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4).
6. 20 ml hacimde 1250 mOsm/L Krebs Ringer fosfat tamponu (604.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
7. 20 ml hacimde 1 mM L- sistin içeren 1250 mOsm/L Krebs Ringer fosfat tamponu (604.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4).
8. 20 ml hacimde 1300 mOsm/L Krebs ringer fosfat tamponu (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)

9. 20 ml hacimde 1 mM L- sistin içeren 1300 mOsm/L Krebs Ringer fosfat tamponu (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
10. 2 ml, 0,6 µmol/ml DTNB(5,5'-Dithiobis (-nitrobenzoate) 2,5ml (metanolde çözülmüş halde)
11. Tris ETDA tamponu (pH 8.2)

DENEY 3: Eritrositlerde, sistin konsantrasyonunun, sistin-sistein döngüsüne etkisi

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları:

1. 8 mM glukoz içeren potasyum-fosfat-tuz tamponu (pH 7.4)
2. 20 ml hacimde Krebs ringer fosfat tamponu (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
3. 20 ml hacimde 0.25, 0.5 ve 1 mM L-sistin içeren Krebs ringer fosfat tamponu (629.5 mMNaCl , 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
4. Tris ETDA tamponu (pH 8.2)
5. 2 ml 0,6 µmol/ml DTNB (5,5'-Dithiobis (-nitrobenzoate)) 2.5 ml metanolde çözülmüş

DENEY 4: Eritrositlerde hiperosmolar ortamada L-sistin girişi

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları:

1. 8 mM glukoz içeren potasyum-fosfat-tuz tamponu (pH 7.4)
2. 20 ml hacimde Krebs ringer fosfat tamponu (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
3. 20 ml hacimde 1 ve 3 mM L-sistin içeren Krebs ringer fosfat tamponu (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
4. % 10'luk 100 ml TCA (Trikloroasetik asit)

5. Tris ETDA tamponu (pH 8.9)
6. 2 ml 0,6 $\mu\text{mol/ml}$ DTNB (5,5'-Dithiobis (-nitrobenzoate)) 2.5 ml metanolde çözülmüş

DENEY 5: Eritrositlerde sistin-sistein döngüsünün enerjiye bağıllığı

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları:

1. 8 mM glukoz içeren potasyum-fosfat-tuz tamponu (pH 7.4)
2. 20 ml hacimde Krebs ringer fosfat tamponu (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
3. 20 ml hacimde 0.5mM ve 1 mM L-sistin içeren Krebs ringer fosfat tamponu (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
4. .20 ml hacimde 0.5 mM ve 1 mM L-sistin içeren glukozlu Krebs ringer fosfat tamponu (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
5. 20 ml hacimde 0.5 ve 1 mM L-sistin içeren glukozsuz Krebs ringer fosfat tamponu (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
6. Tris ETDA tamponu (pH 8.2)
7. 2 ml 0,6 $\mu\text{mol/ml}$ DTNB (5,5'-Dithiobis(-nitrobenzoate)) 2.5 ml metanolde çözülmüş.

DENEY 6: Eritrositlerde sistin-sistein döngüsüne sıcaklığın etkisi

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları:

1. 8 mM glukoz içeren potasyum-fosfat-tuz tamponu (pH 7.4)
2. 20 ml içeren Krebs ringer fosfat (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄ pH 7.4)

3. 20 ml 0.5 ve 1 mM L-sistin içeren Krebs ringer fosfat (629.5 mM NaCl , 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
4. Tris ETDA tamponu (pH 8.2)
5. 2 ml 0,6 µmol/ml DTNB (5,5'-Dithiobis (-nitrobenzoate)) 2.5 ml metanolde çözülmüş

DENEY 7: Eritrositlerde glutamat ve aspartat'ın sistin-sistein döngüsüne etkisi

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları:

1. 8 mM glukoz içeren potasyum-fosfat-tuz tamponu (pH 7.4)
2. 20 ml Krebs ringer fosfat (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
3. 20 ml 1 mM L-sistin içeren Krebs ringer fosfat (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
4. 20 ml 1 mM L-sistin ve 1mM glutamat içeren Krebs ringer fosfat (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
5. 20 ml 1 mM L-sistin ve 1mM Aspartat içeren Krebs ringer fosfat (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
6. Tris ETDA tamponu (pH 8.2)
7. 2 ml 0,6 µmol/ml DTNB (5,5'-Dithiobis- (nitrobenzoate)) 2.5 ml metanolde çözülmüş

DENEY 8:Eritrositlerde,CDNB ile ön inkübasyonun sistin-sistein döngüsüne etkisi

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları:

1. 8 mM glukoz içeren potasyum-fosfat-tuz tamponu (pH 7.4)
2. 20 ml Krebs ringer fosfat tamponu (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)

3. 2 mM CDNB içeren Krebs ringer fosfat fosfat (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM , CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
4. 2 mM CDNB + BSO içeren Krebs ringer fosfat tamponu (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM , CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
5. 20 ml 1 mM L-sistin içeren Krebs ringer fosfat fosfat (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)
6. Tris ETDA tamponu (pH 8.2)
7. 2 ml 0,6 µmol/ml DTNB (5,5'-Dithiobis-(nitrobenzoate)) 2.5 ml metanolde çözülmüş

DENEY 9: Eritrositlerde, sükröz hiperosmolaritesi ve sistin-sistein döngüsü

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları:

1. 8 mM glukoz içeren potasyum-fosfat-tuz tamponu (pH 7.4)
2. 20 ml Krebs ringer fosfat tamponu (135.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, 990 mM sükröz, pH 7.4)
3. 20 ml 1mM L-sistin içeren Krebs ringer fosfat tamponu (135.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, 990 mM sükröz, pH 7.4)
4. Tris ETDA tamponu (pH 8.2)
5. 2ml 0,6 µmol/ml DTNB (5,5'-Dithiobis- (nitrobenzoate)) 2.5 ml metanolde çözülmüş

3.2.YÖNTEM

Çalışmamız dokuz aşamadan oluşmaktadır;

1. Aşamada, eritrositlere izoozmolar ortamda sistin girişi gözlenmiştir.
2. Aşamada, eritrositlerde sistin – sistein döngüsü gözlenmiştir.
3. Aşamada, eritrositlerde, sistin konsantrasyonunun, sistin-sistein döngüsüne etkisi incelenmiştir.
4. Aşamada, eritrositlere hiperozmolar ortamda, L-sistin girişi gözlenmiştir.
5. Aşamada, eritrositlerde sistin-sistein döngüsünün enerjiye bağıllığı incelenmiştir.
6. Aşamada, sistin-sistein döngüsünün sıcaklığa bağıllığı incelenmiştir
7. Aşamada, glutamat ve aspartat'ın sistin-sistein döngüsüne etkisi gözlenmiştir.
8. Aşamada, CDNB ile ön inkübasyonun sistin-sistein döngüsüne etkisi incelenmiştir.
- 9.Aşamada, eritrositlerde sükröz hiperosmolaritesi ve sistin-sistein döngüsü gözlenmiştir

DENEY 1: Eritrositlerde izoozmolar ortamda, L-sistin girişi

Deneylerde sağlıklı vericilerden elde edilen heparinize insan kanı kullanılmıştır. Kan, potasyum- fosfat-tuz tamponu (9 kısım 0,15 M NaCl 1 kısım 0,1 M potasyum fosfat, 8 mM glukoz, pH 7.4) ile üç kez yıkanarak hazırlanmıştır. Bu işlemde sonra içinde 0.5 mM, ve 1 mM L-sistin içeren 310 mOsm/L Krebs ringer fosfat (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4) tamponundan 1000 µl, hazırlanmış eritrosit stokundan 250 µl alınarak ependorf tüplere koyulmuştur. Kontrol gurubu olarak 1000 µl Krebs ringer fosfat tamponu ve 250 µl kan içeren ependorf tüpler kullanılmıştır. Ependorf tüpleri yavaşça alt üst edilmiş ve 37 °C' de 30, 60, 120 ve 240 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra eritrositler 5 dakika 2500 g' de santrifüj edilmiştir ve süpernatanttan 500 µl alınarak 1450 µl Tris-EDTA tamponuna (pH 8.2) ilave edilmiş ve 50 µl DTNB (5,5'Dithiobis -nitrobenzoate) karışım üzerine ilave edilmiştir. Kör olarak 1500 µl Tris EDTA tamponu ve 500 µl kontrol süpernatantı kullanılmıştır.

Örnekler bir süre renk değişimi için bırakılmış ve daha sonra spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Serbest –SH konsantrasyonları 13.1 ekstinksiyon katsayısı (bir maddenin 1 molar konsantrasyonunun verilen dalga boyunda yaptığı absorbans değeri) kullanılarak hesaplanmıştır.

DENEY 2: Eritrositlerde sistin-sistein döngüsü

Kan, potasyum- fosfat-tuz tamponu (9 kısım 0,15 M NaCl 1 kısım 0,1 M potasyum fosfat, 8 mM glukoz, pH 7.4) ile üç kez yıkanarak hazırlanmıştır. Sistin – sistein döngüsünde kullanılan tampon ozmolariteleri sırasıyla; 310 mOsm/L (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4) , 1200 mOsm/L (579.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4), 1250 mOsm/L (604.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4) , 1300 mOsm/L (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4) ‘ dir. Bu işlemden sonra içinde 1mM L-sistin içeren sırasıyla 310 mOsm/L, 1200 mOsm/L, 1250 mOsm/L, 1300 mOsm/L, Krebs ringer fosfat tamponu 1000µl, hazırlanmış eritrosit stokundan 250 µl alınarak ependorf tüplere koyulmuştur. Kontrol grubu olarak 1000 µl sırasıyla 310 mOsm/L, 1200 mOsm/L, 1250 mOsm/L, 1300 mOsm/L, Krebs ringer fosfat tamponu ve 250 µl kan içeren ependorf tüpleri kullanılmıştır. Ependorf tüpleri yavaşça alt üst edilmiş ve 37 °C ‘de 120 ve 240 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra eritrositler 5 dakika 2500 g’ de santrifüj edilmiştir ve supernatanttan 500 µl alınarak 1450 µl Tris-EDTA tamponuna (pH 8.2) ilave edilmiş ve 50 µl DTNB (5,5’Dithiobis -nitrobenzoate)) karışım üzerine ilave edilmiştir. Kör olarak 1500 µl Tris EDTA tamponu ve 500 µl kontrol süpernatantı kullanılmıştır.

Örnekler bir süre renk değişimi için bırakılmış ve daha sonra spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Serbest –SH konsantrasyonları 13.1 ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

DENEY 3: Eritrositlerde, sistin konsantrasyonunun, sistin-sistein döngüsüne etkisi

Kan, potasyum- fosfat-tuz tamponu (9 kısım 0,15 M NaCl 1 kısım 0,1 M potasyum fosfat, 8 mM glukoz , pH 7.4) ile üç kez yıkanarak hazırlanmıştır. Bu işlemden sonra içinde 0.25, 0.5 ve 1 mM L-sistin içeren Krebs ringer fosfat (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4) tamponundan 1000 µl, hazırlanmış eritrosit stokundan 250 µl alınarak ependorf tüplere koyulmuştur. Kontrol gurubu olarak 1000 µl Krebs ringer fosfat tamponu ve 250 µl kan içeren ependorf tüpleri kullanılmıştır. Ependorf tüpleri yavaşça alt üst edilmiş ve 37 °C 'de 120 ve 240 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra eritrositler 5 dakika 2500 g' de santrifüj edilmiştir ve supernatanttan 500 µl alınarak 1450µl Tris-EDTA tamponuna (pH 8.2) ilave edilmiş ve 50 µl DTNB (5,5'Dithiobis -nitrobenzoate) karışım üzerine ilave edilmiştir. Kör olarak 1500 µl Tris EDTA tamponu ve 500 µl kontrol süpernatantı kullanılmıştır.

Örnekler bir süre renk değişimi için bırakılmış ve daha sonra spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Serbest –SH konsantrasyonları 13.1 ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

DENEY 4: Eritrositlerde hiperozmolar ortamada, L-sistin girişi

Kan, potasyum- fosfat-tuz tamponu (9 kısım 0,15 M NaCl 1 kısım 0,1 M potasyum fosfat, 8 mM glukoz, pH 7.4) ile üç kez yıkanarak hazırlanmıştır. Bu işlemden sonra içinde 1 ve 3mM L-sistin içeren Krebs ringer fosfat tamponundan 1000µl, hazırlanmış eritrosit stokundan 250 µl alınarak ependorf tüplere koyulmuştur. Kontrol gurubu olarak 1000 µl Krebs ringer fosfat tamponu ve 250 µl kan içeren ependorf tüpler kullanılmıştır. Ependorf tüpleri yavaşça alt üst edilmiş ve 37 °C de 120 ve 240 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminden sonra eritrositler 5 dakika 2500 g.' de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Daha sonra deney ve kontrol gurupları 1000 µl potasyum fosfat tuz tamponuyla bir defa yıkandıktan sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan eritrosit yığını 250 µl % 10'luk TCA (Trikloroasetik asit) ile muamele edilmiştir. Böylece eritrosit hücreleri parçalanmıştır.

Parçalan eritrositler 10000 g' de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjleme işleminden sonra süpernatant kısmından 100 µl alınarak 1850 µl Tris-EDTA tamponuna (pH 8.9) ilave edilmiş ve 50 µl DTNB (5,5'Dithiobis -nitrobenzoate) karışım üzerine ilave edilmiştir. Kör olarak 1900 µl Tris EDTA tamponu ve 100 µl kontrol süpernatantı kullanılmıştır.

Örnekler bir süre renk değişimi için bırakılmış ve daha sonra spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Serbest -SH konsantrasyonları 13.1 ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

DENEY 5: Eritrositlerde sistin-sistein döngüsünün enerjiye bağlılığı

Kan, potasyum- fosfat-tuz tamponu (9 kısım 0,15 M NaCl 1 kısım 0,1 M potasyum fosfat, 8 mM glukoz, pH 7.4) ile üç kez yıkanarak hazırlanmıştır. Bu işlemde sonra içinde 0.5 ve 1mM L-sistin içeren glukozlu Krebs ringer fosfat (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4) ve 0.5 ve 1 mM L-sistin içeren glukozsuz Krebs ringer fosfat (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4) tamponundan 1000 µl, hazırlanmış eritrosit stokundan 250 µl alınarak ependorf tüplere koyulmuştur. Kontrol gurubu olarak 1000 µl Krebs ringer fosfat tamponu (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4) ve 250 µl kan içeren ependorf tüpler kullanılmıştır. Ependorf tüpleri yavaşça alt üst edilmiş ve 37 °C de 120 ve 240 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminden sonra eritrositler 5 dakika 2500 g' de santrifüj edilmiş ve supernatanttan 500 µl alınarak 1450 µl Tris-EDTA tamponuna (pH 8.2) ilave edilmiş ve 50 µl DTNB (5,5'Dithiobis -nitrobenzoate) karışım üzerine ilave edilmiştir. Kör olarak 1500 µl Tris EDTA tamponu ve 500 µl kontrol süpernatantı kullanılmıştır.

Örnekler bir süre renk değişimi için bırakılmış ve daha sonra spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Serbest -SH konsantrasyonları 13.1 ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

DENEY 6: Eritrositlerde sistin-sistein döngüsüne sıcaklığın etkisi

Kan, potasyum- fosfat-tuz tamponu (9 kısım 0,15 M NaCl 1 kısım 0,1 M potasyum fosfat, 8 mM glukoz, pH 7.4) ile üç kez yıkanarak hazırlanmıştır. Bu işlemden sonra içinde 0.5 mM ve 1 mM L-sistin içeren Krebs ringer fosfat (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4) tamponundan 1000 µl, hazırlanmış eritrosit stokundan 250 µl alınarak ependorf tüplere koyulmuştur. Kontrol gurubu olarak 1000 µl Krebs ringer fosfat tamponu ve 250 µl kan içeren ependorf tüpleri kullanılmıştır. Ependorf tüpleri yavaşça alt üst edilmiş ve 4, 20 ve 37 °C 'de 120 ve 240 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra eritrositler 5 dakika 2500 g' de santrifüj edilmiştir ve supernatanttan 500 µl alınarak 1450 µl Tris-EDTA tamponuna (pH 8.2) ilave edilmiş ve 50 µl DTNB (5,5'-Dithiobis - nitrobenzoate) karışım üzerine ilave edilmiştir. Kör olarak 1500 µl Tris EDTA tamponu ve 500 µl kontrol süpernatantı kullanılmıştır.

Örnekler bir süre renk değişimi için bırakılmış ve daha sonra spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Serbest -SH konsantrasyonları 13.1 ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

DENEY 7 :Eritrositlerde glutamat ve aspartat'ın sistin-sistein döngüsüne etkisi

Kan, potasyum- fosfat-tuz tamponu (9 kısım 0,15 M NaCl 1 kısım 0,1 M potasyum fosfat, 8 mM glukoz, pH 7.4) ile üç kez yıkanarak hazırlanmıştır. Bu işlemden sonra içinde 1mM L sistin içeren Krebs ringer fosfat tamponu (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4), 1 mM L-sistin ve 1 mM glutamat içeren Krebs ringer fosfat (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4), 1 mM L-sistin ve 1 mM aspartat içeren Krebs ringer fosfat (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4), tamponlarından 1000 µl, hazırlanmış eritrosit stokundan 250 µl alınarak ependorf tüplere koyulmuştur. Kontrol gurubu olarak 1000 µl Krebs ringer fosfat tamponu ve 250 µl kan içeren ependorf tüpleri kullanılmıştır. Ependorf tüpleri yavaşça alt üst edilmiş ve 37 °C 'de 120 ve 240 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra

eritrositler 5 dakika 2500 g' de santrifüj edilmiştir ve supernatanttan 500 µl alınarak 1450 µl Tris-EDTA tamponuna (pH 8.2) ilave edilmiş ve 50 µl DTNB (5,5'Dithiobis - nitrobenzoate) karışım üzerine ilave edilmiştir. Kör olarak 1500 µl Tris EDTA tamponu ve 500 µl kontrol süpernatantı kullanılmıştır.

Örnekler bir süre renk değişimi için bırakılmış ve daha sonra spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Serbest -SH konsantrasyonları 13.1 ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

DENEY 8: Eritrositlerde, CDNB ile ön inkübasyonun sistin-sistein döngüsüne etkisi

Kan, potasyum- fosfat-tuz tamponu (9 kısım 0,15 M NaCl 1 kısım 0,1 M potasyum fosfat, 8 mM glukoz, pH 7.4) ile üç kez yıkanarak hazırlanmıştır. 2 mM CDNB içeren PBS -glukoz tamponundan 1000 µl, hazırlanmış eritrosit stokundan 250 µl alınarak ependorf tüplere koyulmuştur. 2 mM CDNB +BSO içeren PBS -glukoz tamponundan 1000 µl, hazırlanmış eritrosit stokundan 250 µl alınarak ependorf tüplere koyulmuştur. Kontrol grubuna PBS–glukoz tamponundan 1000 µl, hazırlanmış eritrosit stokundan 250 µl konulmuştur. Kontrol grubu CDNB ile muamele edilmemiştir. Ependorf tüpleri yavaşça alt üst edilmiş ve 37 °C 'de 40 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminden sonra eritrositler 5 dakika 2500 g.' de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Daha sonra deney ve kontrol gurupları 1000 µl potasyum fosfat tuz tamponuyla bir defa yıkandıktan sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Ependorflara 1 mM L-sistin içeren Krebs ringer fosfat (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4) tamponundan 1000 µl eklenmiştir. Ependorf tüpleri yavaşça alt üst edilmiş ve 37 °C de 120 ve 240 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminden sonra eritrositler 5 dakika 2500 g' de santrifüj edilmiş ve supernatanttan 500 µl alınarak 1450 µl Tris-EDTA tamponuna (pH 8.2) ilave edilmiş ve 50 µl DTNB (5,5'Dithiobis - nitrobenzoate) karışım üzerine ilave edilmiştir. Kör olarak 1500 µl Tris EDTA tamponu ve 500 µl kontrol süpernatantı kullanılmıştır.

Örnekler bir süre renk değişimi için bırakılmış ve daha sonra spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Serbest –SH konsantrasyonları 13.1 ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

DENEY 9: Eritrositlerde, sükroz hiperosmolaritesi ve sistin-sistein döngüsü

Kan, potasyum- fosfat-tuz tamponu (9 kısım 0,15 M NaCl 1 kısım 0,1 M potasyum fosfat, 8 mM glukoz, pH 7.4) ile üç kez yıkanarak hazırlanmıştır. Bu işlemden sonra içinde 1mM sükroz içeren Krebs ringer fosfat tamponu (629.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glukoz, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4),) tamponundan 1000 µl, hazırlanmış eritrosit stokundan 250 µl alınarak ependorf tüplere koyulmuştur. Kontrol gurubu olarak 1000 µl Krebs ringer fosfat tamponu ve 250 µl kan içeren ependorf tüpleri kullanılmıştır. Ependorf tüpleri yavaşça alt üst edilmiş ve 37 °C 'de 120 ve 240 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra eritrositler 5 dakika 2500 g' de santrifüj edilmiştir ve supernatanttan 500 µl alınarak 1450 µl Tris-EDTA tamponuna (pH 8.2) ilave edilmiş ve 50 µl DTNB (5,5'Dithiobis -nitrobenzoate) karışım üzerine ilave edilmiştir. Kör olarak 1500 µl Tris EDTA tamponu ve 500 µl kontrol serumu kullanılmıştır.

Örnekler bir süre renk değişimi için bırakılmış ve daha sonra spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Serbest –SH konsantrasyonları 13.1 ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır

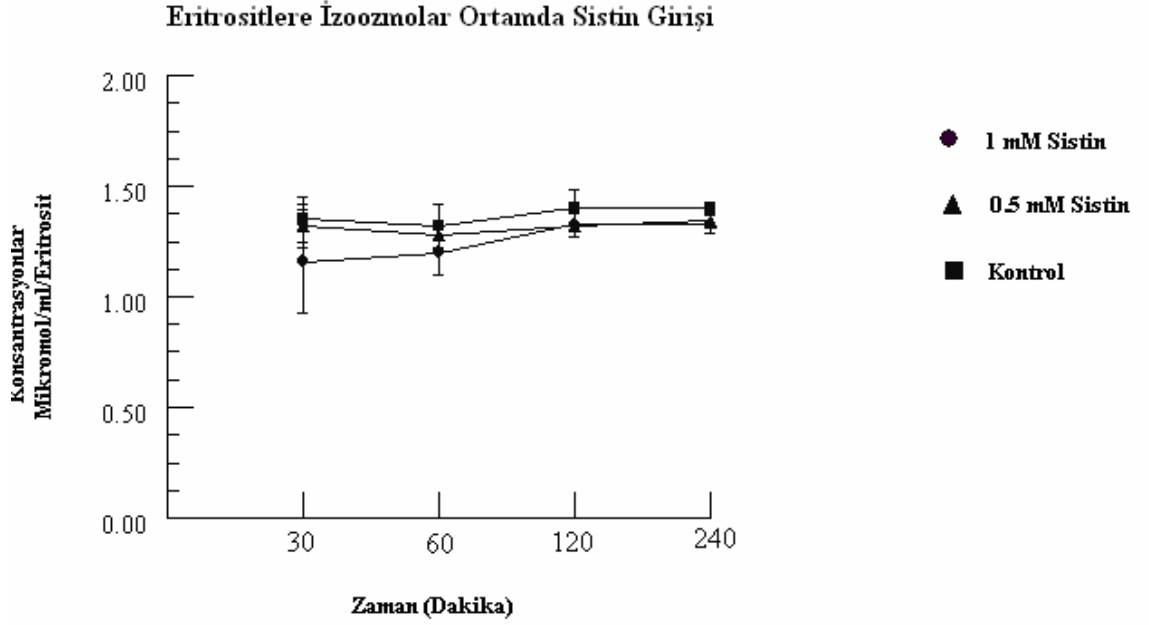
3.2.1. İstatistiksel analizler

Çalışmada Student- Newman-Keuls Multiple Comparasion ve tek yönlü değişim analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Testler, istatistiksel bilgi yöntemine dayalı olarak yürütülmüştür. Tüm testler üçlü örneklerle uygulanmıştır. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve \pm standart sapması olarak verilmiştir ve $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Eritrositlere izoozmolar ortamda sistin girişi olup olmadığını göstermek amacıyla yapılmıştır. Plazma ozmolaritesi yaklaşık olarak 300-310 mOsm/L değerindedir. Eritrositler 310 mOsm/L krebs ringer fosfat tamponunda 0.5 mM ve 1 mM L-sistin varlığında ve yokluğunda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra eritrositler içerisinde serbest –SH düzeyleri ölçüldü. Bu koşullar altında gerçekleştirilen deneyin sonuçları şekil 4.1’ de gösterilmiştir. Şekildeki sonuçlar eritrositlerin, sistini normal plazma şartlarında temin etmediklerini göstermektedir. Hücre içi serbest –SH konsantrasyonları, sistine maruz kalmalarının ardından önemli bir değişiklik göstermez.

Plazma ozmolaritesi yaklaşık olarak 300-310 mOsm/L değerindedir. Ancak böbrek medullasında plazma ozmolaritesi 1200-1400 mOsm/L değerine ulaşabilmektedir (Guyton, 2000). Buda eritrositlerin böbrek medullasından geçerken 1200-1400 değerinde ozmolarite ile karşılaştıklarını gösterir. Böbreklerdeki kan akışı yaklaşık olarak 1.1 litre/dakikadır (Guyton, 2000). Yani yüksek miktarlarda eritrosit her an böbrekteki bu yüksek ozmolarite değerine maruz kalmaktadır. Bundan dolayı eritrositler ve plazma arasında sistin- sistin döngüsünün olup olmadığı eritrositlerin vücutta maruz kaldıkları 310, 1200, 1250 ve 1300 mOsm/L değerlerine sahip krebs ringer fosfat tampon çözeltileri içerisinde denendi. Şekil 4.2’de bu çalışmanın sonucu gösterilmiştir. Şekil incelendiğinde, eritrositler ile ortam arasında, 310 ve 1200 mOsm/L değerlerinde herhangi bir sistin-sistin döngüsünün olmadığı görülmektedir. Ancak ozmolarite 1250 ve 1300 mOsm/L’ye ulaştığında eritrositler ile ortam arasında sistin-sistin döngüsünün oluştuğu gözlenmiştir. 1250 ve 1300 ozmolarite değerlerinde eritrositler dışardan sistin almakta ve bunu içerisinde sistine redükleyerek oluşan sistini dışarı vermektedir. Sonuçlarımız eritrositler ve plazma arasında sistin-sistin döngüsünün böbrek medullasında gerçekleştiğini göstermiştir. Eritrositler böbrek medullasından geçerken 1200-1400 ozmolariteye maruz kalırlar ve bu ozmolarite değerinde eritrositler ile ortam arasında bir sistin-sistin döngüsünün başlatıldığı gösterilmektedir.

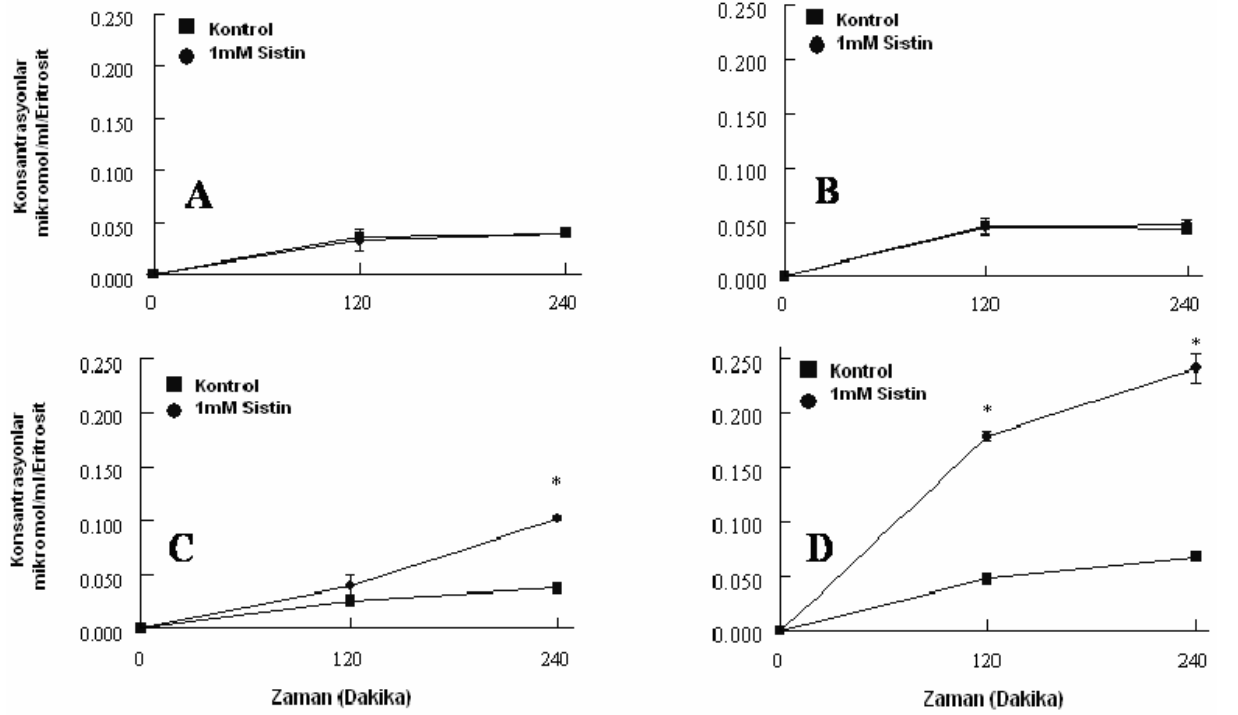


Şekil 4.1: Eritrositler plazmadan ayrıldıktan sonra üç kez üç hacim fosfat tamponuyla yıkandı. Yıkanan eritrositler daha sonra 310 mOsm/L krebs ringer tamponu içinde 0.5 mM veya 1 mM sistin varlığında ve yokluğunda 30, 60, 120 ve 240 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra eritrositler yıkandı ve eritrositlerde serbest –SH düzeyleri ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir

$$p < 0.05$$

* Kontrol grubundan farklı olmayan değer

Eritrositlerde Sistin-Sistein Döngüsü



Şekil 4.2:Sistin-Sistein döngüsü: Eritrositler plazmadan ayrıldıktan sonra üç kez üç hacim fosfat tamponuyla yıkandı. Yıkanan eritrositler daha sonra 1 mM sistin varlığında ve yokluğunda sırasıyla A) 310 mOsm/L, B) 1200 mOsm/L, C) 1250 mOsm/L ve D) 1300 mOsm/L Krebs Ringer tamponu içinde 0, 120 ve 240 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra eritrositler santrifüj edilerek uzaklaştırıldı ve süpernatant da serbest -SH düzeyleri ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$$p < 0.05$$

- Kontrol grubundan önemli derecede farklı değer

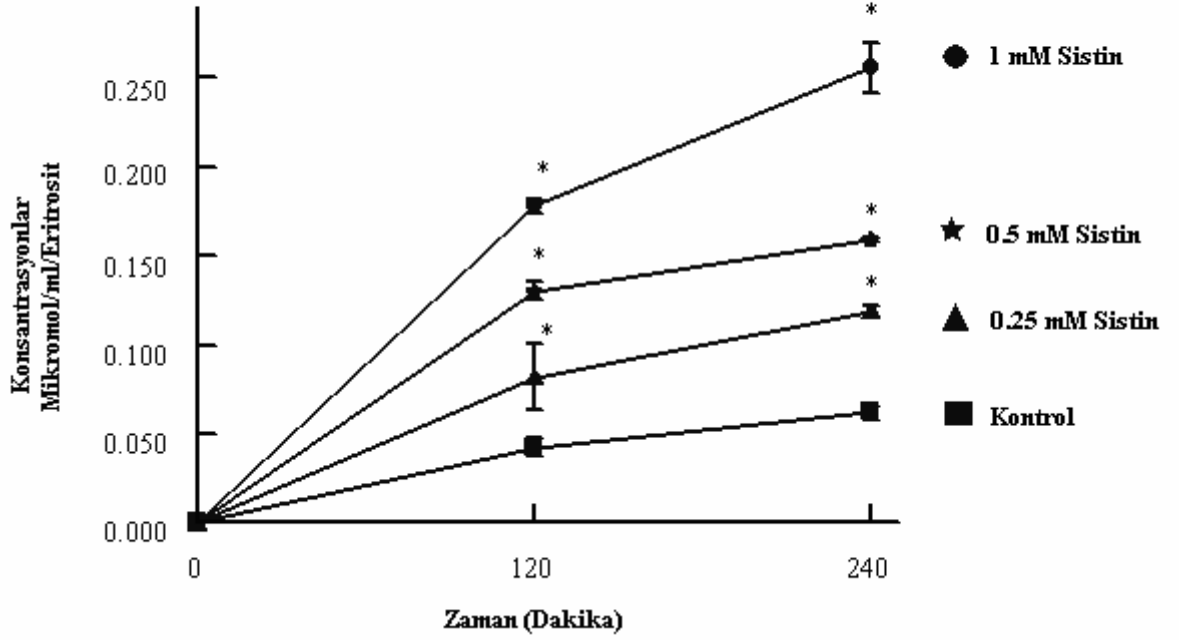
Daha sonraki çalışmalarımızda 1300 mOsm/L'de gerçekleşen sistin-sistein döngüsünün sistin konsantrasyonu ile ilişkisini göstermeye çalıştık. Bu amaç için eritrositler 0.25, 0.5 ve 1 mM sistin içeren krebs ringer fosfat tamponunda inkübe edildi. Şekil 4.3'de bu çalışmanın sonuçları gösterilmiştir. Aldığımız sonuçlardan sistin-sistein döngüsünün aktivitesinin ortamdaki sistin konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiğini göstermektedir. Sistin konsantrasyonu artınca ortamda oluşan sistein miktarının arttığını göstermektedir.

Daha sonraki çalışmalarımız hiperozmolar ortamda eritrositlere sistin girişini göstermek amacıyla yapılmıştır. Eritrositler 1 mM ve 3 mM sistin içeren krebs ringer fosfat tampon çözeltisinde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda eritrositler santrifüj edilerek ayrıldı ve yıkandı. Yıkanan eritrositler içinde serbest -SH değerleri ölçüldü. Deney sonuçları şekil 4.4'de gösterilmiştir. Sonuçlarımıza göre eritrosit içerisindeki serbest -SH düzeylerinin artması, eritrositlerin sistini dışardan temin ettiklerini göstermektedir.

Daha sonraki çalışmalarımız sistin-sistein döngüsünün enerjiye bağımlılığını göstermek amacıyla yapılmıştır. Bu amaç için eritrositler 0.5 mM ve 1 mM sistin varlığında glukoz bulunan ve bulunmayan 1300 mOsm/L krebs ringer fosfat tamponunda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra ortamda serbest -SH düzeyleri ölçüldü. Deney sonuçları şekil 4.5' de gösterilmiştir. Sonuçlarımıza göre glukozsuz ortamda sistin-sistein döngüsü inhibe olur. Glukoz dahil edilmediği zaman ortamdaki serbest -SH düzeyleri kontrol düzeylerine kadar düşer. Bu durum, sistin -sistein döngüsünün enerjiye bağımlı biyolojik olarak aktif bir olay olduğunu göstermektedir.

Daha sonraki çalışmalarımız sistin-sistein döngüsünün sıcaklıktan nasıl etkilendiğini göstermek amacıyla yapılmıştır. Eritrositler bu amaç için 0.5 mM ve 1 mM L- sistin varlığında ve yokluğunda 1300 mOsm/L krebs ringer fosfat tampon çözeltinde 4, 20 ve 37 °C' de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra ortamda serbest -SH düzeyleri ölçüldü. Bu koşullar altında gerçekleştirilen deney sonuçları çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Deney düşük sıcaklıklarda gerçekleştirildiğinde döngünün aktivitesinin düştüğü ve 4 °C de sıfırlandığı görülmektedir.

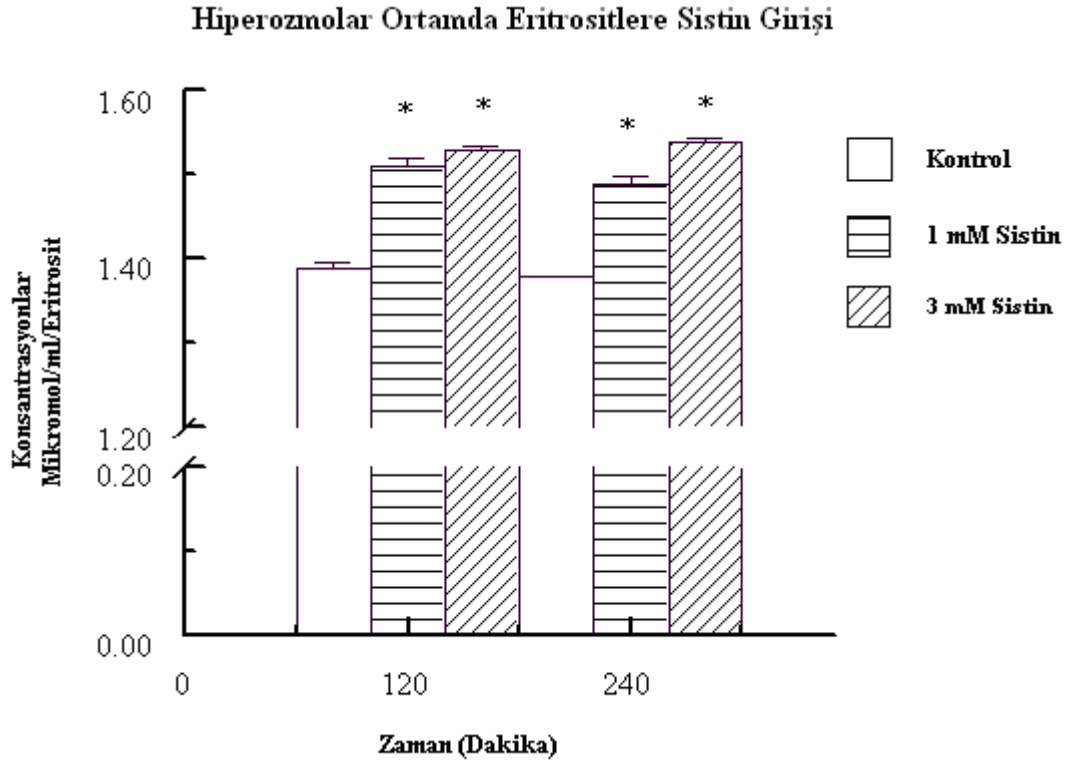
Sistin Konsantrasyonunun Sistin-Sistein Döngüsüne Etkisi



Şekil4.3: Sistin Konsantrasyonu ve Sistin-Sistein döngüsü arasındaki ilişki: Eritrositler plazmadan ayrıldıktan sonra üç kez üç hacim fosfat tamponuyla yıkandı. Yıkanan eritrositler daha sonra 1300 mOsm/L krebs ringer tamponu içinde farklı sistin konsantrasyonları varlığında 120 ve 240 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra eritrositler santrifüj edilerek uzaklaştırıldı ve süpernatant da serbest -SH düzeyleri ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

* Kontrol grubundan önemli derecede farklı değer

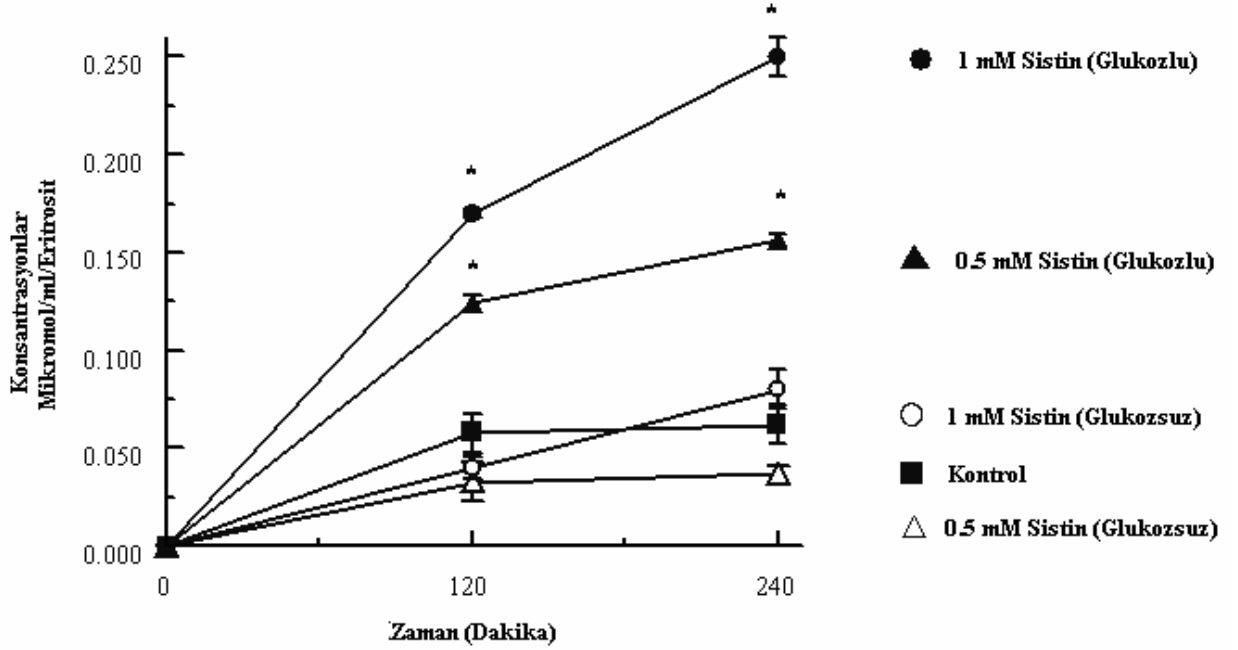


Şekil 4.4: Hiperozmolar ortamda eritrositlere sistin girişi: Eritrositler plazmadan ayrıldıktan sonra üç kez üç hacim fosfat tamponuyla yıkandı. Yıkanan eritrositler daha sonra 1 mM ve 3 mM L- sistin varlığında ve yokluğunda 1300 mOsm/L krebs ringer tamponu içinde 120 ve 240 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra eritrositler yıkandı ve eritrositlerde serbest -SH değerleri ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir

$p < 0.05$

* Kontrol grubundan önemli derecede farklı değer

Sistin-Sistein Döngüsünün Enerjiye Bağımlılığı



Şekil 4.5: Sistin-sistein döngüsünün enerjiye bağımlılığı: Eritrositler plazmadan ayrıldıktan sonra üç kez üç hacim fosfat tamponuyla yıkandı. Yıkanan eritrositler 0.5 mM ve 1 mM sistin varlığında glukoz bulunan ve glukoz bulunmayan 1300 mOsm/L krebs ringer tamponunda 120 ve 240 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra eritrositler santrifüj edilerek uzaklaştırıldı ve süpernatant da serbest -SH düzeyleri ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

* Kontrol grubundan ve glukozsuz gruplardan önemli derecede farklı değer

Sistin-Sistein Döngüsünün Sıcaklığa Bağımlılığı

	Konsantrasyonlar (Mikromol/ml/Eritrosit)					
	120 Dakika			240 Dakika		
	4 °C	20 °C	37 °C	4 °C	20 °C	37 °C
Kontrol	0.00	0.025 ± 0.002	0.045 ± 0.003	0.00	0.033 ± 0.004	0.059 ± 0.005
0.5 mM Sistin	0.00	0.076* ± 0.005	0.120* ± 0.004	0.00	0.108* ± 0.004	0.166* ± 0.003
1 mM Sistin	0.00	0.102 *± 0.004	0.172* ± 0.004	0.00	0.176* ± 0.007	0.257* ± 0.003

Çizelge 4.1: Sistin-sistein döngüsünün sıcaklığa bağımlılığı: Eritrositler plazmadan ayrıldıktan sonra üç kez üç hacim fosfat tamponuyla yıkandı. Yıkanan eritrositler daha sonra 0.5 mM ve 1 mM L- sistin varlığında 4, 20 ve 37 °C de 1300 mOsm/L krebs ringer tamponu içinde 120 ve 240 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra eritrositler yıkandı ve eritrositlerde serbest –SH değerleri ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir

$p < 0.05$

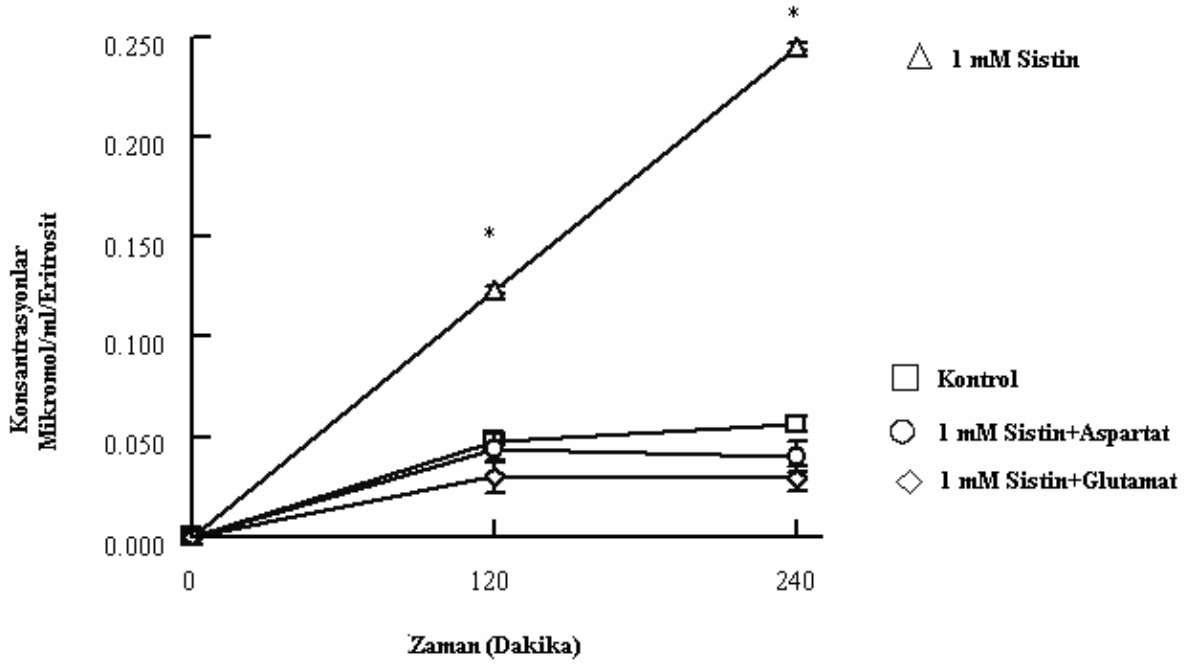
*Kontrol grubundan ve diğer sıcaklık gruplarından önemli derecede farklı değer

Daha sonraki çalışmamız sistin–sistein döngüsünün glutamat ve aspartat amino asitlerinden etkilenip etkilenmediğini göstermek amacıyla yapılmıştır. Sistin, sistin transport eden hücreler tarafından sistem X_{AG} tarafından transport edilmektedir(Mcbean, 2001; Bender, 2000). Sistem X_{AG} glutamat ve aspartat amino asitlerindeki de transport etmektedir. Bu amaç için eritrositler, 1mM sistin, 1 mM sistin + glutamat ve 1mM sistin + aspartat içeren krebs ringer fosfat tampon çözeltilerinde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra ortamda serbest –SH düzeyleri ölçüldü. Bu şartlar altında gerçekleştirilen deneyin sonuçları şekil 4.6’ da gösterilmiştir. Şekil incelendiğinde, aspartat ve glutamat amino asitlerinin varlığının sistin transportunu ve buna bağlı olarakta sistin – sistein döngüsünü inhibe ettiği gözlenmiştir.

Daha sonraki çalışmamız sistin-sistein döngüsünün glutatyona bağlı olup olmadığının gösterilmesi amacıyla yapılmıştır. Bu amaç için eritrositler BSO varlığında ve yokluğunda 2 mM CDNB ile inkübe edildi ve eritrositlerin içindeki glutasyon boşaltıldı. Böylece GSH sentezi inhibe edildi. Bu koşullar altında gerçekleştirilen deneyin sonuçları şekil 4.7’de gösterilmiştir. Şekil incelendiğinde, sistin-sistein döngüsünün gerçekleşmediği görülmektedir. Eritrositlere alınan sistinin, bir elektron verici olan GSH’ ın katıldığı bir reaksiyonla sisteine dönüşmesi sağlanır. Ancak GSH tamamen boşaltılıp tekrar sentezlenmesi engellendiğinden eritrositlere alınan sistin sisteine dönüştürülemediği. Dolayısıyla ortamda serbest –SH kontrol düzeylerinden farklı değildir.

Son çalışmamız sistin-sistein döngüsünün sükrözla elde edilen hiperozmolar tampon çözeltilerde yer alıp almadığını incelemek amacıyla yapılmıştır. Eritrositler bu amaç için sükrözla oluşturulan 1300 mOsm/L krebs ringer fosfat tampon çözeltisi içinde 1 mM sistin varlığında ve yokluğunda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra ortamda serbest -SH düzeyleri ölçüldü. Bu koşullar altında gerçekleştirilen deney sonuçları şekil 4.8’ de gösterilmiştir. İlgili şekil sistin – sistein döngüsünün sükröz hiperozmolar tampon içerisinde de işlevsel olduğunu göstermektedir.

Glutamat ve Aspartatın Sistin-Sistein Döngüsüne Etkisi

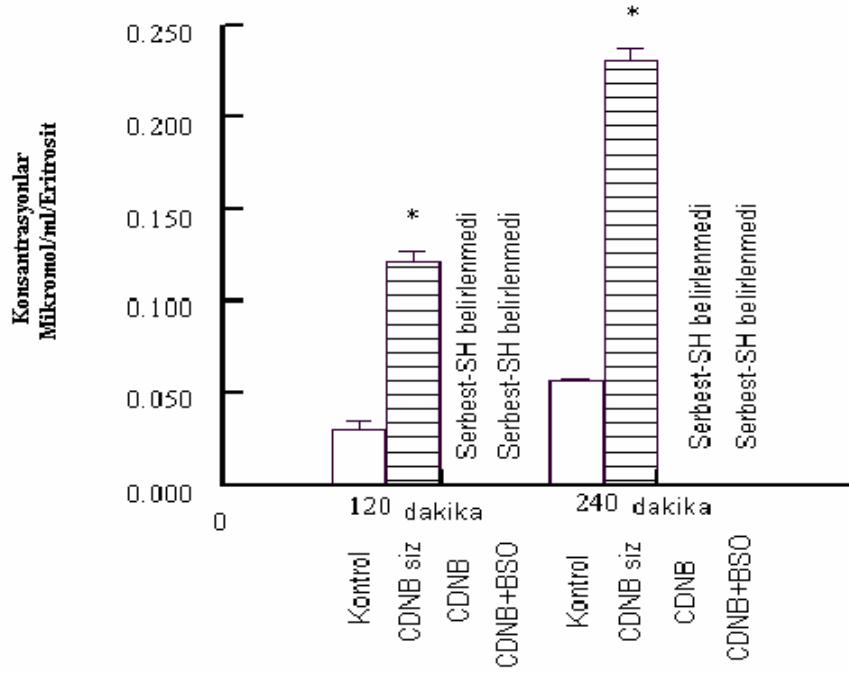


Şekil 4.6: Glutamat ve aspartatın sistin - sistein siklusunun etkisi: Eritrositler plazmadan ayrıldıktan sonra üç kez üç hacim fosfat tamponuyla yıkandı. Yıkanan eritrositler 1 mM sistin ile aspartat veya glutamat varlığında ve yokluğunda 1300 mOsm/L Krebs ringer tamponda 120 ve 240 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra eritrositler santrifüj edilerek uzaklaştırıldı ve süpernatant da serbest -SH düzeyleri ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

* Kontrol ve glutamat yada aspartat içeren gruplardan önemli derecede farklı değer

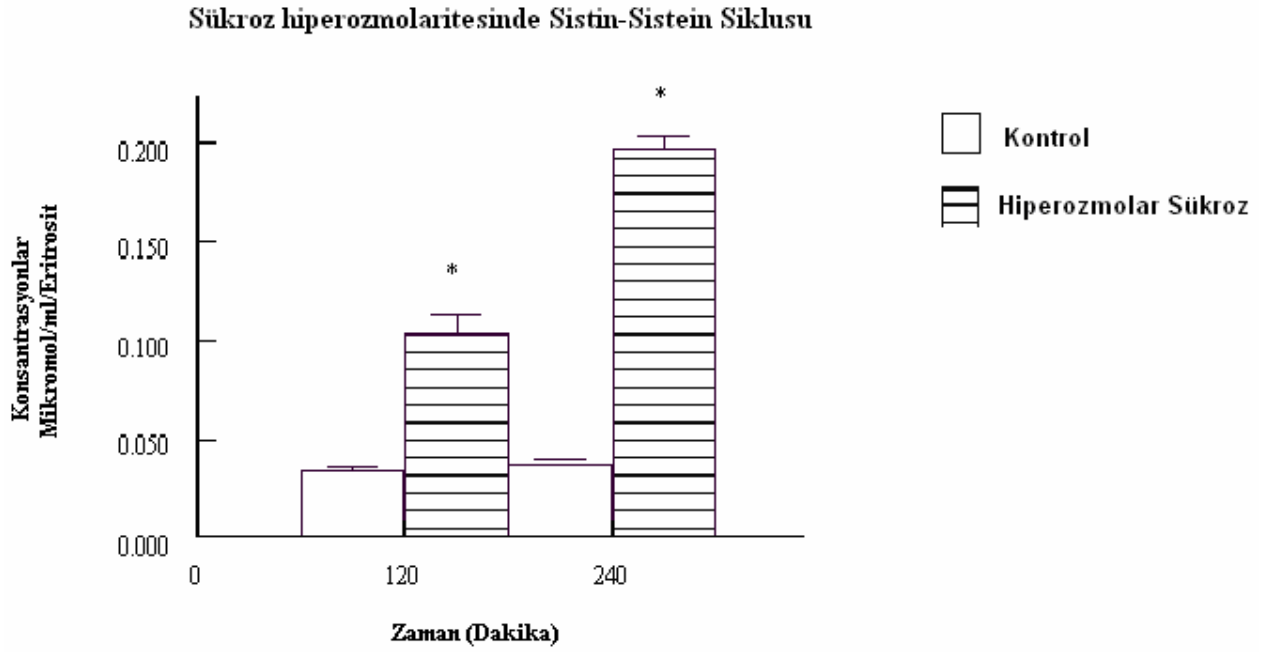
CDNB İle Ön İnkübasyonun Sistin-Sistein Siklusuna Etkisi



Şekil 4.7: CDNB ile ön inkübasyonun sistin–sistein döngüsüne etkisi: Eritrositler plazmadan ayrıldıktan sonra üç kez üç hacim fosfat tamponuyla yıkandı. Yıkanan eritrositler 2 mM CDNB ve BSO varlığında ve yokluğunda 40 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra eritrositler santrifüj edilerek uzaklaştırıldı ve yıkandı. Yıkanan eritrositler kontrol grubu hariç 1 mM sistin içeren 1300 mOsm/L tampon çözeltiye aktarıldı ve 120 ve 240 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra eritrositler santrifüj edilerek uzaklaştırıldı ve süpernatant da –SH düzeyleri ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

* Kontrol ve CDNB' li gruplardan önemli derecede farklı değer



Şekil 4.8: Sükrozla oluşturulan hiperozmolarite ve sistin–sistein siklusu: Eritrositler plazmadan ayrıldıktan sonra üç kez üç hacim fosfat tamponuyla yıkandı.Yıkanan eritrositler sükrozla oluşturulan 1300 mOsm/L krebs ringer tamponunda 1 mM sistin varlığında ve yokluğunda 120 ve 240 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra eritrositler santrifüj edilerek uzaklaştırıldı süpernatant da –SH düzeyleri ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

* Kontrol grubundan önemli derecede farklı değer

4. TARTIŞMA SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın amacı herhangi bir fizyolojik şart altında plazma ve eritrositler arasında sistin–sistein döngüsünün işlevinin olup olmadığını araştırmaktır. Böyle bir sistemin işlevi plazmanın redoks statüsünü düzenlemekten sorumlu olabilen bir mekanizmanın temsilcisidir. Sistin alımı ve ardından sisteine indirgenmesi ve daha sonra ortama sistein olarak salınımı plazmadaki yükseltgenmiş moleküllerin indirgenmesine katkıda bulunuyor olabilir. Eritrositlerden sistein salınımı daha önce çalışılmıştır. Bu, daha önceden işleme tabi tutulmuş eritrositlerin hücre içindeki aşırı sisteini ortama bıraktıklarını göstermiştir (Yıldız ve ark., 2006). Ayrıca, prokaryotik hücrelerin sisteini periplazmaya bıraktıklarını da göstermiştir. E. coli hücreleri periplazmanın redoks statüsünü düzenlemek için sisteini periplazma CydDC taşıyıcılarıyla dışarıya atarlar (Pittman, 2002).

Tüm bunlara ek bir kanıt da sisteinin plazmada zaten hali hazırda bulunan bazı yükseltgenmiş molekülleri indirgendiği savını desteklemektedir. Bu, plazmada bulunan indirgenmiş homosistein miktarının, plazmada bulunan sistein miktarıyla doğrudan bağlantılı olduğunu göstermiştir (Andersson ve ark.; 1999). Bu sayede plazmadaki sistein doğrudan bir şekilde ya yükseltgenmiş molekülleri indirgeyerek ya da plazmadaki bazı serbest radikal atıklarını toplayarak plazmanın redoks statüsünün düzenlenmesiyle alakalı olabilir. İşler haldeki bir sistin–sistein döngüsü aynı zamanda plazmadaki sistin konsantrasyonunun artmasını engelleyen bir mekanizma gibi de çalışabilir ve bu da sistin çökmesine engel olur ve mekanik endotelyal hasarlar önlenir. Karaciğer ve böbrekte plazmaya sistein tedarik edilmesinin gerekli olmasına rağmen derinlemesine araştırılmamış olan başka mekanizmaların olması durumunda özellikle plazmada bir sistin–sistein döngüsünün var olduğu varsayılabilir (Rudolfs ve Lawrence, 2006). Fibroblast hücrelerinde hiperoksia altında tetiklenen bir sistin–sistein döngüsünü sergilediklerini göstermişlerdir (Bannai ve ark., 1989). Bununla birlikte fibroblast hücrelerinin, plazmayla doğrudan bir bağlantılarının olmamasından dolayı sistin–sistein döngüleri plazmanın redoks statüsünün düzenlenmesinde doğrudan bir rol oynamazlar. Eritrositler dolaşımdaki kanın büyük bir kısmını temsil ederler ve bundan dolayı plazma ve eritrositler arasında çalışan bir sistin - sistein döngüsü plazmanın redoks statüsünün düzenlenmesinde oldukça büyük bir öneme sahip olacaktır.

Çalışmamızda, değişik ozmolaritelerdeki tamponlarla plazma ve eritrositler arasındaki olası bir sistin–sistein döngüsünü araştırdık. Daha önce bahsedildiği gibi plazmanın normal ozmolaritesi hücreler için izoozmolardır. Bununla birlikte, böbrekten geçen eritrositler düzenli olarak hiperozmolar koşullara maruz kalırlar. Sonuçlarımızın göstermiş olduğu gibi izoozmolar koşullar altında plazma ve eritrositler arasında herhangi bir sistin–sistein döngüsüne rastlamadık. Bu, eritrositlerin sistini çevrelerinden temin etmedikleri ve ondan normal plazma koşulları altında yararlanmadıkları anlamına gelir. Ancak, böbreklerde fizyolojik olarak oluşan hiperozmotik şartlarda işlevi bulunan bir sistin–sistein döngüsünün varlığını tanımladık. Eritrositler sistini 1250 ve 1300 mOsm/L tamponda almaya başlar, hücre içinde sistine indirger ve ardından indirgenmiş sisteini ortama geri bırakırlar.

Eritrositlerde sistin alımının indüklenebilir bir olay olduğunu ileri sürmekteyiz. Eritrositler sistini normal yollarla alamamaktadırlar. Bununla birlikte eritrositler sistin alımı için çeşitli mekanizma yada taşıyıcılarla donatılmış olabilirler. Daha önceden var olan kanıtlar bu düşünceyi desteklemektedirler. Eritrositlerin sistini çevrelerinden oksidatif stres koşulları altında temin ettiklerini göstermişlerdir (Miura ve ark., 1992; Ohtsuka ve ark., 1988). Bu fonksiyon, oksidatif strese maruz kalmış hücrelerin serbest radikallerin sağlığa zararlı etkileriyle başa çıkmaları için acil bir mekanizmanın olduğu izlenimini uyandırmaktadır. Eritrositlerde oksidatif stres ve hiperozmotik koşullar vasıtasıyla sistin taşınmasının başlaması, alma yönteminin meydana gelmesi için bazı zar modifikasyonları ya da değişimlerine gereksinim duydukları fikrini vermektedir. Bu sebeple, sistin alımıyla sonuçlanan bazı değişimler ya da modifikasyonların hiperozmotik koşullar tarafından tetiklendiği ileri sürülebilir. Ozmotik şok ve oksidatif stres sonucu katyon kanallarının açıldığı ve sitosolik kalsiyum düzeyinin arttığı görülmüştür (Lang ve ark., 2004; 2003). En sonunda sitosolik kalsiyum düzeyindeki artma scramblase’i uyarır. Scramblase fosfatidilserin ve diğer fosfolipitlerde transbilayer hareketiyle sorumlu bir plazma zar proteindir (Zhou ve ark., 2002). Kalsiyuma bağımlı scramblase aktivasyonu eritrosit zar asimetrisinin bozulmasına yol açar ve eritrosit zarının dış yüzünün fosfatidilserine maruz kalmasıyla sonuçlanır (Woon ve ark.,1999). Eritrositlerin ozmotik şokunun ayrıca fosfatidilserin asimetrisinin bozulmasına yol açan scramblase’i aktive eden seramid oluşumuyla birlikte sfingomiyelinazı da uyardığı bilinmektedir (Lang ve ark., 2004). Sonuç olarak,

bulgularımız hiperozmotik koşullarla sistin alınımını tetiklediklerini ve plazma ve eritrositler arasında bir sistin–sistein d6ngüsünü başlattıklarını akla getirmektedir. B6yle bir d6ngünün işlevi plazmanın redoks statüsünü d6zenlemek olabilir. Ayrıca bu yolla eritrositlerde elde edilen sistein GSH sentezinde kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Agre, P., Parke, J. C. 1989. Red blood cell membranes. **Marcel dekker inc.**, New York.
- Akkuş, İ., 1995. **Enzimatik Antioksidanlar Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik etkileri**, Proje.
- Akkuş, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. **Mimoza yayınları**. Konya.
- Aktaç, T., 1993. Hayvan Fizyolojisi. **T.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Matbaası**, 112-129, Ankara
- Allessio, H. M., Blası, E.R., 1997. Physical Activity As a Natural Antioxidant Booster and Its Effect on a Healthy Lifestyle. **Res.Q. Exerc. Sport**, 68(4): 292-302.
- Andersson, A., Lindgren, A., Arnadottir, M., Prytz, H., Hulberg, B., 1999. Thiols as a measure of plasma redox status in healthy subjects and in patients with renal or liver failure. **Clinical Chem.** 45: 1084-1087
- Ansari, G. A. S., Singh, S. V., Gan, J. C., Awasthi, Y. C., 1987. Human erythrocyte glutathione S-transferase: a possible marker of chemical Exposure. **Toxicol. Lett.** 37: 57-62.
- Armutçu, F., Gürel, A., Söğüt, S., Aksu, N., Ünalacak, M., 2004. Alkol Alışkanlığı Olanlarda Eritrosit Oksidan ve Antioksidan Parametre Düzeyleri. **Fırat Tıp Dergisi**, 9(2): 50-53.
- Aslan, D., Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.T., 2002. İnsan Biyokimyası.
- Awasthi, Y. C., Mısra, G., Rassın, D. K., Srivastava, S. K., 1983. Detoxification of xenobiotics by glutathione S-transferase in erythrocytes: the transport of the conjugate of glutathione and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene. **Brit. J. of Haematol.** 55: 419-425.
- Awasthi, Y. C., Garg, H. S., Dao, D. D., Partridge, C. A., Srivastava, S. K., 1981. Enzymatic conjugation of erythrocyte glutathione with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene: the fate of glutathione conjugate in erythrocytes and the effect of glutathione depletion on hemoglobin. **Blood**, 58: 733-738.
- Badaloo, A., Reid, M., Forrester, T., Heird, W.C., Jahoor, F., 2002. Cysteine Supplementation Improves the Erythrocyte Glutathione Synthesis Rate in Children with Severe Edematous Malnutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, 76(3): 646-652.
- Bannai, S.; Sato, H.; Ishii, T.; Sugita, Y. Induction of cystine transport activity in humanfibroblasts by oxygen. **J Biol Chem** 264: 18480-18484; 1989
- Barlas, N. E., Kolankaya, D., A Histopathological Study on The Effects of Commercial and Biodegraded Malation on Liver, Kidney and Spleen of Mice. **Türk J. Zool.**, 20, 149-154.
- Bear, J. G., 1964. Comparative **Anatomy of Vertabrates**, 153-157, London
- Bekcer, W. M., Klemsmith, L. J., Hardın, J., 2002. The World of the cell. **Benjamin Cummins**, London.
- Bendick, A., 1990. Antioxidant Nutrients and Immune Functions. **Plenum Pres**, New York.
- Bender, S. A., Reichelt, W., Norenberg, D. M., 2000.Characterization of cystine uptake in cultured astrocytes. **Neurochemistry International**, 37: 269-276.

- Berg, J. M., Tymoczko, J.L., Stryer, I., 2002. Biochemistry. **W. H. Freeman and Company, chapter-13**, Membrane Channels and Pumps, 345-361, New York.
- Board, P. G., 1981. Transport of Glutathione S-Conjugate from Human Erythrocytes. **Febs. Letter**, 124(2):163-165.
- Bozkırlı, İ., 1999. Yeni Üroloji, **Türk Hava Kurumu Basımevi**, 143-144, Ankara.
- Cengiz, M., Cengiz, S., 2000. Tip 2 Diyabetli Hastalarda C Vitamini Uygulamasının Eritrosit Glutasyon ve HbA1c Düzeyleri Üzerine Etkisi. **Cerrahpaşa**
- Champe, C. P., Harvey, A. R., 1997. Lippincott Biyokimya.(A, TOKULLUĞİL, Editör). **Nobel Tıp Kitapevleri**, Bölüm-22, Amino Asitlerin Karbon
- Christensen, H. N., Oxender, D. L., Liang, M., Vatz, K. A., 1965. The Use of N-methylation to Direct Route of Mediated Transport of Amino Acids. **J.Biol. Chem**, 240; 3609–3616.
- Christensen, H. N., Liang, M., Archer, E.G., 1967. A Distinct Na⁺-requiring Transport System for Alanine, Serine, Cysteine and Similar Amino Acids. **J.Biol. Chem**, 242: 5237-5242.
- Christensen, H. N., 1982. Interorgan Amino Acid Nutrition. **Physiol. Rev**, 62: 1193-1233.
- Christensen, H. N., 1985. On the Strategy of Kinetic Discrimination of Amino Acid Transport Systems. **J. Membr. Biol.**, 84: 97-103.
- Christensen, H. N., 1990. Role of Amino Acid Transport and Countertransport in Nutrition and Metabolism. **Physiol. Rev**, 70: 43-77.
- Christensen, H. N., 1993. Amino Acid Nutrition: A Two-Step Absorptive Process. **Nutr. Rew**, 51: 95-100.
- Clemens, M. R., Waller, H. D., 1987. Lipid peroxidation in erythrocytes. **Chemist. and Phy. of Lipids**, 45: 251-268.
- Closs, E. I., 1996. CATs, A Family of Three Distinct Mammalian Cationic Amino Acid Transporters. **Amino Acids**, 1: 193-208
- Conway, M., Chappel, S., 2000. Biyokimya-Olgu sunumlu yaklaşım. (N, Atlan, editör). **Palme Yayıncılık**, Bölüm-8, Amino Asitlerin Yıkımı ve Biyosentezi, 249-254s, Ankara.
- Cooper, G., Hausman, R.E., 2004. The Cell A Molecular Approach. **ASM Pres**, Washington. **Tıp Dergisi**, 31: 211-215.
- Demirsoy, A., 1993,. Yaşamın Temel Kuralları Cilt III- Kısım I, 205-216, Ankara
- Demirtaş D, Göktaş M, Karcı B, Bilgen V., 1997. Kanserli Dokuda Glutasyon Düzeyi Araştırılmasının Önemi. **Ege Tıp Dergisi** 36(3-4):109-11.
- Deves, R., Chavez, P., Boyd, C.A.R., 1992. Identification of a New Transport System in Human Erythrocytes That Recognizes Cysine and Leucine with High Affinity. **Journal of Physiology**, 454: 492-501.
- Devlin, T., 1992. Textbook of Biochemistry: with Clinical Corelations. **A. John Wiley & Sons, INC**. Publication, New York.
- Dillioğlugil, O. M., Ilgazlı, A., Meral, H., Sengül, C., Ozdemir, G., Ercin, C., 2005. Protective Effects of N-acetylcysteine on the peroxidative changes of rat lungs exposed to inhalation of thinners. **Respirology**, 10: 615–619.
- Discher, E., Carl, P. 2001. New insights into red cell network structure, elasticity, and spectrin unfolding – a current review. **Cellular & Molecular Biology Letters**, 6:593-606.

- Dündar, Y., Aslan, R., 1999a. Oksidan-Antioksidan Denge ve Korunmasında Vitaminlerin Rolü. **Hayvancılık Araştırma Dergisi**, 9, 1-2: 32-39.
- Dündar, Y. Aslan, R., 2000. **Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar**. Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, Ankara.
- Eavenson, E., Christensen, H.N.,1967. Transport Systems for Neutral Amino Acids in the Pigeon Erythrocyte. **J.Biol. Chem**, 242: 5386-5396.
- Eckert, K. G., Eyer, P., 1986. Formation and transport of xenobiotic glutathione-S-conjugates in red cells. **Biochem. Pharmacol**, 35: 325-329.
- Eleno, N., Deves, R., Boyd, C.A., 1994. Membrane Potential Dependence of the Kinetics of cationic Amino Acid Transport System in Human Placenta. **J. Physiol**, 479: 291-300.
- Erenel, G., Erbaş, D., Arıcıoğlu, A., 1992. Serbest Radikaller ve antioksidan sistemler. **Gazi Tıp Dergisi**, 3: 243-250.
- Fei, Y. J., Prasad, P.D., Leibach, F.H., Ganapathy, V., 1995. The Amino Acid Transport System y^+L Induced in *Xenopus Laevis* Oocytes by Human Choriocarcinoma Cell mRNA is Functionally Related to the Heavy Chain of the 4F2 Cell Surface Antigen. **Biochemistry**, 34: 8744-8751.
- Gevondyan, N. M., Gevondyan, V.S., Gavriyeva, E.E., Modyanov, N.N., 1989. Analysis of Free Sulfhydryl Groups and Disulfide Bonds in $Na^+ - K^+$ ATPase. **Elsevier Science publishers**, 255(2): 265-268.
- Gille, G., Sigler, K.,1995. Oxidative stress and living cells. **Folia Microbiol**, 40(2): 131-152
- Gots, S. J., Ve Gollub, G. E.,1956. Purine Metabolism in Bacteria. IV.L-Azaserine as an inhibitor. **J.Bacteriol**, 72: 858-864.
- Gözükara, E. M., 2001. **Biyokimya. İ. Ü. Yayınları**, Malatya.
- Griffith, O.W., 1992. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free Rad. Biol. and Med.** 27: 922-935
- Griffith, O.W., Mulcahy, R.T., 1999. The enzymes of glutathione biosynthesis: γ -glutamylcysteine synthetase. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol**, 73: 209-267.
- Griffith, O. W., 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free Radical Biology and Medicine**, 27:922-935.
- Guidotti, G. G., Gazzola, G. C., 1992. Amino Acid Transporters: Systematics Approach and Principles of Control.(M.S.Kilberg ve D.Haussinger, Editör). In: **Mammalian Amino Acid Transport Mechanisms and Control**. Pg. 3-30, **New York**.
- Gültekin, F., Delibaş, N., Yaşar, S., Kılınc, I., 2001. In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and Vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. **Arch Toxicol**, 75: 88-96.
- Gustafsson, C. A., Kupersmidt, I., Rose, E. E., Greco, G., Serafino, A., Kasnowska, A. E., Lundeberg, T., Laudiero, B. L., Romano, C. M., Parasassi, T., Lundeberg, J., 2005. Global gene expression analysis in time series following N-acetyl-L-cysteine induced epithelial differentiation of human normal and cancer cells in vitro. **BMC cancer**, 5: 75.
- Guyton, A. C., Hall, J. E., 2000. The countercurrent mechanism produces a hyperosmotic renal medullary intersitium. **Textbook of Medical**

- Physiology. chapter 10.** Saunders an imprint of Elsevier, 315- 316, Pennsylvania.
- Hundal, H. S., Rennie, M. J., Watt, P. W., 1987. Characteristics of L-glutamine Transport in Perfused Rat Skeletal Muscle. **J. Physiol.** 393: 283-305.
- Jones, P. D., Mody, C. V., Carlson, L. J., Lynn, J. M., Sternberg, P., 2002. Redox Anaysis of Human Plasma allows Separation of Pro-Oxidant Events of Aging from decline in antioxidant defenses. **Free Radical Biology & Medicine**, 33; 1290–1300.
- Junqueira, C. L., Carneiro, J., Kelley, R.O., 1998. Temel Histoloji. (Y, Aytekin, Editör). **Barış Kitapevi**, Bölüm–12; Kan hücreleri, 221-241s, İstanbul.
- Kavas, G. Ö., 1989. Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. **Türkiye Klinikleri**, 9: 1-8.
- Kauvar L. M, Morgan A.S, Sanderson P.E., 1998. Glutathione Based Approaches To Improving Cancer Treatment. **Chemico – Biological Int.** 111-112: 225-38.
- Keskin, N., 2001. **Denizli Yöresindeki G6PD Enzim Yetmezlikli Bireylerde Akdeniz Mutasyon Sıklığının ve Eritrositlerdeki İnce Yapı Değişikliklerinin Araştırılması** Ege üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi.
- Keppeler, D., 1999. Export pumps for glutathione S-conjugates. **Free Rad. Biol. and Med.** 27: 985-991.
- Kilberg, M. S., Handlogten , M. E., Christensen, H.N., 1980. Characteristics of An Amino Acid Transport System in Rat Liver for Glutamine, Asparagine, Histidine and Closely Related Analogs. **The Journal of Biological Chemistry**, 255: 4011-4019.
- Kılınç, K., 1986. Oxygen radicals: Their production, function and toxic effects. **Biyokimya Dergisi**, 9(3): 59-76.
- Kuru, M., 1999. Omurgalı Hayvanlar, **Palme yayıncılık**, 166-168,735.
- Labelle, E. F., Singh, S. V. Srivastava, S. K., Awasthi, Y. C., 1986. Dinitrophenyl glutathione efflux from human erythrocytes is primary active ATP-dependent transport. **Biochem. J.** 238: 443-449.
- Lang, K. S.; Myssina, S.; Lang, P.A.; Tanneur, V.; Kempe, D.S.; Mack, A.F.; Huber S.M.; Wieder, T.; Lang F. And Duranton C., 2004. Inhibition of erythrocyte phosphatidylserine exposure by urea and Cl⁻. **Am J Physiol Renal Physiol** 286: F1046-F1053.
- Lang, K. S.; Myssina, S.; Brand, V.; Sandu, C.; Lang, P.A.; Berchtold, S.; Huber, S.M.; Lang, F.; Wieder, T., 2004. Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes. **Cell Death Differ.** 11(2): 231-43.
- Lehninger, A. L., Nelson, D.L., Cox, M. M., 2005. Principles of Biochemistry. **Worth Publishers**, Chapter–11; Biological Membranes and Transport, 370-378s, New York.
- Lilja, S. H., Hyde,E.,Longnecker,S.D.,Ve Yager,D.J.,1977. DNA Damage and Repair in Rat Tissues following Administration of Azaserine. **Cancer Res**,37: 3925-3931
- Longnecker, D. S.,And Curphey,T.J.,1975. Adenocarcinoma of the pancreas in azaserine treated rats. **Cancer Res**,35: 2249-2258.
- Lu, C. S., Sun, M. W.,Yı, J., Ookhtens,M., Sze, G.,ve Kaplwitz, N., 1996. Role of two recently cloned rat liver GSH transporters in the ubiquitous transport of GSH in mammalian cells. **J.Clin: Invest**, 97:1488-1496.

- Lunn,G., Dale, G. L., Beutler, E., 1979. Transport accounts for glutathione turnover in human erythrocytes. **Blood**, 54: 238-244.
- Lunn, G., Dale, G. L., Beutler, E.,1979. Transport accounts for glutathione turnover in human erythrocytes. **Blood**, 54: 238-244.
- Lynch, A. M., Mcgivan, J.D., 1987. Evidence for A Single Common Na⁺ dependent Transport System for Alanine, Glutamine, Leucine and Phenylalanine in Brush-Border Membrane Vesicles from Bovine Kidney, *Biochim. Biophys. Acta*, 899: 176-184.
- Malgorzata, M., Erenciska, Z., Erenciska, M. 1987. Role of sialic acid in synaptosomal transport of amino acid transmitters. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 84:1709:1712.
- Matsuda, Y., Epstein, L. F., Gatmaitan, Z., Arias, I. M., 1996. The role of thiols in ATP-dependent transport of S-(2,4-dinitrophenyl) glutathione by rat liver plasma membrane vesicles. **Biochim. et Biophys. Acta** 1279: 35-42
- Mcbean, G. J. 2002.Cerebral cystine uptake: a tale of two transporters. **Trens in Pharmacological Sciences**, 23: 299-302
- Mcbean, G. J., Flynn,J.,2001.Molecular mechanisms of cystine transport. **Biochemical Society Transactions**, 29: 717-722.
- Mceven, R. S., 1949. Vertebrate Embriology. Henry Holt and Company, 262-278, California.
- Milan, G. C., Marinero, S. L. M., Castaneda, Z. A., Lanao, M. J., 2004. Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers. **Journal of Controlled Release**, 95; 27–49.
- Milton, H., Sater, J., 2000. A Functional-Phylogenetic Classification System for Transmembrane Solute Transporters. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 64(2): 354-411.
- Miyamoto, Y., Nakamura, H., Hoshi, T., Ganapathy, V., Leibach, F. H., 1990. Uphill Transport of Beta-Alanine in Intestinal Brush-Border Membrane Vesicles. **Am J. Physiol**, 259: G372-G379.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W., 1996. Harper'in Biyokimyası. (R;K,MURAY, editör). **Barış Kitapevi**, Bölüm-6, Zenobiyotiklerin metabolizması, 807-832s,İstanbul.
- Murray, R., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., 2003. Harper's Biochemistry. **McGraw-Hill Companies**.
- Nagata J, Kijima H, Hatanaka H, Asai S., 2001. Reversal of Cisplatin and Multidrug **Res Comm** 286:406-13.
- Noyan, A., 2000. Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji, **Meteksan**, Bölüm-1, 6; Hücre, Vücut Sıvılarının Ayarlanması; 1-29s; 606-656, Ankara.
- Nelson, D., Cox, M.M., 2004. Lehninger Principles of Biochemistry. Çeviri: Kılıç, N., Lehninger Biyokimyanın İlkeleri. **Palme Yayıncılık**, Ankara.
- Ohutsuka, Y., Kondot, T., Kawakami, Y., 1992. Oxidative stresses induced the cystine transport activity in human erythrocytes. **Biochemical and Biophysical research communications**, 155: 160–166.
- Olive, C., Board, P., 1994. Glutathione S-conjugate Transport of cultured by human Cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1224; 264–268.

- Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E. Y., 2002. İnsan Biyokimyası. **Palme yayıncılık**, Bölüm-1-4; Hücre, Amino Asitlerin Metabolizması, 1-18s, 80-104s, Ankara.
- Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E. T., 2002. İnsan Biyokimyası. **Palme yayıncılık**, 975-8624-20-02.
- Özden, S., Şadan, G., 1994. Serbest oksijen radikallerinin oluşum ve klinik açıdan önemi. **A.Ü. Tıp Fak. Derg.**, 11(1): 63-71
- Özer, A., 1985. pratik hematoloji: Klinik Laboratuar ve Tedavi. **Bilgehan Basımevi**, Bornova-İzmir:
- Oztaş, H., 2000. Hücre Biyolojisi(sitoloji). **Bakanlar Media**, Bölüm-7; Ökaryotik Hücreler, 72-85s, Erzurum.
- Palacın, M., Estevez, R., Bertran, J., Zorzano, A., 1998. Molecular Biology of Mammalian Plasma Membrane Amino Acid Transporters. **Physiol. Rev**, 78: 969-1054.
- Pamuk, F., 2000. Biyokimya. Gazi Kitapevi, Bölüm-12; Hücre zarında Taşınım, 154-166, Ankara.
- Patrick, G., Gallagher, M.D. 2004. Update on the clinical spectrum and genetics of red blood cell membrane disorders. **Current hematology reports**, 3:85-91.
- Pittman, M. S., Corker, H., Wu, G., Binet, M. B., Moir, A. J., Poole, R. K., 2002. Cysteine is exported from the Escherichia coli cytoplasm by CydDC, an ATP-binding cassette-type transporter required for cytochrome assembly. **J. Biol. Chem.** 277 (51): 49841-49849.
- Robbins, L. S., Kumar, V., 1990. Temel Patoloji.(Ö, Uluoğlu, editör). **Güneş Kitapevi**, Bölüm-1, Hücre Zedelenmesi ve Adaptasyon, 1-32s Ankara.
- Romer, A. S., Parsond, T., The Vertebrate Body, 396-417, New York.
- Rudolfs, K. Z. and Lawrence H. L., 2006. Cystine alters the renal and hepatic disposition of inorganic mercury and plasma thiols. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 214: 88-97.
- Ruiz, E., Slow, M. C. R., Bartlett, R. S., Jenner, M. A., Sato, H., Bannal, S., Vemann, E. G., 2002. Vitamin C Inhibits Diethylmaleate-Induced L-Cystine Transport in Human Vascular Smooth Muscle Cells. **Free Radical Biology & Medicine**, 34: 103-110.
- Sadava, D. E. 1993. Cell Biology: Organelle structure and function. **Jones and Bartlett Publishers**, London, 698s.
- Sagne, C., Agulhon, C., Ravarssard, P., Darmon, M., Hamon, M., Mestikwy, S. E., Gasnier, B., Giros, B., 2001. Identification and Characterization of Lysosomal Transporter for Small Neutral Amino Acids. **PNAS** 98(13): 7206-7211.
- Sato Hideyo , Tamba Michiko, Okuno Suzuka, Sato Kanako, Masu Keino Kazuko , Masu Masayuki Bannai Shiro 2002. Distribution of Cystine/Glutamate Exchange Transporter, System xc₋, in the Mouse Brain. **The Journal of Neuroscience**, 22(18):8028-8033.
- Sedlak, J., Lindsay, R. H., 1963. Determination of sulfhydryl groups in biological samples. **Analytical Biochem.**; 25: 192-205.
- Sen, C. K., 1995. Oxidant and Antioksidant . **Exp. Physiol**, 79(3): 675-686.
- Serteser, M., 1999. **Deneyisel Global Serebral İskemi- Reperfüzyon hasarında Nitrit Oksit Oluşumu, Lipit Peroksidasyonu ve Protein Oksidasyonu :**

- Glutamat Salınım İnhibisyonunun Nöroprotektif Etkisi.** Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim dalı. Uzmanlık Tezi.
- Shohet, S., Beutler E., 1986. Glutathione metabolism of erythrocyte. **Williams Hematology**. The erythrocyte. Part four.
- Sies, H., 1999. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology and Medicine**, 27: 916–921.
- Sikorski, A. F., Lorenz, B. H., Jezierski, A., Dluzewski, A.R. 2000. Interection of membrane skeletal proteins with membrane lipid domain. **Acta Biochimica Polonica**, 47: 565-578.
- Sinclair, A. J., Barnett, A. H., Junec, J., 1990. Free Radicals and Antioxidant Systems in Health and Disease. **Brit. J. Hos. Med.**, 43: 334-344. Skrzydlewska, E., Farbiszewski, R., 1999. Protective Effect of N-acetylcysteine on Reduced Glutathione, Reduced Glutathione-related Enzymes and Lipid Peroxidation in Methanol İntoxication. **Drug and Alcohol Dependence**, 57: 61-67.
- Singer, S. J., Nicolson, G. L., 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membrans. **Science** 175: 720-31.
- Sleep, J., Wilson, D., Simmons, R., Gratzner, W. 1999. Elasticity of the red cell membrane and its relation to hemolytic disorders: An optical tweezers study. **Biophysical Journal**, 77:3085-3095.
- Smith, Q. R., Cooper, A. J. L., 1992. Amino Acid Transport in Brain. (M. S. Kilberg and D. Haussinger, Editör). In : **Mammalian Amino Acid Transport Mechanisms and Control**. P. 165-193, New York.
- Snell, R. F., 1998. Clinical Anatomy. Yıldırım, C. (Çeviren). Nobel Yayın Dağıtım. 1. baskı.
- Srivastava, K. S., Beutler, E., 1970. Glutathione Metabolism of the Erythrocyte. **Biochem. J**, 119: 353–357.
- Srivastava, K. S., Beutler, E., 1969. The Transport of Oxidized Glutathione from Human Erythrocyte. **Biochem. J**, 244: 9–16.
- Stibler, H., Sydow, O. 1983. The sialic acid and galactose concentrations in erythrocyte membranes in patients with myotonic dystrophy, limb-girdle and facioscapulohumeral dystrophy. **J Neurol Sci**, 59(3):389-99
- Strange, R. C., Jones, P. W., Fryer, A. A., 2000. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. **Toxicol. Lett.** 112: 357-363
- Şimşek, E., 1994. Biyokimya. **Güneş Kitapevi**. Bölüm–2; Hücre, 5-16s, Ankara.
- Tanyolaç, J., Tanyolaç, T., 1990. Genel Zooloji, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen-Edebiyat Basımevi, 418-420, Ankara.
- Thomas, M., Devlin, Ph, D., 1986. **Textbook of Biochemistry with Clinical Correlasyon 2. .**
- Thomas, M., 1995. The role of free radicals and antioxidants: how do we know that they are working. **Critical Rev. Food Sci. Nutr.**, 35(1): 21-39
- Thumham, D. I., 1990. Antioxidants and prooxidants in malnourished populations. **Proceedings Nutr. Society**, 49: 247-259.
- Tietze, F., 1969. Enzymic method for quantitatif determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione.; 27: 502-522.
- Ulakoglu, E. Z., Gümüştas, M. K., Belce, A., Altug, T., Kokoglu, E., 1998. Strese Bağlı Mide Mukozası Hasarında Endojen Glutasyon Tükenişinin Enerji Metabolizması ile İlişkisi. **Cerahpaşa J. Med**, 29(3); 127–131.

- Voet, D., Voet, G. J., 1995. Biochemistry. **Von Hoffman Press**. Chapter-24, Amino Acid Metabolism, 727-776s, New York.
- Vries, N. D., Flora, S. D., 1993. N-Acetyl-L-Cysteine. **Journal of Cellular Biochemistry, Supplement 17F**; 270–277.
- Yalın, E. A., Yalın, S., Yıldız, S. M., Yüzbaşıoğlu S., Aksoy, K., 2001. Eritrositlerin Membran Proteinlerine Serbest Radikallerin Etkisi Cilt:26, Sayı : 4
- Yalın, S., Aksoy, K. 1997. Red cell membrane protein abnormalities of a family with hereditary spherocytosis in Adana. **Tr. J. of Medical Sciences**, 28:295-297.
- Yang, S. M., Chan, W. H., Yu, C. L., 2006. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress. **Toxicology**, 226: 126–130.
- Yenerel, M. N. 2004. Hereditör eritrosit membran anomalileri. **Hematoloji**, 2:125-130.
- Yıldız, D., Ateş, H. B., Uslu, C., ve Öztas, H., 2005. L-Cysteine influx and efflux in Human Erythrocytes: the role of Red Blood Cells in Redox and Metabolite Homeostasis in the Plasma. **Journal of Health Science**, 52(2): 118-123.
- Yıldız, D., Bağdadioğlu, T., 2004. L- cysteine Uptake is Stimulated by 1-cloro-2,4-dinitrobenzene in vitro in human Erythrocytes. **Toxicology Mechanisms and Methods**, 14: 241-245.
- Yıldız, D., Uslu, C., Çakır, Y., Öztas, H., 2006. L-Cysteine influx and efflux: A possible role for red blood cells in regulation of redox status of the plasma **Free Radical Research**, 40 (5): 507-512.
- Wegrzynowicz, M., Hilgier, W., Dybel, A., Oja, S. S., 2007. Upregulation of cerebral cortical glutathione synthesis by ammonia in vivo and in cultured glial cells: The role of cystine uptake. **Neurochemistry International**, 75: 1s.
- West, J. B., 1995. **Physiological Basis of Medicine Practice**. Panamericana, Buenos Aires.
- Wickens, A. P., 2001. Ageing and free radical theory. **Respiration Physiology**, 128: 379-391.
- Woon, L. A., Holland, J. W., Kable, E. P., Roufogalis, B. D., 1999. Ca²⁺ sensitivity of phospholipid scrambling in human red cell ghosts. **Cell Calcium**. 25 (4): 313-320.
- Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R., Turner, N. D., 2004. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. **Journal Nutrition**, 134: 489-492. İskeletlerinin Metabolizması, 243-256s, İstanbul.
- Zalups, R. K., Lash, L. H., 2006. Cystine alters the renal and hepatic disposition of inorganic mercury and plasma thiol status. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 214: 88-97.
- Zhang, S. M., Willett, C. W., Sehub, J., Manson, J. E., Colditz, G. A., Hankinson, S.E., 2003. A prospective study of plasma total cysteine and risk of breast cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, 12: 1188–1193.
- Zhou, Q., Zhao, J., Wiedmer, T., and Sims P. J., 2002. Normal hemostasis but defective hematopoietic response to growth factors in mice deficient in phospholipid scramblase. **Blood**, 99: 4030-4038; 20.

Zou, C. G., Agar, N. S., Jones, G. L., 2002. Chlorodinitrobenzene-mediated Damage in the Human Erythrocyte Membrane Leads to Hemolysis. **Life Sciences**, 71: 735-746.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında büyük titizlik, sabır ve özveriyle bana destek olan, yol gösteren danışman hocam sayın Doç. Dr. Deniz YILDIZ'a (M.K.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü) çalışmalarında yardımlarını gördüğüm Bölüm Başkanımız sayın Prof. Dr. Hayrettin Ocakverdi' ye (M.K.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü), çalışmalarımın düzenli ilerlemesinde bana yardımcı olan Züleyha Çivi, Muharrem atlı, Hüseyin Doğru, Ar. Gör. Hasan Yıldız' a, Kimya bölümü araştırma görevlilerine teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca Çalışmalarım sırasında destek ve sabırlarını benden esirgemeyen sevgili aileme gönül dolusu teşekkürler.

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Hatay'ın Samandağ ilçesinde doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Samandağ' da tamamladım. 1997 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek okulu Tıbbi Laboratuvar bölümünden mezun oldum. 2001 yılında Antakya SSK hastanesinde laborant olarak işe başladım. 2001 yılında dikey geçiş sınavıyla Mustafa Kemal üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne başladım. 2004 yılında mezun oldum. 2005 yılında, Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Genel Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladım. Halen Antakya Devlet Hastanesi Acil Biyokimya laboratuvarında çalışmaktayım.