



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

ERİTROSİTLERDE L-SİSTEİN VE N-ASETİL -L- SİSTEİN  
TRANSPORTUNUN KARŞILAŞTIRILMASI

MUSTAFA ARIK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Antakya/HATAY

ARALIK-2008

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

ERİTROSİTLERDE L-SİSTEİN VE N-ASETİL -L- SİSTEİN  
TRANSPORTUNUN KARŞILAŞTIRILMASI

MUSTAFA ARIK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Deniz YILDIZ danışmanlığında hazırlanan bu tez 30/ 12/ 2008 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Deniz YILDIZ  
Başkan

Doç. Dr. Suat ERDOĞAN  
Üye

Yrd. Doç. Dr. Erol ATAY  
Üye

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

**Kod No:**

Prof. Dr. Necat AĞCA  
Enstitü Müdürü

**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**

	<b>Sayfa</b>
ÖZET.....	II
ABSTRACT.....	III
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	V
ÇİZELGE DİZİNİ .....	VI
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	3
2.1. L-Sistein .....	6
2.2. N-asetil-L-sistein.....	9
2.3. Glutasyonun Yapısı ve Görevleri .....	10
2.4. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar.....	14
2.5. GSH Metabolizması ve Antioksidan Rolü.....	16
2.6. Eritrositler .....	18
2.6.1. Eritrositlerin Membran Yapısı.....	18
2.6.2. Eritrosit Membranın Fonksiyonları.....	19
2.6.3. Eritrosit Metabolizması.....	19
2.6.4. Eritrositlerde Pentoz Fosfat Yolu ve Önemi.....	20
2.7. Memeli Hücrelerinde Aminoasit Transport Sistemleri.....	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
3.1. Materyal.....	25
3.2. Yöntem.....	27
3.2.1. İstatistiksel analizler.....	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	32
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	39
KAYNAKLAR.....	42
TEŞEKKÜR.....	48
ÖZGEÇMİŞ.....	49

## ÖZET

**ERİTROSİTLERDE L-SİSTEİN VE N-ASETİL-L-SİSTEİNİN  
TRANSPOTUNUN KARŞILAŞTIRILMASI**

Bu çalışmanın amacı, L-sistein ve N-asetil-L-sisteinin membranlardan geçişlerini karşılaştırarak hangisinin hücreler için daha iyi bir öncül molekül olduğunu ve böylece hücre içi glutatyon sentezini daha iyi desteklediğini araştırmaktır. L-sistein direkt olarak glutatyon sentezine katılabilmektedir. Ancak N-asetil-L-sistein glutatyon yapısına katılmadan önce deasetile edilmelidir. Bu çalışmada L-sistein ve N-asetil-L-sisteinin eritrosit membranından hücre içine girişlerini ve hücre dışına çıkışlarını karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Eritrositler hem L-sisteini hem de N-asetil-L-sisteini belli konsantrasyonlarda hücre içine almakta ve daha sonra tekrar bunları hücre dışına verebilmektedirler. Bununla birlikte, elde edilen sonuçlar L-sisteinin N-asetil-L-sisteine göre eritrosit membranlarından daha etkili ve hızlı bir şekilde geçebildiğini göstermektedir. Eşit şekilde 5 mM L-sistein ve 5 mM N-asetil-L-sistein ile ayrı ayrı 1 saat süreyle muamele edilen eritrositlerde hücre içi serbest -SH seviyeleri sırasıyla  $3.37 \pm 0.006$  ve  $2.23 \pm 0.08$   $\mu\text{mol/ml}$ 'ye yükselmiştir. Bunun dışında yine L-sisteinin hücre içinde önceden yok edilen serbest -SH lerin yenilenmesinde N-asetil-L-sisteine kıyasla daha etkili olduğu görülmüştür. Hücre içi serbest -SH tüketimini takiben hem L-sistein hem N-asetil-L-sisteine maruz bırakılan eritrositlerde serbest -SH seviyeleri önemli ölçüde yenilenmiştir. Ancak L-sistein varlığında serbest -SH yenilenmesinin düzeyi N-asetil-L-sistein varlığına nazaran önemli ölçüde daha yüksek olmuştur. Önceden serbest -SH tüketimine maruz bırakılan eritrositler 5 mM L-sistein ile muamele edildiğinde serbest -SH seviyesi  $1.45 \pm 0.075$   $\mu\text{mol/ml}$  eritrosite yükselirken aynı konsantrasyonda N-asetil-L-sistein kullanıldığında bu seviye  $0.377 \pm 0.034$   $\mu\text{mol/ml}$  eritrosit olarak ölçülmüştür. Ayrıca sonuçlarımız hem L-sistein hem de N-asetil-L-sisteinin eritrositlere girişlerinin biyolojik olarak aktif bir olay olduğunu göstermiştir. Elde edilen veriler L-sisteinin N-asetil-L-sisteine kıyasla eritrositler için daha iyi bir tiyol öncüsü olduğunu göstermektedir. N-asetil-L-sistein L-sisteine kıyasla hücreler tarafından daha zayıf bir şekilde ortamdan alınmaktadır.

2008, 55 sayfa

**Anahtar kelimeler:** L-sistein, N-asetil-L-sistein, Eritrosit, Membran transportu.

## ABSTRACT

**COMPARISON OF CYSTEINE AND N-ACETYL-L-CYSTEINE TRANSPORT  
IN ERYTHROCYTES**

The objective of the present study was to compare cysteine and N-acetyl-L-cysteine in respect to their transmembrane flux and find out which one is a better available precursor for the cells and thus better support the intracellular glutathione synthesis. Cysteine can directly participate in glutathione synthesis whereas N-acetyl-L-cysteine must be first deacetylated before its incorporation to glutathione. In the present study we investigated and compared the efficiencies of cysteine and N-acetyl-L-cysteine influx and efflux through the erythrocyte membrane. Erythrocytes influxed and effluxed both cysteine and N-acetyl-L-cysteine in a concentration dependent manner. However, our results demonstrated that cysteine crosses the erythrocyte membranes more efficiently compared to N-acetyl-L-cysteine. Treatment of erythrocytes separately with 5 mM of cysteine and N-acetyl-L-cysteine for 1 hour raised the intracellular free-SH levels to  $3.37 \pm 0.006$  and  $2.23 \pm 0.08$   $\mu\text{mol/ml}$  erythrocyte respectively. Cysteine also appeared to be more effective in replacement of predepleted intracellular free-SH levels. Both cysteine and N-acetyl-L-cysteine exposure following depletion of intracellular free-SH significantly regenerated the intracellular free-SH levels. However, the extent of free-SH regeneration was significantly higher compared to N-acetyl-L-cysteine. Exposure of free-SH predepleted erythrocytes to 5 mM of cysteine raised the free-SH level to  $1.45 \pm 0.075$   $\mu\text{mole/ml}$  erythrocyte in 1 hour whereas this level was measured to be  $0.377 \pm 0.034$   $\mu\text{mol/ml}$  erythrocyte when equimolar concentration of N-acetyl-L-cysteine was used. Results also show that both cysteine and N-acetyl-L-cysteine influxes are mediated and require biologic activity. Our results demonstrate that cysteine is a better thiol precursor for the erythrocytes. N-acetyl-L-cysteine is poorly available for the cells compared to cysteine.

2008, 55 pages

**Keywords:** Cysteine, NAC, Erythrocytes, Cellular uptake

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

AIDS	Acquired Immuno deficiency syndrome ( Kazanılmış bağışıklık sistemi yetersizliği sendromu)
ASC	Alanin, Serin, Sistein taşıma sistemi
ATP	Adenozin trifosfat
DMAP	4-dimetil aminofenol
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTNB	5,5'-dithiobis- (-nitrobenzoate)
EDTA	Etilendiamin tetraasit
GABA	Gammaaminobutirik asit
GSSG	Okside glutatyon
GSH	Redükte glutatyon
GGT	$\gamma$ -glutamil transpeptidaz
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
GS-DNP	S-(2,4-dinitrofenil)glutatyon
G6PD	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
G6P	Glukoz-6-fosfat
Hb	Hemoglobin
HbA1c	Glikozillenmiş hemoglobin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojenperoksit
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
NAC	N-Asetil-L-sistein
NAD	Nikotinadenin dinükleotid
NEM	N-etilmaleimid
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Süperoksit
SH	Sülfhidril
SOD	Süperoksit dismutaz
TCA	Trikloroasetikasit

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

	Sayfa
Şekil 2.1. L-Sisteinin kimyasal yapısı .....	7
Şekil 2.2. L-sistein aminoasidinin biyosentezi .....	8
Şekil 2.3. Glutatyonun yapısı.....	10
Şekil 2.4. Glutatyon sentezi .....	12
Şekil 2.5. Okside glutatyon .....	13
Şekil 4.1. Eritrositlerde zamana bağlı olarak L-sistein ve NAC alımı.....	32
Şekil 4.2. Eritrositlerden zamana bağlı olarak sistein ve NAC çıkışı.....	33
Şekil 4.3. Eritrositlerde L-sistein ve NAC alımına sıcaklığın etkisi.....	34
Şekil 4.4. Eritrositlerden L-sistein ve NAC çıkışına sıcaklığın etkisi .....	35
Şekil 4.5. L-sistein ve NAC' nin hücre içi serbest -SH yenilenmesine etkisi .....	36
Şekil 4.6. Bazı aminoasitlerin L-sistein ve NAC alımına etkileri .....	37
Şekil 4.7. Hücre dışı ortamda L-sistein ve NAC stabilitesi .....	38

**TABLolar DİZİNİ**

	<b>Sayfa</b>
Tablo 2.1. Sık karşılaşılan radikaller, simgeleri ve kimlikleri .....	15
Tablo 2.2. Bazı antioksidanlar.....	16



## 1.GİRİŞ

L-sistein, hücrelerde metiyonin ve serinden sentezlenebildiğinden esansiyel olmayan bir aminoasittir (Murray ve ark., 1991). Hücre içindeki L-sisteinin diğer doğal kaynağı da organizmaya dışarıdan besinlerle alınan sistinin hücrede iki molekül L-sisteine indirgenmesidir (Mc Bean ve ark., 2001). Bu yolla elde edilen L-sistein hücreler tarafından ihtiyaç duyulan proteinlerin sentezi için öncü olarak kullanılabilir. L-sisteinin tek görevi protein sentezi için bir yapı taşı olarak fonksiyon görmek değildir. Hücreler ayrıca önemli bir tripeptit olan glutatyonun (GSH) sentezi için L-sistein kullanırlar (Griffith, 1999). GSH bir antioksidan gibi görev yapar ve bazı serbest radikallerin zararlı etkilerinden hücreleri ve dokuları korur (Sies, 1999). GSH ayrıca hücrelerde çeşitli ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda da rol oynar. Bu reaksiyonlar çoğunlukla glutatyon -S transferaz enzimi tarafından katalizlenen konjugasyon reaksiyonlarını içerir (Eckert ve Eyer, 1986). Bu reaksiyonlarda, L-sistein reaktif bir sülfhidril grubu sağlayıcısı ve GSH'nin fonksiyonel grubu olarak davranır.

N-asetil-L-sistein (NAC) L-sisteinin N-asetillenmiş halidir. NAC'nin biyolojik etkileri çeşitli deneysel sistemler düzenlenerek kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Bu çalışmalarda NAC'nin inflamasyon, oksidatif stres, sitotoksosite, gen ekspresyonu, hücre proliferasyonu, apoptozisin modülasyonu ve karsinogenezi içeren geniş bir çeşitlilikteki biyolojik süreçlerde önemli roller oynadığı gösterilmiştir (Vries ve Flora, 1993; Kelly, 1998; Flora ve ark., 2001). NAC'nin bu etkilerinin hemen hepsi sülfhidril grubu vasıtasıyla GSH tarafından gerçekleştirilir. NAC bazı serbest radikaller ve toksik bileşiklerle onların zararlı etkilerini önleyerek direkt etki edebilir (Flora ve ark., 1985; Nakata ve ark., 1996). Ayrıca NAC'nin paraquat toksisitesi ve asetaminofen zehirlenmesine karşı koruduğu bilinmektedir (Pratt ve Ioannides, 1985; Hoffer ve ark., 1996). NAC hücreye alındıktan sonra GSH sentezi için önemli bir yapı maddesi olan L-sisteine deasetile edilir. Hem NAC hem de L-sisteinin asıl fonksiyonu hücrelerde serbest sülfhidril (-SH) seviyelerini arttırmak ve GSH sentezi için substrat sağlamaktır. Burada açıklandığı gibi NAC'nin biyolojik etkileri üzerine kapsamlı bir araştırma yapılmıştır. Bununla birlikte, L-sistein bir GSH öncüsü ve bir antioksidan olarak hemen her zaman *in vivo* ve *in vitro* deney sistemlerinin dışında bırakılmıştır. Ayrıca, benzer deney sistemlerinde NAC ve L-sistein etkisinin karşılaştırıldığı çalışmalar çok sınırlıdır. Bu çalışmada, GSH sentezi için hücre içi serbest -SH seviyesini arttırmada substrat

olarak hangisinin daha etkili olduğunu ortaya çıkarmak için eritrositlerde L-sistein ve NAC alımı karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlara göre hücre içi serbest -SH seviyelerini arttırmada L-sisteinin NAC'ye göre daha etkili olduğu gösterilmiştir.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

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

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

Board (1981), insan eritrositlerinden glutatyon -S konjugatlarının transportu üzerine çalışmalar yapmış ve konjugasyon reaksiyonlarının, glutatyon -S transferaz enzimi tarafından katalizlendiğini belirtmiştir. Çalışmalarının sonucunda tespit edilen GSH ve GSSG, başlangıç GSH'nin % 70'inin glutatyon -S konjugatlara dönüştüğünü ve hücrelerden transport edildiğini bildirmiştir.

Eckert ve Eyer (1986), eritrositlerde ksenobiyotik ve glutatyon -S konjugatlarının oluşumunu ve transportunu incelemişlerdir. Aminofenollerin reaksiyonları üzerine yaptıkları çalışmada 4-dimetil aminofenol (DMAP) üzerine yoğunlaşmışlardır. DMAP'nin 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 GSDNP (S-(2,4-dinitrofenil) glutatyon)'nin ATP bağımlı transport edildiğini bildirmişlerdir.

Ohutsuka ve ark. (1988), eritrositlerde sistin transportu üzerine yaptığı araştırmada normal eritrositlerin oluşum safhasından sonra çekirdeklerini ve birçok sitoplazmik enzimlerini kaybettiklerini ve bu yüzden protein sentezi yapamadıklarını

ancak, hücrelere taşınan aminoasitlerin GSH sentezi için gerekli olduğunu ileri sürmüşlerdir.

İnci ve ark. (1998), yaptıkları çalışmada 20 adet karsinomlu dokuda lipit peroksidasyonu (TBARS) ve antioksidan statü göstergeleri GSH, glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSSG-Rd) ve süperoksit dismutaz (SOD) düzeylerini belirlemişlerdir. TBARS ve GSH düzeyleri ile GSH-Px aktivitesi sağlam dokulara göre kanserli dokularda daha yüksek bulunmuştur. Kanser lipit peroksidasyonunu indükler ve oluşan oksidatif strese karşı antioksidan sistem uyarılır sonucuna varmışlardır.

Ulakoğlu ve ark. (1998), strese bağlı mide mukozası hasarında endojen glutatyon tükenişinin enerji metabolizması ile ilişkisini inceledikleri çalışmada hareketsizlik nedeniyle stres ülseri gelişen sıçan mide mukozalarında, ATP değişiminin GSH düzeyini nasıl etkilediği ve serbest radikallerin detoksifikasyonu sırasında GSH'nin GSSG'ye dönüşümünü katalizleyen GSH-Px aktivitelerini araştırmışlardır. Sonuç olarak stres ülseri gelişen sıçanların mide mukozasında GSH ve ATP düzeylerinde kontrol gruplarındakilere oranla anlamlı azalmalar olduğunu gözlemlemişlerdir.

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

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

Sies (1999), hücre fonksiyonlarda glutatyonun rolünü incelemiştir. GSH'nin tiyol redoks durumunu kapsayan biyolojik olaylarda görev alan bir tripeptit yapısı olduğunu belirtmiştir. Salınımının karaciğerde gerçekleştiğini ve GSSG'nin üretiminde olduğu gibi diğer dokulara kan yoluyla ulaştırıldığını ve bu yolun merkapturik asit biyosentezinde zorunlu bir basamak olan S-konjugatların transportu için de kullanıldığını bildirmiştir.

Cengiz ve Cengiz (2000), tip 2 diyabetli hastalarda C vitamininin glikozillenmiş hemoglobin (HbA1c) ve GSH düzeyleri üzerine etkisini incelemişler. 30. gün ve 60.

gün sonunda HbA1c düzeylerinde ise anlamlı bir azalma ve GSH düzeylerinde anlamlı bir artma görülmüştür. Bulgulara göre, C vitamini antioksidan etkiyi arttırmış ve nonenzimatik glikolizlenmeyi azaltmıştır.

Zou ve ark. (2001), CDNB'nin kırmızı kan hücreleri üzerindeki etkilerini belirlemek için çalışmışlardır. CDNB'nin glutasyon 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 fragmantasyon ve polimerizasyonunun sebebi olduğu belirlenmiştir.

Badaloo ve ark. (2002), şiddetli malnütrisyon görülen çocukların normalden daha fazla oksidan hasara maruz kaldıklarını belirtmişlerdir. Bu çocuklarda GSH'nin düşük konsantrasyonlarda bulunduğu bildirilmiştir. Bunun nedeni GSH sentezinin çok yavaş olması ve öncü aminoasit olan L-sisteinin hücre içi ve hücre dışı konsantrasyonlarının azlığı olarak gösterilmiştir. Çalışmada, tedavinin erken evresinde ek besin olarak L-sistein alımının çocuklarda normal GSH sentez oranı ve GSH konsantrasyonu sağlayıp sağlamadığı araştırılmıştır. Eritrositlerin L-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 artışın ek besinin eritrosit L-sistein konsantrasyonu üzerinde etkili olmasıyla sağlandığı bildirilmiştir.

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

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

gelişimi 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.

Wu ve ark. (2004), glutatyon metabolizması ve sağlık açısından önemi üzerine hayvanlar ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, besinlerle alınan proteinlerin vücuttaki GSH dengesinin devamlılığının sağlanmasında son derece önemli olduğunu saptamışlardır. Besinlerle ek olarak alınan sistin, metiyonin, NAC ve L-2-oxothiazolidin-4-karboksilat'ın doku glutatyon sentezi için etkili L-sistein öncülleri olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada oksidatif stresin yaşlanma ve alzheimer, parkinson, karaciğer, orak hücre anemisi, AIDS, kanser, inme, kalp krizi, diyabet gibi birçok hastalığın gelişmesinde anahtar rol oynadığını ve glutatyonun, oksidatif strese karşı savunmada görev aldığını bildirmişlerdir.

Raftos ve ark. (2007), insan eritrositlerinde NAC'nin alımı ve deasetilasyonunun kinetikleri üzerine yaptıkları çalışmada, NAC transportunun %56'sının anyon değişim proteini (AE1) ile gerçekleştirildiğini bildirmişlerdir. Eritrositlerde NAC transportu için diğer bir olası yol olarak görülen, laktat anyonlarının çıkışını kolaylaştıran, H<sup>+</sup>/monokarboksilat kotransporterin NAC girişine etkisinin olmadığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca, eritrositleri GSH tüketiminden sonra L-sistein ve NAC ile inkübe ederek hem L-sistein hem de NAC'nin GSH yenilenmesini desteklediğini fakat L-sisteinin NAC'ye göre çok daha etkili olduğunu göstermişlerdir.

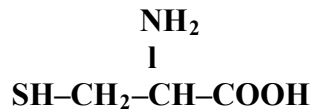
### **2.1. L- Sistein**

L- Sistein, serbest -SH grubu içeren bir aminoasittir. Hücrede protein sentezi için gerekli olmakla birlikte, önemli bir tripeptit olan glutatyonun fonksiyonel -SH grubu bu aminoasidin varlığından kaynaklanmaktadır (Griffith, 1999). L-sistein memelilerde esansiyel aminoasit olan metiyonin ve nonesansiyel serinden sentezlenmektedir. Bu metabolik yolda metiyoninin sülfür atomu serindeki hidroksil grubunun oksijen atomu yerine transfer edilecek olursa L-sistein meydana gelmektedir (Gözükara, 2001). L-sisteindeki sülfhidril grubu, metiyoninden, karbon iskeleti ise serinden gelmektedir. Bu iki aminoasit birleşerek L-sisteini meydana getirmektedir (Conway ve ark., 2000). Vitamin B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> ve folat, L-sistein sentezini düzenleyen pek çok reaksiyonda yer alır. Homosistein ve metiyoninin birbirine dönüşümü çok hızlı

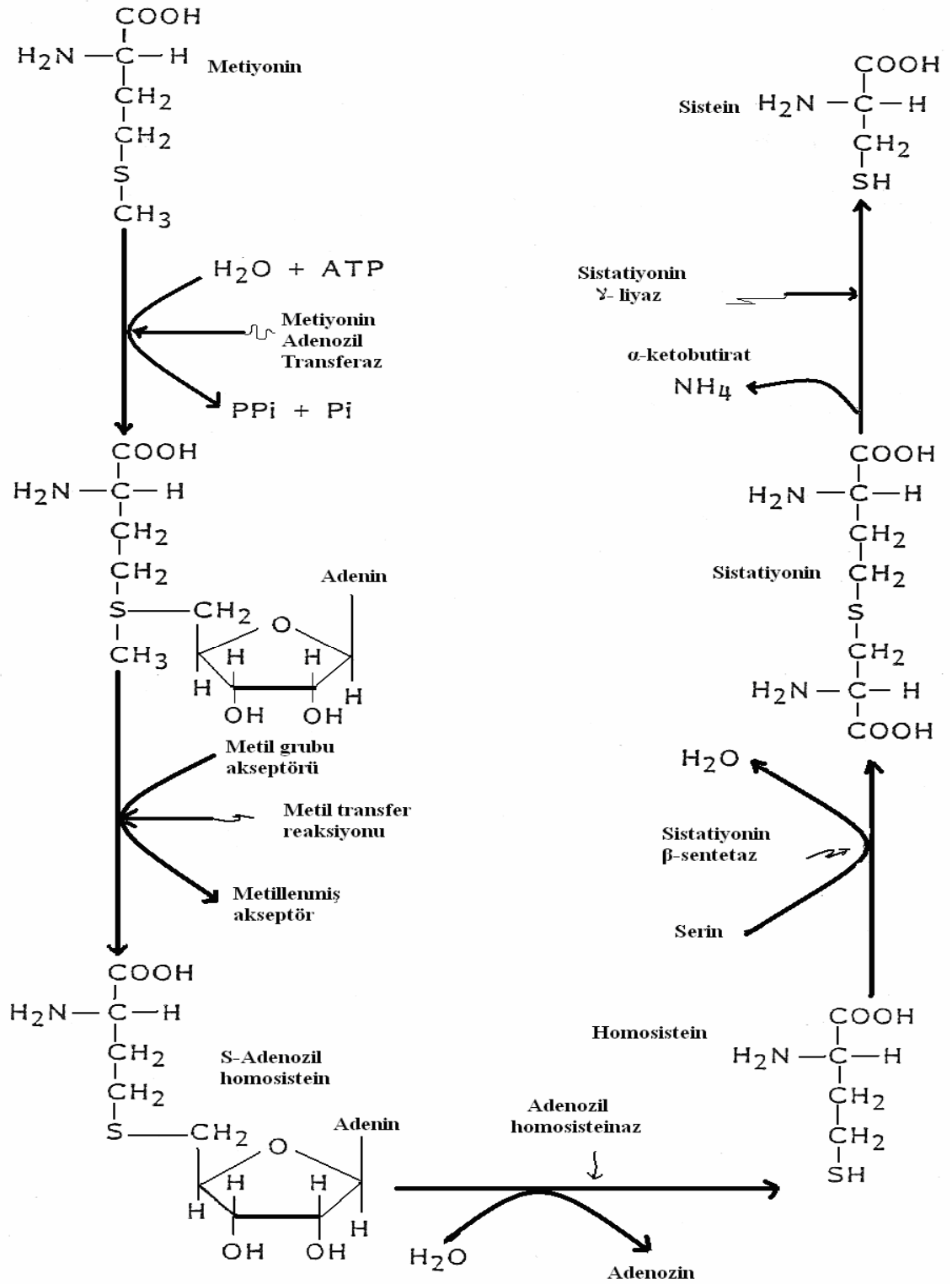
gerçekleşir. Hücrede metiyonin arttığı zaman, homosistein sistatyonin sayesinde L-sisteine katalizlenir (Zhang ve ark., 2003). L-sistein besinlerle alınan esansiyel olmayan bir aminoasittir (Conway ve ark., 2000). Hücresel ortamda metiyonin var olduğu sürece L-sistein metiyoninden sentezleneceği için L-sistein esansiyel bir aminoasit olarak kabul edilmemektedir. Şekil 2.1’de L-sisteinin kimyasal yapısı ve şekil 2.2’de biyosentezi görülmektedir. L-sistein, bütün hücrelerin sitozolünde GSH sentezine katılan bir aminoasittir (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’yi yüksek miktarda ihtiva ederler (Luun ve ark., 1979).

Hücre içerisine alınan L-sistein, oksidatif stres ve çeşitli toksik ajanlara karşı hücreleri koruyan GSH’nin sentez hızını belirler ve hücre içi konsantrasyonunun dengede tutulmasında rol oynar (Bender ve ark., 2000). L-sistein, hücre içi antioksidan olarak karsinojenlerin detoksifikasyonunda da görev alır. L-sistein ve L-sistein türevleri fizyolojik şartlar altında reaktif oksijen türleri tarafından oluşturulan transkripsiyon faktör nükleer faktör  $\kappa$ B bağlı (NF- $\kappa$ B) genlerin ekspresyonunu 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). L-sistein vücuttaki toksik maddeleri temizler bu sayede hücreleri korur. Hücreleri radyasyonun zararlı etkilerinden korumasının yanı sıra beyin ve karaciğeri de sigara ve alkolün zararlarından korur. L-sisteinin respirator kanalda mukusu parçalama özelliği olduğundan genellikle bronşit, amfizem ve tüberküloz tedavisinde faydalıdır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, oksidasyon sonucu büyük moleküllerde geri dönüşümsüz hasar meydana geldiğini ve uyarı mekanizmalarında hasar oluşumuna neden olduğunu göstermektedir. Daha çok L-sistein tiyollerini hedef alan oksidasyonun, enzimlerin, reseptörlerin, iyon kanallarının, taşıyıcılar ve transkripsiyon faktörlerinin fonksiyonları için tehdit oluşturduğu tespit edilmiştir (Jones ve ark., 2002).



Şekil. 2.1. L-Sisteinin kimyasal yapısı (Gözükara, 2001)



Şekil 2.2. L-sistein aminoasitinin biyosentezi (Gözükara, 2001)



L-sistein, memeli sistemlerinde normalin üstündeki konsantrasyonlarda toksik bir etki meydana getirdiğinden ortamdan hızlıca otookside edilerek uzaklaştırılır. Bu sayede plazmada düşük konsantrasyonlarda tutulması sağlanmış olur (Jones ve ark., 2002).

L-sisteinin hücre içerisine alınımı, genelde  $\text{Na}^+$  ve ATP'ye bağımlı ASC sistemi ve  $\text{Na}^+$  dan bağımsız taşıyıcı sistemler tarafından gerçekleştirilmektedir (Palacin ve ark., 1998). Sodyumdan bağımsız anyonik aminoasit taşıyıcı sistem  $\text{Xc}^-$  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. N-asetil-L-sistein (NAC)

NAC, L-sisteinin N-asetillenmiş formudur. NAC, L-sistein ve indirgenmiş glutatyonun öncülüdür. NAC, güçlü ve önemli bir antitoksin olup immün sistemi desteklemektedir. Hem L-sistein hem de metiyonin glutatyonun öncülleridirler ancak NAC daha iyi bir öncüldür. L-sistein sindirim sırasında sülfür grubunun yaklaşık olarak %85'ini kaybederken, NAC daha karalı bir bileşik olup kayıp sadece %5'tir (Kennedy ve Rosa, 2000). NAC hücrelerde sülfhidril gruplarının kaynağı olup,  $\cdot\text{OH}$  gibi reaktif oksijen radikalleriyle etkileşerek serbest radikalleri temizler. NAC'nin kullanıldığı değişik hastalıklar arasında kanser, kardiovasküler hastalıklar, metal toksisitesi ve karaciğerin parasetamol toksisitesi sayılabilir (Li ve ark., 2003). NAC apoptozu önleyebilmekte, çeşitli proteinlerin aktivitelerini düzenleyerek hücre yaşamını desteklemektedir. NAC, endotelyal disfonksiyonunu azaltmakta, inflamasyon, fibroz, invazyon, kartilaj erozyonu, asetaminofen detoksifikasyonu ve transplantasyon ihtiyacının geciktirilmesini sağlamaktadır (Foresti ve ark., 1999). NAC asetaminofen toksisitesinde ve alkol toksisitesinde 10-18 saat içinde verildiği takdirde karaciğeri hasardan korumakta ve mortaliteyi azaltmaktadır (Li ve ark., 2003).

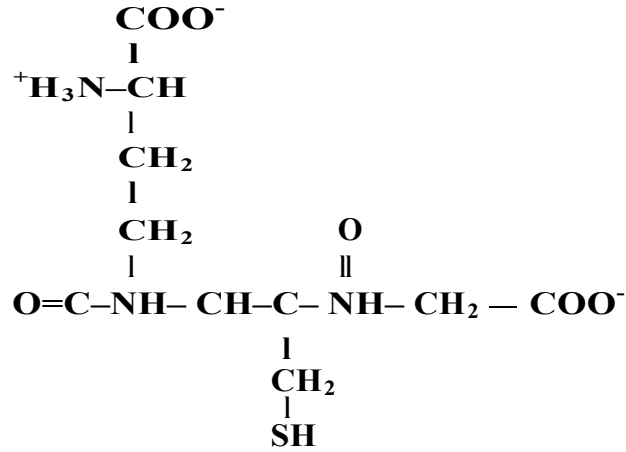
Antitoksisitesindeki muhtemel mekanizmalar karaciğer kan akımını artırması, glutatyon artışı ve serbest radikalleri temizlemesi sayılabilir (Jones, 1998). NAC sıçanlarda toksik kadmiyum ile birlikte verildiğinde de lipid peroksidasyonunu önleyerek karaciğer toksisitesini azaltmaktadır (Shaikh ve ark., 1999). Kokain ile gelişen karaciğer hasarı da NAC ile azaltılabilmektedir (Zaragoza ve ark., 2001).

Karaciğer transplantasyonunda reperfüzyon ile gelişen oksidan hasar da NAC ile anlamlı derecede azaltılabilmektedir. Mevcut bilinen etkinlikleriyle NAC, karaciğerde oksidatif strese karşı tedavi edici etki ile transplantasyon hasarı, alkolizm, metal toksisitesi ve fibrozda tedavi rolü oynayabilir (Zafarullah ve ark., 2003). Ek olarak alınan NAC karaciğer, akciğer, börekler ve kemik iliğinde GSH seviyesini arttırarak yaşlanmayı geciktirici bir etkiye sahip olabilir. NAC iyi tolere edilir, iyi emilir, enzimatik bozulmaya dirençlidir. Oral olarak alındığında L-sistein ve internal GSH seviyelerini yükselttiği ispatlanmıştır (Kennedy ve Rosa, 2000).

Serbest oksijen radikallerin patogenezdaki rolü nedeniyle, antioksidanlar kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA) tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle antioksidan olarak NAC'nin atak sıklığını azalttığı ve atak tedavisinde kullanılabileceği gösterilmiştir (Hansen ve ark., 1994 ). NAC hücre içinde L-sistein için bir kaynaktır ve hücre içi L-sistein, glutatyon redoks sistem üretimini sağlar. NAC hidrojen peroksit ile gelişen epitel hücre hasarını ve sigaranın neden olduğu inflamatuvar hücre artışını azaltır (Herwaarden ve ark., 1996). KOA'lı hastalarda yapılan çalışmalarda NAC'nin balgam viskozitesinde azalma, balgam hacminde artma, ekspirasyonda kolaylık, öksürük, nefes darlığı ve alevlenme sayısında azalma gibi etkilerinin olduğunu gösterilmiştir (Türker, 2000).

### **2.3. Glutatyonun Yapısı ve Görevleri**

GSH, vücudun birçok hücresinde bulunan ve hücrenin fonksiyonel proteinlerini oksidan ajanlara karşı koruyan bir tripeptittir (Champe ve ark., 1997). Glutamik asit, L-sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşan GSH, hemen hemen bütün hücrelerde oldukça yüksek konsantrasyonlarda (0,1-10 mM) mevcuttur (Rose, 1984; Zhao, 2001). Glutatyon, organizmada tiyol grubu içeren, düşük moleküler ağırlıklı önemli bir tripeptid olup (Ulakoğlu ve ark., 1998), moleküler ağırlığı 307 gramdır. İlk kez 1921 yılında Hopkins tarafından keşfedilmiştir. İlk önceleri glutamil-sisteinden ibaret bir dipeptit olduğu düşünülmüş ancak 1929 yılında kristal halde elde edildikten sonra yapısının tripeptit olduğu anlaşılmıştır. 1935 yılında ise Harrington ve Mead tarafından  $\gamma$ -L-glutamil-sisteinil-glisin halinde sentez edilmiştir (Gözükara, 1989).



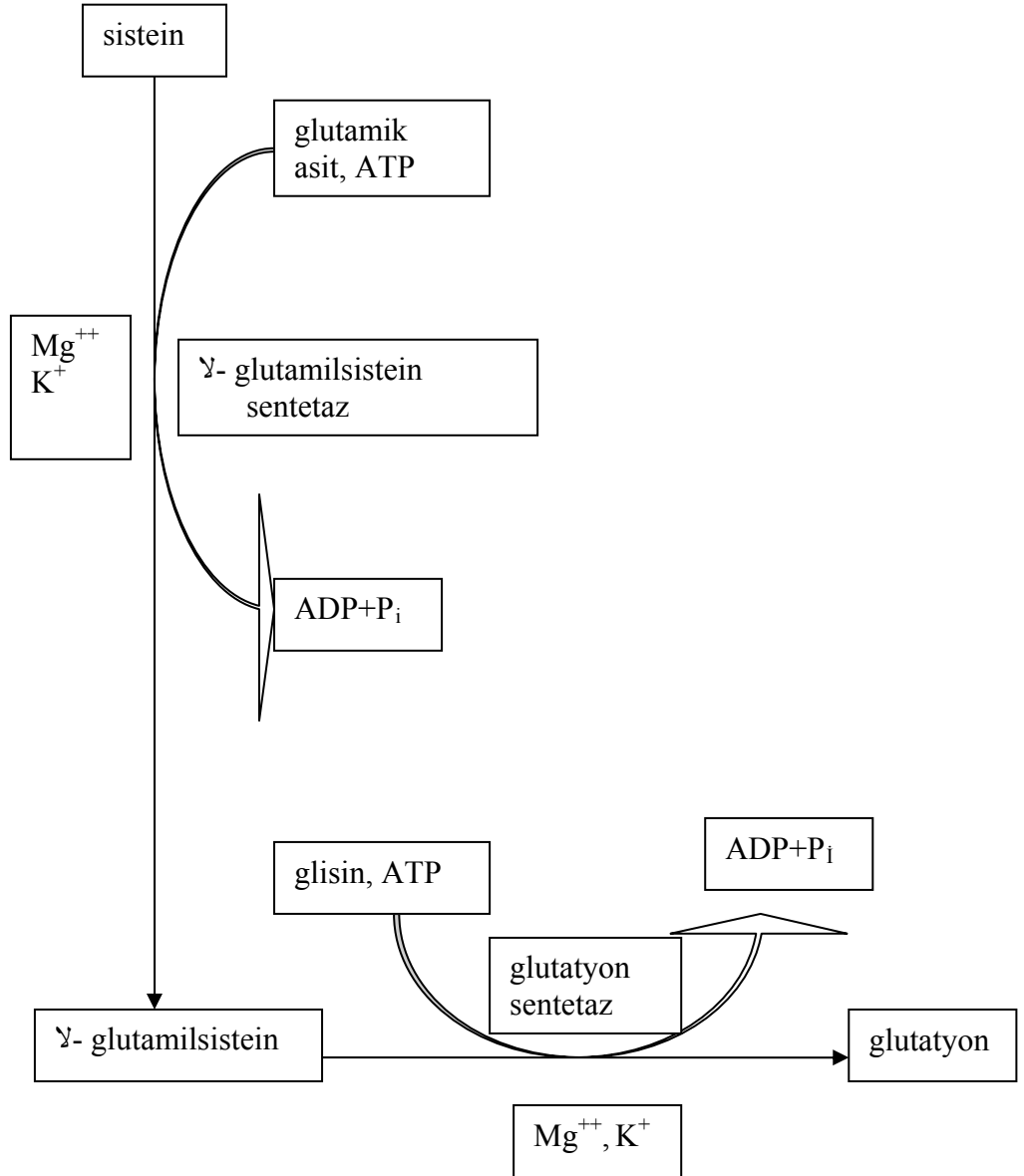
Şekil 2.3. Glutatyonun kimyasal yapısı (Ciliv, 2000)

GSH'deki en aktif grup tiyol grubudur. GSH'deki tiyol grubunun oksitlenmesi ile oluşan GSSG (glutatyon disülfid), antioksidan özelliğini kaybeder. Tiyol grubunun asitliği GSH'nin kendi anyonu (RS<sup>-</sup>) ile sulu çözeltilerde kuvvetlice reaksiyon vermesine sebep olur. Reaksiyonun oluşma sıklığı ortam pH'sının artışı ile doğru orantılıdır. Hücrede bulunan GSH'nin üçte bire yakın miktarı disülfid şeklinde ve tiyol grubu içeren L-sistein, koenzim A gibi bileşikler ile beraber bulunur (Zhao, 2001).

Glutatyon sentezi iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta, glutamilsistein sentetaz isimli enzim, glutamat ve L-sisteinden, glutamilsisteinin oluşumunu katalizler. İkinci basamakta ise, glutatyon sentetaz, glisin ve glutamilsisteinden glutatyonu oluşturur. Glutatyon negatif feedback ile glutamilsistein oluşum hızını ve böylelikle kendi sentezini denetler. Bu sentezde bir molekül glutatyon için, iki ATP'nin hidrolizi gerekir (Ulakoğlu ve ark.,1998).

GSH, DNA sentezinde ve hasarlı DNA parçalarının onarılmasında, metabolik fonksiyonların yerine getirilmesinde, zehirli maddelerin inaktif hale dönüştürülmesinde ve serbest radikallerin olası hasarlarının önlenmesinde görev yapmaktadır (Chavan ve ark., 2005). Glutatyonun, en önemli görevi hücre savunmasında bir antioksidan olarak rol almasıdır. Hücre içi indirgeme reaksiyonlarında, kataliz olaylarında, metabolizmada ve aminoasitlerin transportunda önemli rol oynar. Hücreleri, serbest radikallere, reaktif oksijen türlerine, iç ve dış kaynaklı toksik bileşiklere karşı korur (Rose, 1984). Ayrıca DNA ve protein sentezleri, membran bütünlüğünün korunması, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi gibi hücresel fonksiyonlara da sahiptir (Skryzdlewska ve Farbiszevski, 1999).

GSH eriyebilir bir antioksidan olarak görev yapar ve hücreyi serbest radikallerin etkilerine ve lipid peroksidasyonuna karşı korur (Clemens ve Waller, 1987; Gille ve Sigler, 1995). Aynı zamanda GSH çeşitli ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda da rol oynamaktadır (Awasthi ve ark., 1983; Eckert ve Eyer, 1986; Ansari ve ark., 1987).

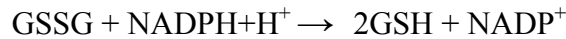


Şekil 2.4. Glutatyon sentezi (Woods ve Ellis, 1995)

Eritrositler, serbest radikallerce oluşturulan oksidatif strese ve yüksek oksijen basıncına maruz kaldıklarında kolayca hasar görebilirler. Bu nedenle etkin savunma mekanizmalarına sahiplerdir. Bu mekanizmalardan biri de GSH'dir (Mazzor ve ark.,1996) .

İndirgenmiş glutatyon (GSH), serbest sülfhidril grubu içeren bir tripeptittir. İndirgenmiş durumda glutatyon, hemoglobin ve eritrosit hücre proteinlerinin L-sistein kalıntılarını koruyan bir tampon olarak görev yapar. İndirgenmiş glutatyonun, oksitlenmiş forma oranı 500'dür (Murray ve ark., 1996). GSH, içerdiği tiyol grubu aracılığıyla hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlayarak, hücreyi oksidatif hasara karşı korur. Glutatyon peroksidazın (GSH-Px) kofaktörlüğünü yaparak, hidrojen peroksidi metabolize eder. Ayrıca organik peroksitlerin sebep olduğu detoksifikasyon reaksiyonlarında önemli rol oynar (Ulakoğlu ve ark.,1998).

İki glutatyon, disülfid bağı ile birleşir ve okside glutatyon (GSSG) meydana gelir. Daha sonra bu molekül pentoz fosfat yolunda sentezlenen NADPH+H<sup>+</sup> ile reaksiyona girip redükte hale geçer. Enzim, glutatyon redüktazdır (Gözükara, 1989).



**γ - Glu - Cys - Gly**

I

S

I

S

I

**γ - Glu - Cys - Gly**

Şekil 2.5. Okside glutatyon (Strayer, 1981)

Hücreler yüksek düzeyde oksidana maruz kaldığında, GSSG oluşumu metabolik sınırı aşmakta ve oksidatif stres oluşmaktadır. Detoksifiye olamayan oksidanlar membran lipitlerinin ve hücrenin çeşitli fonksiyonel ve yapısal proteinlerinin bozulmasına neden olmaktadır. Ayrıca GSSG'nin kendisi de, proteinlerin sülfhidril gruplarıyla (-SH) reaksiyonlaşarak kalıcı zararlı etkiler meydana getirmektedir. Bu son olaya bağlı hücre içi GSSG birikiminin, ATP'ye bağımlı bir taşıyıcı mekanizmanın varlığı ile bertaraf edildiği bildirilmiştir. Stresin yol açtığı iskemi sonucunda oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve serbest radikaller, glikoliz ve oksidatif fosforilasyonu inhibe ederek ATP

miktarının düşmesine yol açarlar (Ulakoğlu ve ark.,1998). Hayvanlar ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, besinlerle alınan proteinlerin vücuttaki GSH dengesinin devamlılığının sağlanmasında son derece önemli olduğu gözlenilmiştir. Besinlere ek olarak alınan sistin, NAC ve L-2-oxothiazolidin-4-karboksilat'ın doku glutatyon sentezi için etkili L-sistein öncülleri olduğu belirlenmiştir (Wu ve ark., 2004).

#### **2.4. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar**

Reaktif oksijen türlerinin kimyasal veya metabolik oluşumuna yol açan hücre içi ve/veya hücre dışı koşullar oksidatif stres olarak adlandırılır. Dış yörüngesinde eşleşmemiş elektron bulunan kısa ömürlü reaktif atom ve moleküller serbest radikal olarak, enzimatik ve enzimsel olmayan yapılardan oluşan, radikal ve reaksiyonlarını önlemeye çalışan maddeler antioksidan olarak tanımlanmaktadır.

Serbest radikaller ve reaktif maddeler ile bu maddeleri üreten tüm faktörler oksidan ve prooksidan olarak tanımlanır. Bir canlıdaki oksidan maddelerden kaynaklanan oksidasyon düzeyi, oksidan statü adı altında değerlendirilmektedir. Reaktif madde miktarındaki artışların hücresel homeostazisi olumsuz etkilemesi ancak, vücut sıvıları ve hücre membranlarında bulunan antioksidan maddelerce önlenabilir (Dündar ve ark., 1999a). Vücuttaki fizyolojik aktivitenin doğal ürünü olan serbest radikalleri, organizma doğuştan kazandığı çok hassas bir donanımla, oksidan-antioksidan denge olarak tanımlanabilecek bir çizgide tutmaya çalışır. Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki bu dengenin özellikle oksidanlar lehine bozulması, membran lipidleri, proteinler ve DNA gibi hücrenin önemli yaşamsal yapılarında bütünlüğün bozulmasına ve canlıda patolojik olayların gelişmesine yol açar. Antioksidan özelliği bulunan maddeler, radikalleri etki alanından temizleme, radikal üreten kimyasal reaksiyonları durdurma, reaksiyon hızını baskılama, moleküler hasarı onarma, hücresel enzim kinaz kayıplarını önleme, endojen antioksidan kapasiteyi arttırma gibi mekanizmalardan en az biri ile çalışarak oksidan-antioksidan dengesi korurlar (Dündar ve ark., 1999a).

Organizmaya ani ve aşırı miktarda oksijen girişi epinefrin ve diğer katekolaminlerin sentezinde artış, laktik asit, laktat dehidrogenaz, kreatin fosfokinaz gibi litik enzim aktivitelerinin yükselmesi; egzersiz, gebelik, yaşlılık 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, hassas olan oksidan-antioksidan denge, oksidanlar lehine bozulabilir. Bu olgu serbest radikallerin oluşumunun artışıyla ya da antioksidan aktivitesinin yetersizliğinden ileri gelebilir (Dündar ve ark., 1999a). Ayrıca pestisit ve herbisitler, X-ışınları, ilaçlar, güneş ışınları, hatta yiyeceklerde bulunan bazı bileşikler de serbest radikal oluşumuna sebep olabilirler (Alessio ve Blasi, 1997).

Serbest radikallerin hasarları nasıl oluşturduğunu çeşitli mekanizmalara dayandırmakla beraber bunların en etkili olanlarının; lipid peroksidasyonları, proteinler arası disülfid bağı oluşumu ve DNA hasarları olduğunu belirtmişlerdir (Ulakoğlu ve ark., 1998). Ayrıca serbest radikaller, hücre membran proteinlerini yıkarak hücre ölümüne ve bağışıklık sistemindeki hücreleri yok ederek bağışıklık sisteminin zorlanmasına sebep olurlar. Bu şekilde çeşitli stres modellerinin oluşumunu hızlandırdığı ve lipid peroksidasyonlarına da neden olan reaktif oksijen ürünlerinin vücutta oluşturduğu oksidatif hasara "oksidatif stres" adı verilmektedir (Ulakoğlu ve ark., 1998). Ayrıca oksidatif stresin, alzheimer hastalığı, parkinson hastalığı, karaciğer hastalıkları, orak hücre anemisi, AIDS, kanser, inme, diyabet ve kalp krizi gibi hastalıklarda anahtar rol oynadığı belirtilmiştir (Wu ve ark., 2004).

Bazı radikaller ve antioksidanların kimlikleri tablo 2.1 ve tablo 2.2'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Sık karşılaşılan radikaller, simgeleri ve kimlikleri (Dündar ve Aslan, 1999b)

Hidrojen	H <sup>·</sup>	Bilinen en basit radikal
Süperoksit	O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil	OH <sup>·</sup>	En toksik oksijen metaboliti radikal
Hidrojen peroksit	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Reaktivitesi düşük, hasar yeteneği zayıf
Singlet oksijen	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Güçlü oksidatif oksijen formu
Perhidroksi radikal	HO <sub>2</sub> <sup>·</sup>	Lipid peroksidasyonunu artırır
Peroksil radikal	ROO <sup>-</sup>	Lipidlere lokalize olur
Triklorometil	CCl <sub>3</sub>	Karaciğerde üretilir
Thyl radikali	RS <sup>·</sup>	Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içerir
Alkoksil	RO	Oksijen metaboliti
Nitrojen oksit	NO	L-arjinin aminoasitinden üretilir
Nitrojen dioksit	NO <sub>2</sub>	NO'in oksijenle reaksiyonuyla üretilir

Tablo 2.2. Bazı antioksidanlar (Aslan, 1999)

Süperoksit dismutaz	Süperoksidin giderilmesini sağlar
Katalaz	Yüksek konsantrasyonda H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'i yok eder
Glutatyon peroksidaz	Düşük konsantrasyonda H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'i giderir
Sitokrom oksidaz	Oksijen indirgeme reaksiyonlarında reaktif tür oluşumunu engeller
Vitamin E	Membran lipidlerinde çözünerek peroksidasyon zincirini kırar
Koenzim Q	Mitokondriyal enerji metabolizmasında antioksidan olarak rol alır
β karoten	Singlet oksijen oluşumunu engeller
Askorbik asit	OH'i giderir ve tokoferolu indirger
Transferin	Fenton reaksiyonunu inhibe eder
Laktoferrin	Düşük pH'ta demiri bağlar
Haptoglobinler	Hemoglobini bağlar
Hemopeksin	Serbest hem gruplarını bağlar
Albumin	HOCl radikalini toplar
Serüloplazmin	Süperoksit radikalini nötralize eder
Bilirubin	Peroksil radikalini toplar
Ürik asit	Metal bağlayıcıdır
Glikoz	OH radikalini giderir
Glutatyon	GSH redoks substratı olarak görev yapar
L-sistein	Organik bileşikleri indirger

### 2.5. GSH Metabolizması ve Antioksidan Rolü

GSH, biyolojik olarak iki önemli yapıyı (tiyol grubu ve γ-glutamil bağı) yapısında bulundurur. Yapısındaki L-sisteinin tiyol grubundan ve yüksek konsantrasyonundan dolayı (0.1-10 mM) hücre içinde önemli bir antioksidan olan GSH'nin %99'dan fazlası indirgenmiş formda bulunur (Meister, 1983; 1995). Bu formda tutulabilmesi pentoz fosfat metabolik yoluna bağlıdır. Bu yolda üretilen NADPH,



glutasyon disülfid redüktaz (GR)'ın katalize ettiği reaksiyonda koenzim olarak görev alır (Thorburn ve Kuchel, 1985).

GSH homeostazı hücresele düzeyde, biyosentez, oksidasyon, import ve eksport arasındaki dengeyle sağlanırken, doku düzeyinde GSH metabolizması ile ilgili işlemlere ve dokular arasındaki GSH akışına bağlı olarak düzenlenmektedir (Dass ve ark., 1992; Kaplowitz ve ark., 1996). Eritrosit hariç tüm hücrelerde gözlenen GSH salınımı, homeostatik mekanizmalar için önemli bir faktördür. GSH biyosentezinden sorumlu olan  $\gamma$ -glutamil döngüsü, koruyucu, metabolik, katalitik ve taşıma işlemlerinin bir kısmında, ayrıca GSH sentezi ve kullanımının düzenlenmesinde ve L-sisteinin taşınması ve depolanmasında oldukça önemlidir (Meister, 1995). GSH sentezi iki aşamada,  $\gamma$ -glutamilsistein sentetaz ve GSH sentetaz enzimleri aracılığıyla gerçekleşir. Glutasyonun derişimi, sentezinde kullanılan substratlarının teminine ve sentezinde görev alan enzimlerin derişimine bağlıdır. Hücreler glutamat ve glisinden zengindir, fakat L-sistein sınırlı miktarlarda bulunur. Bazı hücrelerde L-sistein oluşumu sistatyonin yolunda serinin metiyonin tarafından transsülfürasyonu ile başarılır. L-sistein aynı zamanda doku proteinlerinin yıkımından ve diyetle alınan proteinlerden de gelir.

Bu şartlar altında, iki sentetazın substratlarının derişiminin artmasıyla, glutasyon sentezi artar (Meister, 1985). Hücre içi glutasyon membrana bağlı transpeptidaza aktarılarak taşınır. GSH'ın membrana bağlı olan  $\gamma$ -glutamil transpeptidaza taşınması,  $\gamma$ -glutamil aminoasitlerin oluşumuna yol açmaktadır.  $\gamma$ -glutamil sistein taşınımı hücresele L-sisteinin korunmasında oldukça önemlidir (Meister ve Anderson, 1983; Meister, 1985).

Hücresele glutasyon taşınımı, tiyol gruplarını ve  $\alpha$ -tokoferol gibi diğer membran bileşiklerini koruyarak hücre membranının oksidan hasara karşı korunmasını sağlamakta, bunun yanısıra, serbest radikallerle direkt reaksiyonu ile glutasyon peroksidazlara ve glutasyon -S transferazlara substrat olmasıyla bir antioksidan olarak davranmaktadır (Meister, 1995; 1983).

Önemli bir indirgeyici güç olan GSH hücre içi proteinlerin, L-sistein, dihidrolipoat ve koenzim A gibi moleküllerin tiyol gruplarının, askorbat,  $\alpha$ -tokoferol gibi antioksidan moleküllerin korunmasında, ayrıca DNA'nın deoksiribonüklozit öncüllerinin oluşması için ribonükleotitlerin indirgenmesinde kullanılır. GSH ayrıca hücrelerin oksidatif hasara, toksik bileşiklere, radyasyona karşı korunmasında, bazı

ilaçların inaktivasyonunda, östrojen, prostaglandin ve lökotrienler gibi bazı endojen bileşiklerin metabolik işlemlerinde yer alır (Meister, 1983; 1988; 1991).

## **2.6. Eritrositler**

### **2.6.1. Eritrosit Membranının 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, glikoforin-A ve glikoforin-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). 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 protein, ankirin ile band 3 proteini arasındaki bağlantıyı sağlamlaştırdığı düşünülmektedir (Sadava, 1993).

### 2.6.2. Eritrosit Membranının Fonksiyonları

Eritrosit membranının kolay elde edilebilirliği, onu, üzerinde en çok çalışma yapılan biyolojik membran olmasını sağlamıştır. Eritrosit membranının birçok görevi vardır. Klorür/bikarbonat değişimi esnasında pH'ın sabit düzeyde tutulması, organik fosfatlar ve indirgenler gibi önem taşıyan bileşiklerin korunması ve çeşitli metabolik artıkların organizma dışına atılması gibi birçok önem taşıyan fonksiyonları yerine getirir (Patrick ve ark., 2004). Ayrıca glikolitik enzimleri inaktive ederek eritrosit metabolizmasının düzenlenmesi 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. Ayrıca hemoglobinin 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 adhezyon faaliyetlerini düzenler. Bu görevlerin yanı sıra reseptör fonksiyonlarının düzenlenmesi, transport işlemleri, hücrenin büyümesi ve antijenik aktiviteyi kontrol etmek gibi önemli görevler yapar (Malgorzata ve ark., 1987).

### 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, içyapılarını 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. Eritrosit glukozunun %90'ı glikoliz yolunda kullanılır. Reaksiyonlarda 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, GSSG'nin glutatyon redüktaz varlığında GSH'a indirgenmesi reaksiyonunda, hücre içi iyon bütünlüğünü korumada ve pentoz fosfat yolu için NADP<sup>+</sup>'yi yenilemede 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 olur.

Organizmanın diğer dokularında olduğu gibi glutatyonu indirgenmiş halde tutabilmek için NADP<sup>+</sup>'ye 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**

Pentoz fosfat yolu ile NADPH ve pentoz fosfatlar sağlanmaktadır. NADPH üretimi GSH metabolizmasında rol oynadığı için eritrositler için büyük 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 (Akkuş, 1995; Yalın ve ark., 2001). Peroksitler normalde, bir tripeptit olan GSH'nin redüksyonu ile inaktive olurlar. Birçok hücrede bol miktarda bulunan GSH'de serbest bir tiyol grubu bulunur ve bu grup oksidatif strese karşı koruyucu görev alır. GSH'nin kolay okside olma özelliğinden dolayı redükte -SH taşıyan bazı enzimlerin, hücre zarının ve hemoglobinin otooksidasyonundan korunarak, yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü sağlanır (Akkuş, 1995; Serteser, 1999; Keskin, 2001).

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

Hücre zarında bulunan bazı enzimler hidrojen peroksit gibi ajanlarla okside olurlarsa GSH, -SH grubunu proteine vererek oksidatif stresi önler. GSH peroksitlerin redüksiyonunu sağlar. Lipit peroksidasyonunu selenyum içeren GSH-Px eritrositte oluşan peroksit gruplarını zararsız hidroksil gruplarına çevirirken, GSH indirgenmektedir. Tripeptit yapısındaki GSH methemoglobin ve peroksitlerin indirgenmesi sırasında disülfitle bağlı GSSG'ye yükseltgenmektedir. GSSG'nin tekrar kullanılabilmesi için NADPH'ye bağlı glutatyon redüktaz ile indirgenmesi ve GSH'a dönüşmesi gereklidir. Pentoz fosfat yolunun birinci basamağında glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) aracılığıyla NADPH üretilir ve GSSG'nin GSH'ye dönüşümünü katalize eden glutatyon redüktaz, gerekli hidrojeni NADPH molekülünden alarak GSSG'ye transfer eder. Normal şartlarda glutatyonun % 99.8 i redükte formda (GSH), sadece % 0.2 si okside formdadır (GSSG). G6PD'nin G6P'yi 6-fosfoglukonolaktana dönüştürmesi sırasında G6P'nin 1. karbonundaki hidrojen NADP'ye aktarılarak NADPH oluşturulur. NADPH, GSH'nin sağlanması için glutatyon redüktazın koenzimi olarak çalışır. G6PD eksikliğinde, hücrenin redüktif kaynağı olan NADPH üretiminde bozukluk olacağından hücrede oksidatif stres oluşur.

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

### **2.7. Memeli Hücrelerinde Aminoasit Transport Sistemleri**

Hücre için gerekli olan aminoasitlerin plazma membranından hücre içine alınımı ve tekrar hücre dışına transferi bu aminoasitlere özgü transport sistemleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Aminoasit transport sistemlerini tanımlamada aminoasidin tipi (asidik, bazik, zwitteriyonik) ve transportun termodinamik özellikleri temel fonksiyonel kriter kabul edilmiştir (Palacin ve ark., 1998). Aminoasit transport sistemleri bu iyonik besinlerin hücreye girişine aracılık ederek bu besinlerin büyük önem taşıyan hücresel faaliyetlerde kullanılmasını sağlar. Nörotransmitter, sinaptik modülatör ya da nörotransmitter öncülü olarak etki gösteren spesifik aminoasitlerin 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, 1982; 1990;1993; Smith ve Cooper, 1992).

Aminoasitlerin plazma membranından transportları proteinler aracılığıyla olmaktadır. Proteinler aminoasitleri tanır, onlara bağlanır ve aminoasitleri 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 spesifitesidir (çeşitli aminoasitler bir transport sistemini paylaşırlar) (Palacin ve ark., 1998).

Zwitteriyonik aminoasitlerin taşınımında iki grup sistem tanımlanmıştır. Birinci grup, zwitteriyonik aminoasitler için ortak sistemler olan A, ASC ve L sistemleri olup bütün hücrelerde mevcuttur. Sistem A ve ASC küçük yan zincirli aminoasitlerin sodyumla simport taşınması gerçekleştirirken, sistem L büyük yan zincirli aminoasitlerin uniport taşınmasını gerçekleştirmektedir (Christensen, 1990). Sistem A için tercih edilen aminoasitler alanin, serin ve glutamin iken sistem ASC için alanin, serin ve L-sisteindir (Christensen ve ark., 1967; 1965). Sistem L'nin L<sub>1</sub> ve L<sub>2</sub> olmak üzere iki alt tipi mevcuttur. Bunlar farklı yaşlarda hepatosit ve hepatoma hücrelerinde bulunurlar. Buna göre zwitteriyonik aminoasitler pek çok hücrede Na ile birlikte taşınmaz. Epitel hücrelerinde geniş spesifiteli sistemler Na'un elektriksel gradientine bağlı olarak bu aminoasitleri toplarlar. N- metillenmiş aminoasitlerin transportu, sistem A'nın ayrımı için önemli bir kriterdir. 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.

İkinci grup sistemler, dokuya özgü sistemlerdir. L- glutamin, L- histidin ve L-asparajin aminoasitlerinin hepositlere transportu sistem N adı verilen sodyuma bağlı transport sistemiyle gerçekleştirilmektedir (Kilberg ve ark., 1980).

Sistem Gly, glisin ve sarkozin için özel olup, birçok hücre tipinde bulunur (Eavenson ve Christensen, 1967). Nörotransmitterlerin sodyum ve klorid bağımlı taşıyıcılarından GLYT<sub>1</sub> ve GLYT<sub>2</sub> sistem Gly'nin varyantları olarak kabul edilmektedir. Sistem BETA;  $\beta$ - 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).

Katyonik aminoasitlerin alınma aracılık eden beş adet transport sistemi tanımlanmıştır. Bu sistemlerin aktivitesi zwitteriyonik aminoasitlerle paylaşım kapasitesine ve sodyuma bağlılıkları ile katyonik aminoasitlere karşı olan afinitelerine göre ayırt edilmektedir (Closs, 1996).

Sistem  $y^+$  yüksek afiniteli katyonik aminoasitlerle, düşük afiniteli zwitteriyonik aminoasitlerin 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  $y^+L$  katyonik aminoasitleri sodyuma gereksinim duymadan yüksek afinite ile transport etmektedir (Deves ve ark., 1992). Küçük ve büyük zwitteriyonik aminoasitleri sodyum varlığında yüksek afinite ile transport etmektedir. Sodyum yokluğunda zwitteriyonik aminoasitleri düşük afinite 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 aminoasitlerin plazma membranından giriş çıkışını dengeler (Ruiz ve ark., 2003).

Bunların dışında sistem  $b^+$  katyonik,  $B^{0,+}$  ve  $b^{0,+}$  ise hem katyonik hem de zwitteriyonik aminoasitler için yüksek afiniteli geniş bir spesifiteye sahiptir (Palacin ve ark., 1998).

Anyonik aminoasitlerden L-Glutamat ve L-Aspartat, yüksek afiniteli sodyum ve potasyum bağlı sistem  $X^-_{AG}$  tarafından transport edilir (Guidotti ve Gazzola, 1992; Palacin ve ark., 1998). Bu sistem aspartat aminoasidinin D ve L stereoizomerleri için belirli bir afinite gösterir. Özellikle hepatositler, fibroblastlar ve embriyonik hücreler L- glutamat ve L- sistini sodyumdan bağımsız  $X^-_C$  antiport sistem aracılığıyla transport ederler. (Guidotti ve Gazzola, 1992).

ATP ve  $Na^+$ 'a bağlı transport sistemlerinin yanı sıra bağırsak, beyin ve böbrek gibi dokularda  $\gamma$ - glutamil siklusu diye adlandırılan bir sistem vardır. Bu sistemde, belli aminoasitler için glutatyon kullanılır. Glutatyonun glutamil kalıntısı membrana bağlı  $\gamma$ - glutamil transferaz tarafından katalizlenen bir reaksiyonla aminoasitlere transfer edilir. Böylece sitozolde  $\gamma$ - glutamil aminoasit ve sisteinglisin meydana gelir. Sisteinglisin hidroliz edilirken  $\gamma$ - glutamil aminoasit,  $\gamma$ - glutamilsiklotransferaz

etkisiyle serbest aminoasite ve 5-oksoprolin'e parçalanır. Böylece bir mol aminoasit hücre içine girmiş olur. Kullanılan enerji glutatyonun parçalanmasıyla elde edilir.  $\gamma$ - glutamil transferaz enzimi, glutamin, L-sistein ve diğer nötral aminoasitler karşı çok aktiftir. Aspartata, dallı zincirli aminoasitlere ve aromatik aminoasitlere karşı daha az aktiftir, proline ise inaktiftir (Kaya, 1993).



### 3.MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

N-asetil-L-sistein (NAC), N-etilmaleimid (NEM), L-sistein ve tüm diğer aminositler Sigma Chemical Co.'dan (St. Louis, Missouri, U.S.A), 5,5'-dithiobis-(-nitrobenzoate) (DTNB) Fluka BioChemica'dan (Switzerland), deneylerde kullanılan kan, SSK Hastanesi kan bankasından (Antakya), sağlıklı vericilerden 300 ml'lik üniteler şeklinde temin edilmiştir. Spektrofotometrik ölçümler için, Shimatzu 1240 spektrofotometre cihazı kullanılmıştır.

#### Eritrositlerin Hazırlanması

Sağlıklı insanlardan alınan heparinize kan, 2500 g de 5 dk. santrifüj edilerek plazma ve eritrositler birbirinden ayrılmıştır. Plazma ve beyaz kan hücrelerini ihtiva eden tabaka ortamdan uzaklaştırılmıştır. Elde edilen eritrosit yığı, iki hacim 8 mM glukoz içeren (Awasthi ve ark., 1983) potasyum-fosfat- tuz tamponuyla (PBS-glukoz) (9 hacim 0.15 M NaCl 1hacim 0, 1 M potasyum fosfat buffer, pH 7, 4) üç defa yıkanarak deneylerde kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

#### DENEY 1: Eritrositlerde L-sistein ve NAC alımının zamana bağlı değişimi

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları:

1. 8 mM glukoz içeren potasyum fosfat tuz tamponu (PBS-glukoz) (9 kısım 0.15 M NaCl, 1 kısım 0.1 M potasyum fosfat tamponu, 8 mM glukoz, pH 7.4)
4. 20 ml hacimde ayrı ayrı 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlarda L-sistein ve NAC içeren Krebs Ringer fosfat tamponu
5. Krebs Ringer fosfat tamponu (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM glukoz, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4)
6. Tris EDTA tamponu, pH 8.9 (400 mM Tris, 20mM EDTA)
7. %10'luk TCA ( Trikloroasetik asit) 100 ml
8. 2.9 mg DTNB ( 2.5 ml metanolde çözülmüş)

#### DENEY 2: Eritrositlerden L-sistein ve NAC çıkışının zamana bağlı değişimi

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları:

1. PBS-glukoz (pH 7.4)
2. Krebs Ringer fosfat tamponu
3. 20 ml hacimde ayrı ayrı 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlarda L-sistein ve NAC içeren

Krebs Ringer fosfat tamponu

4. 2.9 mg DTNB ( 2.5 ml metanolde çözülmüş)

5. Tris EDTA tamponu, pH 8.2

### **DENEY 3: Eritrositlerde L-sistein ve NAC alımına sıcaklığın etkisi**

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları:

1. PBS-glukoz (pH 7.4)

2. Krebs Ringer fosfat tamponu

3. 20 ml hacimde 5 mM konsantrasyonlarda L-sistein ve NAC içeren Krebs Ringer fosfat tamponu

4. %10'luk TCA, 100 ml

5. Tris EDTA tamponu, pH 8.9

6. 2.9 mg DTNB ( 2.5 ml metanolde çözülmüş)

### **DENEY 4: Eritrositlerden L-sistein ve NAC çıkışına sıcaklığın etkisi**

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları:

1. PBS-glukoz (pH 7.4)

2. Krebs Ringer fosfat tamponu

3. 20 ml hacimde 5 mM konsantrasyonlarda L-sistein ve NAC içeren Krebs Ringer fosfat tamponu

4. Tris EDTA tamponu, pH 8.2

5. 2.9 mg DTNB ( 2.5 ml metanolde çözülmüş)

### **DENEY 5: Hücre içi serbest-SH yenilenmesine L-sistein ve NAC'nin etkisi**

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları:

1. PBS-glukoz (pH 7.4)

2. Krebs Ringer fosfat tamponu

3. 20 ml hacimde 5 mM konsantrasyonlarda L-sistein ve NAC içeren Krebs Ringer fosfat tamponu

4. %10'luk TCA, 100 ml

5. Tris EDTA tamponu, pH 8.9

6. 2.9 mg DTNB ( 2.5 ml metanolde çözülmüş)

7. 1 mM NEM içeren Krebs Ringer fosfat tamponu

### **DENEY 6: Eritrositlerde, bazı aminoasitlerin L-sistein ve NAC alımına etkisi**

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları:

1. PBS-glukoz (pH 7.4)
2. Krebs Ringer fosfat tamponu
3. 20 ml hacimde 5 mM konsantrasyonlarda L-sistein, L-sistein + L-alanin + L-serin + L-glisin, NAC ve NAC + L-alanin + L-serin + L-glisin içeren Krebs Ringer fosfat tamponu
4. %10'luk TCA, 100 ml
5. Tris EDTA tamponu, pH 8.9
6. 2.9 mg DTNB ( 2.5 ml metanolde çözünmüş)

### **DENEY 7:Hücretsiz tamponda L-sistein ve NAC'nin stabilitesi**

1. Krebs Ringer fosfat tamponu
2. 20 ml hacimde 5 mM konsantrasyonlarda L-sistein ve NAC içeren Krebs Ringer fosfat tamponu
3. Tris EDTA tamponu, pH 8.2
4. 2.9 mg DTNB ( 2.5 ml metanolde çözünmüş)

#### **3.2. Yöntem**

Çalışmamız yedi aşamadan oluşmaktadır;

1. Aşamada, eritrositlerde zamana bağlı olarak L-sistein ve NAC alımı incelenmiştir.
2. Aşamada, eritrositlerden zamana bağlı olarak L-sistein ve NAC çıkışı incelenmiştir.
3. Aşamada, eritrositlerde, sıcaklığın L-sistein ve NAC alımına etkisi incelenmiştir.
4. Aşamada, sıcaklığın eritrositlerden, L-sistein ve NAC çıkışına etkisi incelenmiştir.
5. Aşamada, NEM ile ön muamele edilen eritrositlerde L-sistein ve NAC'nin serbest -SH yenilenmesine etkisi incelenmiştir.
6. Aşamada, bazı aminoasitlerin eritrositlerde L-sistein ve NAC alımına etkisi incelenmiştir.
7. Aşamada, L-sistein ve NAC'nin Krebs Ringer fosfat tamponunda stabilitesi incelenmiştir.

### **DENEY 1: Eritrositlerde L-sistein ve NAC alımının zamana bağlı değişimi**

Sağlıklı vericilerden elde edilen heparinize insan kanı iki hacim PBS-glukoz ile üç kez yıkanarak deneylerde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Daha sonra 1 ve 5'er mM konsantrasyonlarda L-sistein ve NAC içeren Krebs Ringer fosfat tamponundan 1000 µl, hazırlanmış eritrosit stokundan 250 µl alınarak ependorf tüplerine konulmuştur. 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 15, 60 ve 120 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra eritrositler 5 dakika 2500 g'de santrifüjlenerak süpernatant uzaklaştırılmıştır. Daha sonra deney ve kontrol grupları 1000 µl potasyum fosfat tuz tamponuyla bir defa yıkandıktan sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan eritrosit yığına 250 µl %10'luk TCA ile muamele edilerek eritrositler 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 karışım üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Serbest -SH konsantrasyonları 13.1 ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

### **DENEY 2: Eritrositlerden L-sistein ve NAC çıkışının zamana bağlı değişimi**

Sağlıklı vericilerden elde edilen heparinize insan kanı iki hacim PBS-glukoz ile üç kez yıkanarak deneylerde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Daha sonra 1 ve 5'er mM konsantrasyonlarda L-sistein ve NAC içeren Krebs Ringer fosfat tamponundan 1000 µl, hazırlanmış eritrosit stokundan 250 µl alınarak ependorf tüplerine konulmuştur. 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 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 2500 g'de 5 dk. süreyle santrifüj edilen tüplerden süpernatant uzaklaştırılmış ve eritrosit yığını üzerine 1000 µl PBS-glukoz eklenmiş sonra tekrar 2500 g'de 5 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılıp eritrosit yığını üzerine 1000 µl taze Krebs Ringer fosfat eklenerek 15, 60 ve 120 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra eritrositler 5 dakika 2500 g'de santrifüjlendikten sonra süpernatanttan 500 µl alınarak 1450 µl Tris-EDTA tamponuna (pH 8.2) ilave edilmiş ve 50 µl DTNB karışım üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra

spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Serbest -SH konsantrasyonları 13.1 ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

### **DENEY 3: Eritrositlerde L-sistein ve NAC alımına sıcaklığın etkisi**

Sağlıklı vericilerden elde edilen heparinize insan kanı iki hacim PBS-glukoz ile üç kez yıkanarak deneylerde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Daha sonra 5 mM konsantrasyonlarda L-sistein ve NAC içeren Krebs Ringer fosfat tamponundan 1000 µl, hazırlanmış eritrosit stokundan 250 µl alınarak ependorf tüplerine konulmuştur. 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 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra eritrositler 5 dakika 2500 g'de santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Daha sonra deney ve kontrol gurupları 1000 µl potasyum fosfat tuz tamponuyla bir defa yıkandıktan sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan eritrosit yığına 250 µl % 10'luk TCA ile muamele edilerek eritrositler 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 karışım üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Serbest -SH konsantrasyonları 13.1 ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

### **DENEY 4: Eritrositlerden L-sistein ve NAC çıkışına sıcaklığın etkisi**

Sağlıklı vericilerden elde edilen heparinize insan kanı iki hacim PBS-glukoz ile üç kez yıkanarak deneylerde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Daha sonra 5 mM konsantrasyonlarda L-sistein ve NAC içeren Krebs Ringer fosfat tamponundan 1000 µl, hazırlanmış eritrosit stokundan 250 µl alınarak ependorf tüplerine konulmuştur. 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 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 2500 g'de 5 dk. süreyle santrifüj edilen tüplerden süpernatant uzaklaştırılmış ve eritrosit yığını üzerine 1000 µl PBS-glukoz eklenmiş sonra tekrar 2500 g'de 5 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılıp eritrosit yığını üzerine 1000 µl taze Krebs Ringer fosfat eklenerek 4, 20 ve 37 °C'de 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra eritrositler 5 dakika 2500 g'de santrifüjlendikten sonra süpernatanttan 500 µl alınarak 1450 µl Tris-EDTA tamponuna

(pH 8.2) ilave edilmiş ve 50 µl DTNB karışım üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Serbest -SH konsantrasyonları 13.1 ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

#### **DENEY 5: Hücre içi serbest -SH yenilenmesine L-sistein ve NAC'nin etkisi**

Sağlıklı vericilerden elde edilen heparinize insan kanı iki hacim PBS-glukoz ile üç kez yıkanarak deneylerde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Hazırlanan eritrositlerden 250 µl alınarak ependorf tüplerine aktarılmıştır. Kontrol grubu eritrositler sadece 1000 µl Krebs Ringer fosfat ile diğer gruplar ise içinde 1mM NEM bulunan 1000 µl Krebs Ringer fosfat tamponu süspanse edilmiştir. Ependorflar 37 °C'de 30 dakika inkübe edilerek, kontrol grubu hariç, eritrositlerde serbest -SH tüketimi sağlanmıştır. İnkübasyondan sonra eritrositler 5 dakika 2500 g'de santrifüjlenerek 1000 µl potasyum fosfat tuz tamponuyla bir defa yıkandıktan sonra kontrol grubuna ve NEM grubuna 1000 µl Krebs Ringer fosfat diğer iki gruptan birine 5 mM L-sistein içeren, diğerine ise 5 mM NAC içeren 1000 µl Krebs Ringer fosfat eklenerek ependorf tüpleri yavaşça alt üst edilmiş ve 37 °C'de 60 ve 120 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra eritrositler 5 dakika 2500 g'de santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Daha sonra deney ve kontrol gurupları 1000 µl potasyum fosfat tuz tamponuyla bir defa yıkandıktan sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan eritrosit yığına 250 µl %10'luk TCA ile muamele edilerek eritrositler 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 karışım üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Serbest -SH konsantrasyonları 13.1 ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

#### **DENEY 6: Eritrositlerde, bazı aminoasitlerin L-sistein ve NAC alınma etkisi**

Sağlıklı vericilerden elde edilen heparinize insan kanı iki hacim PBS-glukoz ile üç kez yıkanarak deneylerde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Bu işlemde sonra içinde 5 mM L-sistein içeren Krebs Ringer fosfat, 5 mM L-sistein + L-glisin + L-serin + L-alanin içeren Krebs Ringer fosfat, 5 mM NAC içeren Krebs Ringer fosfat ve 5 mM NAC + L-glisin + L-serin + L-alanin içeren Krebs Ringer fosfat tamponlarından 1000 µl, hazırlanmış eritrosit stokundan 250 µl alınarak ependorf tüplerine konulmuştur. Kontrol grubu olarak 1000 µl Krebs Ringer fosfat tamponu ve 250 µl eritrosit içeren

ependorf tüpleri kullanılmıştır. Ependorf tüpleri yavaşça alt üst edilmiş ve 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra eritrositler 5 dakika 2500 g'de santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Daha sonra deney ve kontrol gurupları 1000 µl potasyum fosfat tuz tamponuyla bir defa yıkandıktan sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan eritrosit yığına 250 µl %10'luk TCA ile muamele edilerek eritrositler 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 karışım üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Serbest -SH konsantrasyonları 13.1 ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

#### **DENEY 7:Hücretsiz tamponda L-sistein ve NAC'nin stabilitesi**

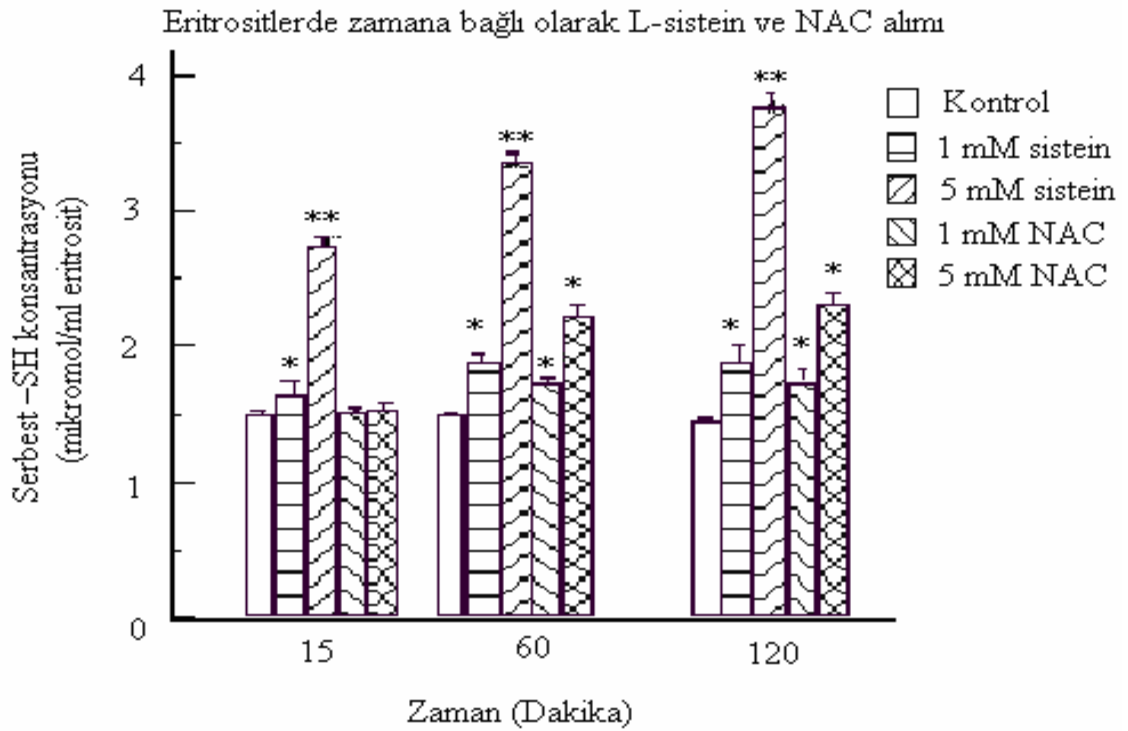
5 mM L-sistein ve 5 mM NAC içeren Krebs Ringer fosfat tamponlarından 1000 µl alınarak ependorf tüplerine aktarıldıktan sonra 37 °C'de, birinci gruptan süre beklenmeksizin diğer gurplardan ise 60, 120 ve 360 dakikalık inkübasyondan sonra 500 µl alınarak 1450 µl Tris-EDTA tamponuna (pH 8.2) aktarılmış ve 50 µl DTNB karışım üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Serbest -SH konsantrasyonları 13.1 ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

##### **3.2.1. İstatistiksel analizler**

Çalışmamızda tek yönlü değişim analizi (ANOVA) ve Student- Newman-Keuls çok yönlü karşılaştırma testleri kullanılmıştır. Testler, istatistiksel bilgi yöntemine dayalı olarak yürütülmüştür. Tüm testler üçlü örneklerle uygulanmıştır. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve  $\pm$  standart sapma olarak verilmiş ve  $p < 0.05$  değerleri istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Şekil 1'de eritrositlerde zamana bağlı olarak L-sistein ve NAC alımının karşılaştırılması gösterilmiştir. Sonuçlar eritrositlerin NAC'ye göre daha yüksek bir oranda L-sistein aldığını göstermiştir. 1 ve 5 mM L-sistein ile muamele edilen eritrositlerde serbest -SH seviyeleri 15 dk. da artmaya başladı. 1 ve 5 mM NAC ile muamele edilen eritrositlerde ise serbest -SH seviyeleri ancak ilk saatte önemli derecede artmaya başladı ve inkübasyon süresinin uzatılması NAC alımını değiştirmede. Bu sonuçlara göre kısa süreli muamelelerde eritrositler, L-sisteine göre NAC ile önemli bir miktarda serbest -SH sağlayamaz ve böylece serbest -SH ile ilgili hücre içi süreçler ertelenebilir. Diğer önemli nokta 5 mM L-sistein ile 60 dk. muamele ile elde edilen hücre içi serbest -SH seviyesine aynı konsantrasyonda NAC ile inkübasyon süresi uzatılsa bile erişilemeyecek olmasıdır.



Şekil 4.1. Eritrositlerde zamana bağlı olarak L-sistein ve NAC alımı

Farklı konsantrasyonlarda L-sistein ve NAC ile muamele edilen eritrositler belirli zaman periyotlarında 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda eritrositler santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırıldı ve eritrositler yıkandı. Sonra yıkanan eritrositlerde serbest -SH seviyeleri ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

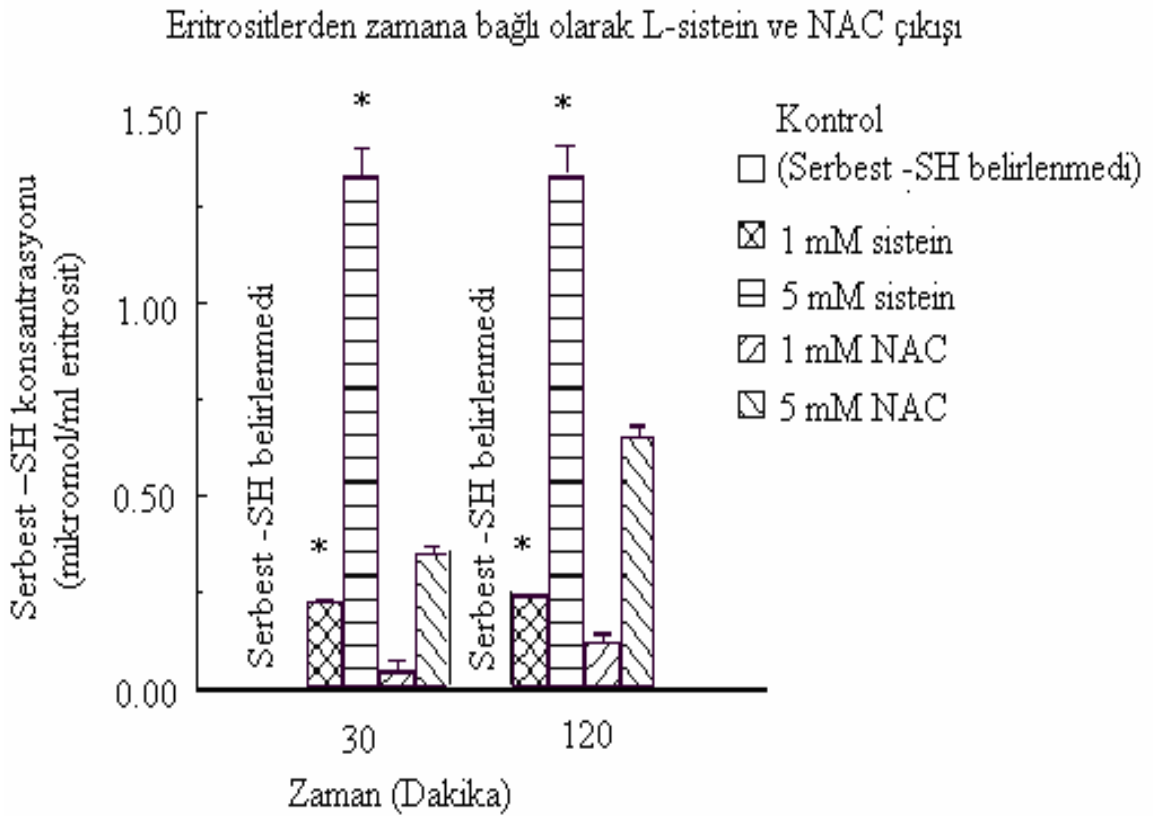
$p < 0.05$

\* Kontrol grubundan önemli derecede farklı değer

\*\* NAC grubundan önemli derecede farklı değer



Deneysimizin sonraki aşamasında L-sistein ve NAC ile ön muamele edilen eritrositlerde L-sistein ve NAC'nin çıkışını karşılaştırdık. Şekil 2'de gösterildiği gibi ortamda serbest -SH seviyeleri L-sistein ile ön muamele edilen eritrositlerde NAC ile ön muamele edilen eritrositlere göre daha yüksektir. Bu sonuçlar, daha az miktarda NAC hücrelere girdiği ve sonuç olarak ortamda daha az miktarda serbest -SH belirlendiğinden dolayı giriş çalışmalarıyla tutarlıdır. Bu sonuçlara göre hem L-sistein hem de NAC, hücre zarının her iki tarafındaki konsantrasyonlarına bağlı olarak hücre zarından iki yöne de hareket edebilir.



Şekil 4.2. Eritrositlerden zamana bağlı olarak L-sistein ve NAC çıkışı

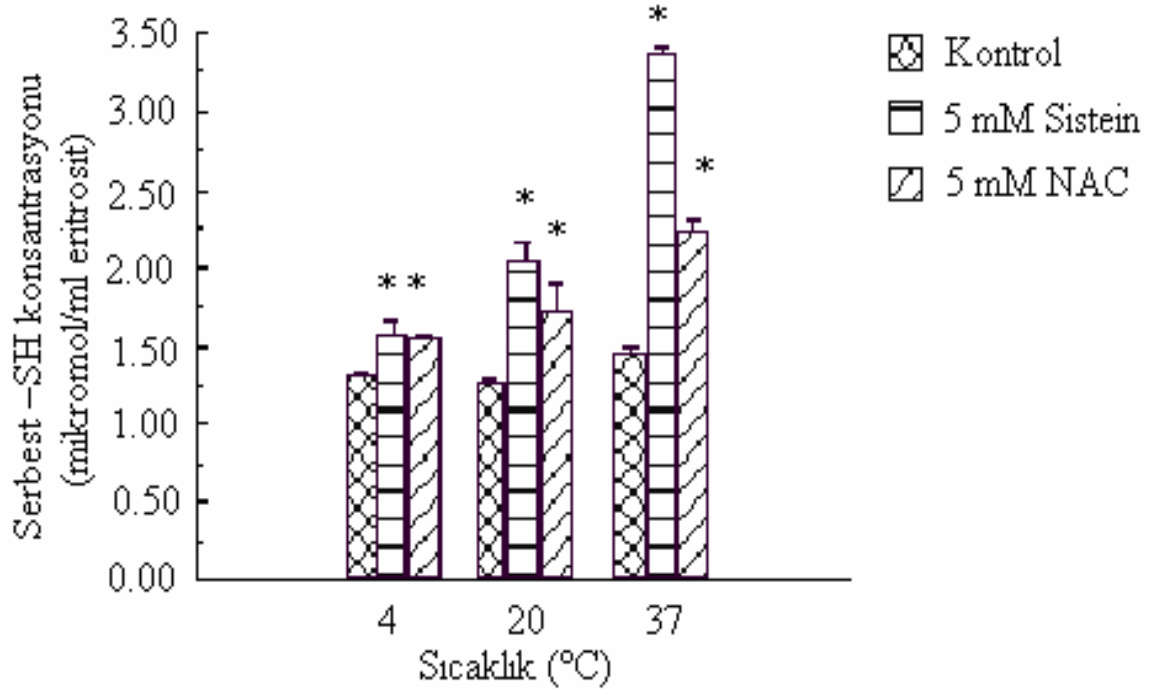
Eritrositler farklı konsantrasyonlarda L-sistein ve NAC ile muameleden sonra 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda eritrositler alınarak yıkandı. Yıkanan eritrositler daha sonra taze tampona aktarıldı ve 37 °C'de belirli zaman periyotlarında tekrar inkübe edildi. İnkübasyon sonunda süpernatantta serbest -SH seviyeleri ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

\*NAC grubundan önemli derecede farklı değer

Sonraki aşamada, L-sistein ve NAC'nin giriş ve çıkış süreçlerinin hücrel metabolik aktiviteye ve enerjiye bağlı olup olmadığını araştırdık. Farklı sıcaklıklarda deney tekrarlayarak bu süreçlerin pasif difüzyon ile olmaktan ziyade aktif olarak gerçekleştiğini gösterdik. Şekil 3 ve şekil 4'te gösterildiği gibi her iki sürecin de düşük sıcaklıklarda önemli ölçüde indirgenmesi hücre zarından L-sistein ve NAC geçişinin aktif hücrel olaylara bağlı olduğunu gösterir.

Eritrositlerde L-sistein ve NAC alınma sıcaklığın etkisi



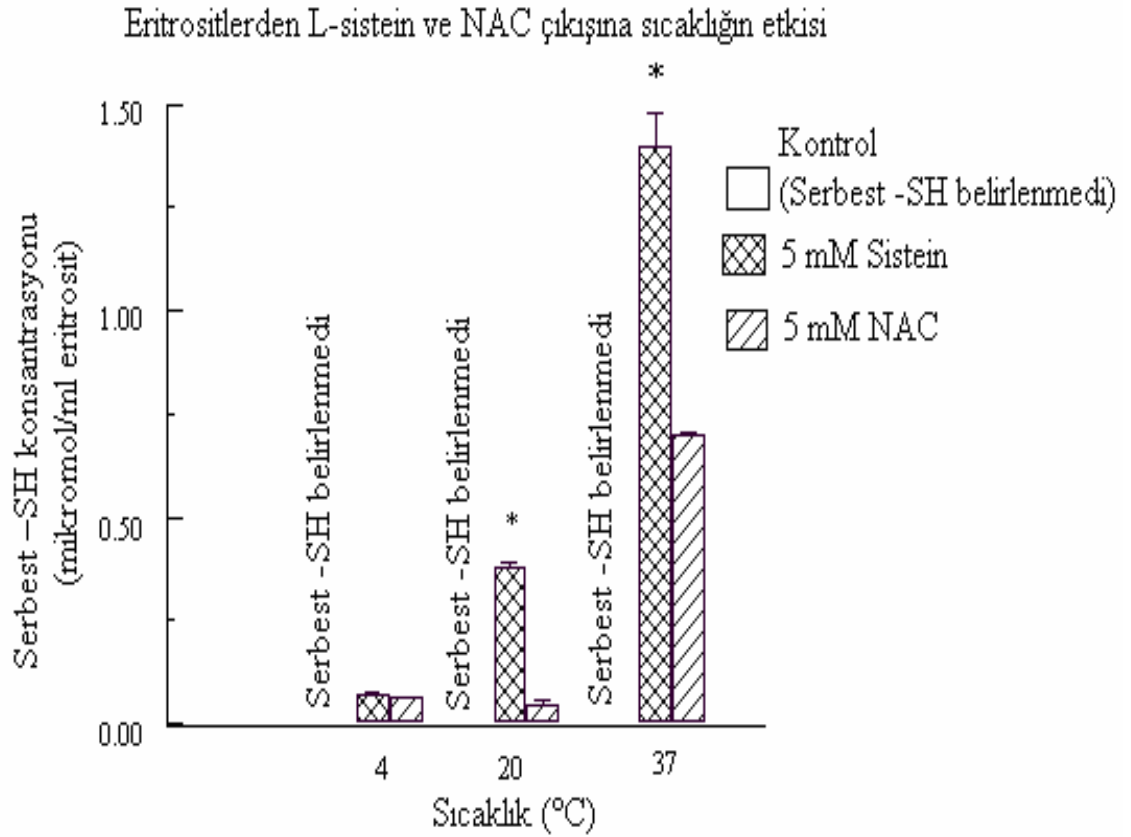
Şekil 4.3. Eritrositlerde L-sistein ve NAC alınma sıcaklığın etkisi

5 mM L-sistein veya 5 mM NAC ile muamele edilen eritrositler 4, 20 ve

37 °C'de 60dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonunda eritrositler alınarak yıkandı. Sonra yıkanan eritrositlerde serbest -SH seviyeleri ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

\* Kontrol grubundan önemli derecede farklı değer



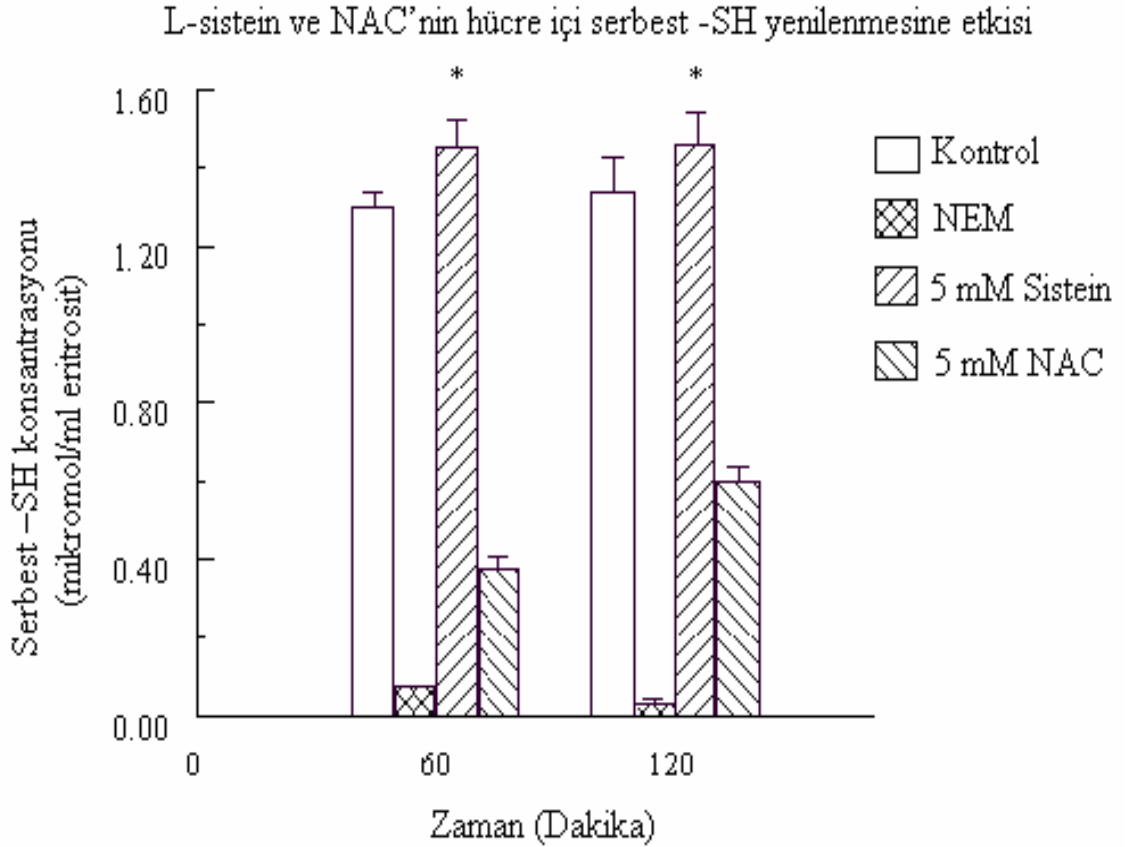
Şekil 4.4. Eritrositlerden L-sistein ve NAC çıkışına sıcaklığın etkisi

5 mM L-sistein ve NAC ile muamele edilen eritrositler 37 °C’de 1 saatlik inkübasyon sonunda sanrifüjlenerek PBS-glukoz ile yıkandı. Yıkanan eritrositler taze tampona alınarak 4, 20 ve 37 °C’de tekrar 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda eritrositler sanrifüjlendi ve süpernatantta serbest -SH seviyeleri ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

\* NAC grubundan önemli derecede farklı değer

Sonra hücre içi serbest -SH tüketimini müteakiben L-sistein ve NAC’nin hücre içi serbest -SH yenilenmesine etkilerini karşılaştırdık. Şekil 5’te gösterildiği gibi, 1 saat L-sistein muamelesiyle yenilenen serbest -SH seviyeleri kontrol seviyelerinin üzerindedir. Bununla birlikte, 1 saat NAC muamelesini müteakiben serbest -SH’nin yenilenme boyutu L-sisteine göre çok azdır. 2 saat NAC muamelesi bile kontrol seviyelerinin yarısının yenilenmesi için yeterli değildir.



Şekil 4.5. L-sistein ve NAC'nin hücre içi serbest -SH yenilenmesine etkisi

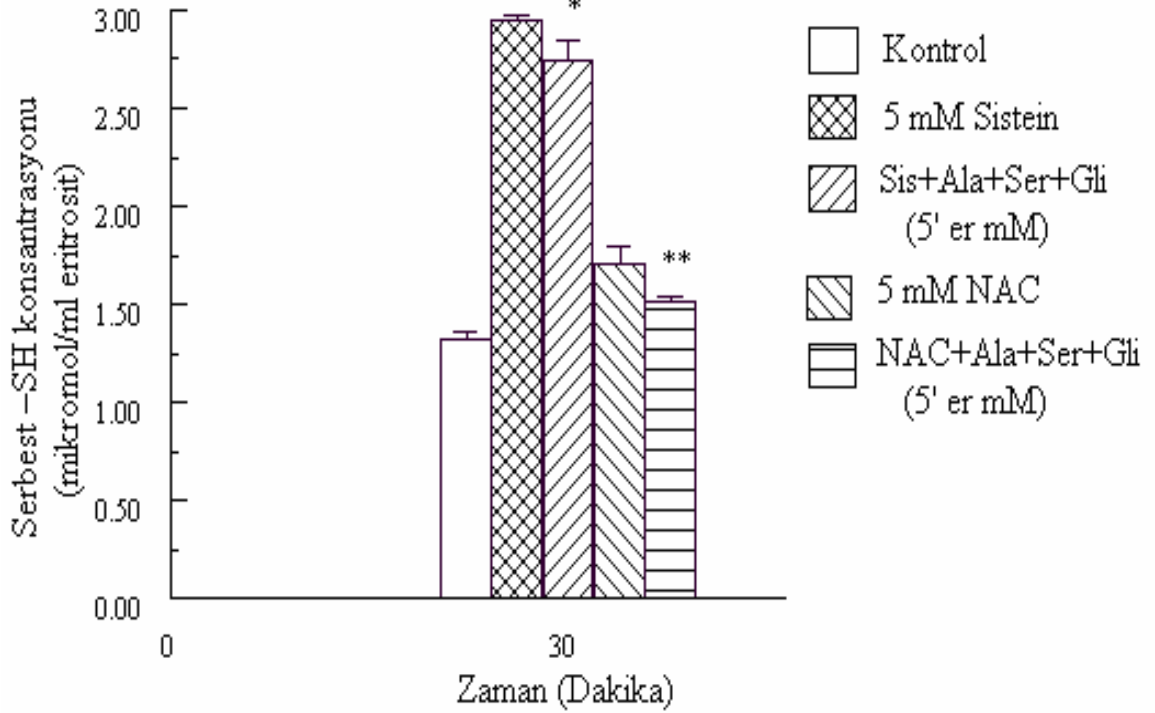
Eritrositlere, kontrol grubu hariç, 1 mM NEM ile 37 °C'de 30 dk. muamele edilerek eritrositlerdeki serbest -SH tüketildi. İnkübasyon sonunda eritrositler yıkandı ve NAC ve L-sistein varlığında ve yokluğunda 37 °C'de belirli zaman periyotlarında tekrar inkübe edildi. İnkübasyon sonunda eritrositlerde serbest -SH seviyeleri belirlendi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

\* Tüm diğer gruplardan önemli derecede farklı değer

Sonraki aşamada hücre zarında L-sistein ve NAC transportunun benzer taşıyıcılarla gerçekleştirilip gerçekleştirilmediğini araştırdık. L-sistein alanin, serin ve sistein taşıyan ASC sistemi ile taşınır. Bu şekilde bu substratlar ortamda bulunduğu L-sistein ve NAC girişini inhibe edip etmediğini araştırdık. Şekil 6'da gösterildiği gibi L-sistein ve NAC ile beraber alanin, serin ve glisin de bulunmasının alım sürecini önemli ölçüde inhibe etmesi, ASC sisteminin L-sistein ve NAC girişinde görev aldığını göstermektedir. Bu sonuç L-sistein ve NAC'nin benzer membran taşıyıcılarını ortak kullandığını gösterir.

## Bazı aminoasitlerin L-sistein ve NAC alımına etkileri



Şekil 4.6. Bazı aminoasitlerin L-sistein ve NAC alımına etkileri

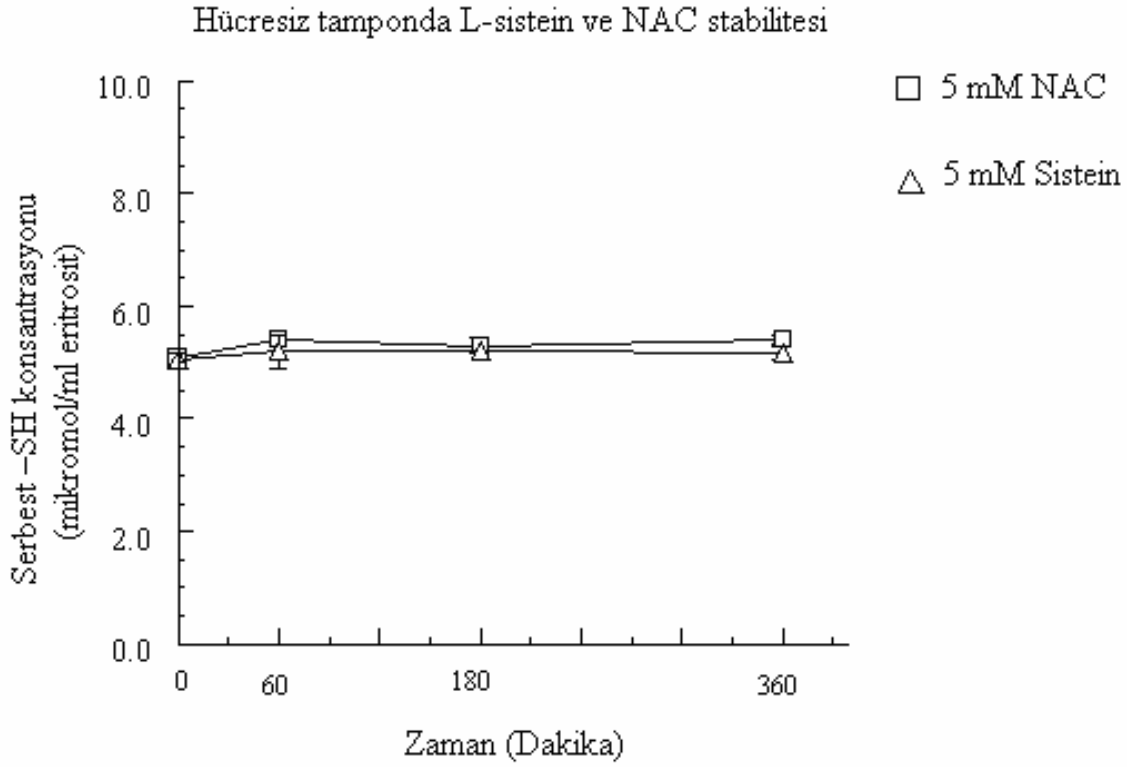
Eritrositler diğer aminoasitlerin varlığında ve yokluğunda belirlenen konsantrasyonlarda L-sistein ve NAC ile 37 °C'de 30 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonunda eritrositler alınarak yıkandı. Yıkanan eritrositlerde serbest -SH seviyeleri ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0.05$

\* L-sistein grubundan önemli derecede farklı değer

\*\* NAC grubundan önemli derecede farklı değer

Deneylemimizin son aşamasında, hücresiz bir tampon sisteminde L-sisteinin NAC'ye göre daha hızlı oksitlenip oksitlenmediğini araştırdık. Bunun için eşit konsantrasyonlarda L-sistein ve NAC'yi Krebs Ringer fosfat tamponunda belirli süreler için inkübe ettik ve tampondan kaybolmasını ölçtük. Şekil 7'de gösterildiği gibi hem L-sistein hem de NAC oksidasyona karşı dirençlidir. Başlangıç konsantrasyonlarında önemli bir azalma olmamıştır.



Şekil 4.7. Hüresiz tamponda L-sistein ve NAC stabilitesi

Krebs Ringer fosfat tamponunda eş konsantrasyonlarda L-sistein ve NAC hazırlandı. Eritrositlerin yokluğunda 37 °C'de belirli zaman periyotlarında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda numuneler alınarak serbest -SH konsantrasyonları belirlendi. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

Sonuçlar arasında istatistiksel olarak farklılık yoktur.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada eritrositlerde L-sistein ve NAC'nin hücre içine giriş ve hücreden çıkışı araştırıldı. Çalışmanın amacı pek çok hücrede hücre için çok önemli olan tiyol gruplarını hücrelerin temin etmesinde L-sistein ve NAC nin etkililiklerini karşılaştırmaktı. Hem L-sistein hem de L-sisteinin N-asetillenmiş şekli olan NAC, bir tiyol grubuna sahiptir. Bununla birlikte NAC, N-asetillendiği için moleküler yapısı ve elektriksel yükü L-sisteinden farklıdır. L-sistein ve NAC'deki bu farklılıklar onların hücre membranından transport karakteristiklerini etkileyebilir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar bu fikri desteklemektedir. Eritrositler eşit konsantrasyonda L-sistein ve NAC ile muamele edildiğinde L-sisteinin NAC'ye göre daha etkili bir şekilde hücrelere girmesi, eritrositlerin aradaki farklılığı ayırt ederek L-sistein ve NAC'yi farklı oranlarda aldığını düşündürmektedir. Bu düşüncenin iki farklı sebebi olabilir; ya L-sistein ve NAC membrandan farklı taşıyıcılarla taşınmakta ya da L-sistein ve NAC aynı taşıyıcılarla fakat farklı afinitelerle taşınmaktadır. NAC'nin aksine L-sistein için membran transport sistemleri kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Buna göre, L-sistein membrandan sistem ASC, sistem L, sistem X<sub>AG</sub> ve birkaç hücrede sistem X<sub>C</sub> sistemleriyle transport edilmektedir (Sedlak ve Lindsay, 1963; Awasthi ve ark., 1983). Bu bakımdan NAC membrandaki bazı taşıyıcıları L-sistein ile paylaşabilir. Sonuçlarımıza göre L-sistein ve NAC ile birlikte alanin, serin ve glisin de bulunması L-sistein ve NAC alımını önemli ölçüde inhibe etmiştir. Bu aminoasitler sistem ASC için birer substrat olduğundan, bu aminoasitlerle L-sistein ve NAC girişindeki herhangi bir inhibisyon L-sistein ve NAC'nin benzer taşıyıcıları paylaştığının göstergesi olabilir. L-sistein ve NAC giriş deneylerinin önemli bir sonucu, NAC'nin eritrositlere daha yavaş girmesidir. L-sisteinin 1 mM konsantrasyonda 15 dakikada hücre içi serbest -SH seviyelerini önemli ölçüde arttırmasına rağmen, aynı konsantrasyonda NAC 15 dakikada hücre içi serbest -SH seviyelerini önemli ölçüde arttırmamıştır. Buna ilave olarak 5 mM L-sisteinle inkübe edilen eritrositlerde 15 dakika sonucunda ulaşılan serbest -SH seviyelerine 5 mM NAC ile 120 dakika sonunda dahi ulaşılamamıştır.

Sonuçlar genel olarak hücre içi serbest -SH seviyelerini ve böylece GSH sentezini arttırmak için L-sisteine göre daha yüksek seviyelerde NAC kullanmak gerektiği izlenimini vermektedir. NEM ile yaptığımız deneyler bu düşüncüyü ayrıca desteklemektedir. Bu deneylerde ilk olarak NEM ile muamele ederek hücre içi serbest

-SH'yi tüketilmiş ve sonra eşit konsantrasyonda L-sistein ve NAC'nin hücre içi serbest -SH yenilemesi karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, NAC'nin 5 mM konsantrasyonda bile eşit konsantrasyonda L-sisteine göre hücre içi serbest -SH yenilemesinde yetersiz olduğunu göstermektedir. Bu yüzden oksidatif şartlarda GSH seviyelerinin yenilenmesinde ve oksidatif strese karşı hücreyi korumada daha etkili olabildiği için L-sistein önerilebilir. Özellikle *in vitro* deneysel sistemlerde NAC'nin yerine L-sistein kullanılarak oksidatif strese karşı daha hızlı bir tepki sağlanabilir. Hücre dışına çıkış çalışmaları da NAC'nin membrandan daha yavaş geçtiğini göstermektedir. Eritrositlere aynı konsantrasyonda L-sistein ve NAC ile ön muamele edildiğinde tiyol çıkışlarında farklı bir oran gözlenmiştir. Çalışmamızın sonraki basamağında L-sistein ve NAC'nin eritrosit membranından geçiş süreçlerinin biyolojik olarak aktif veya sadece basit difüzyonla membrandan geçiş şeklinde olup olmadığı araştırıldı. Giriş ve çıkış süreçlerinin sıcaklığa bağımlılığı eritrositlerin hem L-sistein hem de NAC'yi transportunun biyolojik olara aktif bir yolla gerçekleştiğini göstermektedir.

*In vivo* deneysel sistemlerde NAC, L-sisteine nazaran daha çok tercih edilmektedir. Bunun asıl sebeplerinden biri; bağırsak sıvısında NAC kolayca oksitlenmezken L-sisteinin hızla oksitlenip sistine dönüşmesidir. Sistin Emilimi için glutamat ile değişim gerekli olup bu değişimler hücreden glutamat kayıplarına neden olur. Bağırsak sıvısında NAC'den başka tiyoller % 75-100 oksitlenirken NAC'de oksitlenme oranı %16'dır (Bonanomi ve Gazzaniga, 1980). Bu yüzden NAC çoğunlukla redüklenmiş formda emilir ve hızla L-sisteine dönüşür ve böylece sadece küçük bir miktarda NAC değişime uğramadan plazmaya ulaşır (De Caro ve ark., 1989). L-sisteinin bağırsak sıvısında hızla okside olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte sistinin bağırsak sıvısından başka ortamlarda NAC'ye göre daha az stabil olup olmadığına ve kolayca oksitlenip oksitlenmediğine dair bildiğimiz detaylı bir araştırma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, bağırsak sıvısında olduğu gibi tampon sistemlerinde L-sisteinin NAC'ye göre daha hızlı bir şekilde oksitlenip oksitlenmediğini tespit etmek için *in vitro* hücresiz ortamda NAC ve L-sisteinin kaybolma boyutunu karşılaştırılmıştır. Elde edilen verilere göre ortamda ne L-sistein ne de NAC'de oksidasyonla veya başka yollarla önemli bir kayıp olmamıştır. Bu maddelerin konsantrasyonunun altı saatlik bir zaman periyodunda değişmeden kalması L-sisteinin fizyolojik tampon sisteminde en az NAC kadar stabil olduğunu düşündürmektedir. Bu sonuç ayrıca, L-sisteinin fizyolojik



tamponda bağırsak sıvısının aksine, oksidasyona karşı oldukça dirençli olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak önerimiz, deneysel sistemlerde daha az sıklıkta kullanılan L-sistein özellikle *in vitro* deneysel sistemlerde daha iyi tanınan ve geniş olarak kullanılan NAC'den beklenenden daha hızlı ve daha iyi sonuçlar sağlayabilir. NAC'nin hücrelere alınması ve serbest -SH düzeylerini artırması L-sisteine göre daha az etkilidir.

**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.
- Alessio, H.M., Blasi, E.R., 1997. Physical Activity As a Natural Antioxidant Booster and Its Effect on a Healthy Lifestyle. **Research Quarterly For Exercise Sport**, 68 (4): 292-302
- 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, R., 1999. Homeostatik Mekanizmanın Korunması ve Sağaltımında Antioksidanlar. **İlaç ve Tedavi Dergisi**, cilt 12, sayı 8: 475-480
- Aslan, D., Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.T., 2002. **İnsan Biyokimyası.**
- Awasthi, Y. C., Mısra, G., Rassin, 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
- 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.
- Bender, S. A., Reichelt, W., Norenberg, D. M., 2000. Characterization of cystine uptake in cultured astrocytes. **Neurochemistry International**, 37: 269–276.
- Board, P. G., 1981. Transport of Glutathione S-Conjugate from Human Erythrocytes. **Febs. Letter**, 124(2):163-165.
- Bonanomi, L., Gazzaniga, A., 1980. Toxicological, pharmacokinetic and metabolic studies on acetylcysteine. **Eur J Respir Dis.** 61: 45-51.
- Brinkman, C.M., Sjöberg, E.R., Juneja, L.R., Crocker, P.R., Varkı, N., Varkı, A. 2000. Loss of N-glycolylneuraminic acid in human evolution. **The Journal of Biological Chemistry**, 275(12):8633-8640.
- Cengiz, M., Cengiz, S., 2000. Tip 2 Diyabetli Hastalarda C Vitamini Uygulamasının Eritrosit Glutasyon ve HbA1c Düzeyleri Üzerine Etkisi. **Cerrahpaşa Tıp Dergisi**, 31: 211-215.
- Champe, P.C., Harvey, R.A. 1997. Glikozaminoglikanlar. A. Tokullugil, M. Dirican, E. Ulukaya. Lippincott's illustrated reviews serisinden: **Biyokimya.** İkinci baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, s. 147-156.
- Chavan, S., Sava, L., Saxena, V., Pillai, S., Sontakke, A., Ingole, D. 2005. Reduced glutathione: Importance of specimen collection. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, 20(1):150-152.
- Christensen, H. N., Oxender, D. L., Liang, M., Vatz, K. A., 1965. The Use of Nmethylation 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<sup>+</sup>-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., 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.Rev**, 51: 95-100.
- Ciliv, G., 2000. **Biyokimya Olgu Sunumlu Yaklaşım**. (N, Atlan, editör). Palme Yayıncılık, Bölüm-8, Amino Asitlerin Yıkımı ve Biyosentezi, 249-276s, Ankara.
- 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.
- Corcoran, G.B., Wong, B.K., 1986. Role of glutathione in prevention of acetaminophen-induced hepatotoxicity by N-acetyl-L-cysteine *in vivo*: Studies with N-acetyl-D-cysteine in mice. **J Pharm Exp Ther** 238 . 54-61.
- Dass, P.D., Bermes, E.W., Holmes, E.W., 1992. Renal and Hepatic Output of Glutathione in Plasma and Whole Blood. **Biochim Biophys Acta**; 1156: 99-102.
- De Caro, L., Ghizzi, A, Costa, R., et al., 1989. Pharmacokinetics and bioavailability of oral acetylcysteine in healthy volunteers. **Arzneim Forsch.** 39:382-385
- Deves, R., Chaves, P., Boyd, C.A.R., 1992. Identification of A New Transport System in Human Erythrocytes That Recognizes Cysteine and Leucine With High Affinity. **Journal of Physiology**, 454: 492-501.
- 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., 1999b. Hücre Moleküler Statüsünün Anlaşılması ve Fizyolojik Önem Açısından Radikaller-Antioksidanlar. **Cerrahi Tıp Bilim Dergisi**, 2(2): 134-142.
- 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. **Biochemical Pharmacology**. 35 (2) 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.
- Fei, Y.J., Prasad, P.D., Leibach, F.H., Ganapathy, V., 1995. The Amino Acid Transport System y<sup>+</sup>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.

- Flora, S.D., Bennicelli, C., Camoirano, A., Serra, D., Romano, M., Rossi, G.A., Morelli, A., De Flora, A., 1985. *In vivo* effects of N-acetylcysteine on glutathione metabolism and on the biotransformation of carcinogenic and/or mutagenic compounds. **Carcinogenesis** 6. 1735-1745.
- Flora, S.D., Izzotti, A., D'Agostini, D., Balansky, R.M., 2001. Mechanism of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. **Carcinogenesis** 22(7) 999-1013.
- Foresti, R., Sarathchandra, P., Clark, J.E., Gren, C.J., Motterlini, R., 1999. Peroxynitrite induces heme oxygenase-1 in vascular endothelial cells: a link to apoptosis. **Biochem J**; 339: 729-36.
- Gille, G., Sigler, K., 1995. Oxidative stress and living cells. **Folia Microbiol**, 40(2): 131-152
- Gözükara, E.M., 1989. **Biyokimya**. İ.Ü. Yayınları, Glutatyon 709, Malatya.
- Gözükara, E. M., 2001. **Biyokimya**. İ. Ü. Yayınları, Malatya.
- Griffith, O.W., 1999. Biological and pharmacological 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.
- Hansen, N.C., Skriver, A., Brorsen-Riis, L., Balslov, S., Evald, T., Matbaek, N., et al., 1994. Orally administered N-acetylcysteine may improve general well-being in patients with mild chronic bronchitis. **Respir Med** 88: 531-5,
- Herwaarden, C.L.A., Bast, A., Dekhuijzen, P.N.R., 1996. The role of N-Acetylcysteine in the treatment of COPD. In: Herwaarden C.L.A., Repine J.E; eds. **COPD: Diagnosis and treatment**. Amsterdam 118-122,
- Hoffer, E., Baum, Y., Tabak, A. Taitelman, U., 1996. N-acetylcysteine increases the glutathione content and protects rat alveolar type II cells against paraquat-induced cytotoxicity. **Toxicol Lett** 84.7-12.
- İnci, E., Seven, A., İnci, F., Civelek, S., Korkut, N., Burçak, G., 1998. Larenks Kanserli Olgularda Lipit Peroksidasyon ve Antioksidan Statü Göstergelerinin Dokularda İncelenmesi. **Türk Otolarengoloji Arşivi**, 36(1-2); 33-36.
- Jones, A.L., 1998. Mechanism of action and value of Nacetylcysteine in the treatment of early and late acetaminophen poisoning: a critical review. **J Toxicol Clin. Toxicol**; 36: 277-85.
- Jones, P. D., Mody, C. V., Carlson, L. J., Lynn, J. M., Sternberg, P., 2002. Redox Analysis of Human Plasma allows Separation of Pro-Oxidant Events of Aging from decline in antioxidant defenses. **Free Radical Biology & Medicine**, 33; 1290-1300.
- Kaplowitz, N., Fernandez-Checa, J.C., Kanan, R., Garcia-Ruiz, C., Ookhtens, M., Yi, J.R., 1996. GSH Transporters: Molecular Characterization and Role in GSH Homeostasis. **Biol. Chem.**, Hoppe-Seyler; 377: 266-73.
- Kaya, N., 1993. **Biyokimya**. Atatürk Üniversitesi Basımevi, Amino Asitlerin transportu, 182-183, Erzurum.
- Kelly, G.S. 1998. Clinical applications of N-acetylcysteine. **Alt Med Rev**. 3 (2) 114-127
- Kennedy, R., Rosa, S. 2000. N-Acetyl-L-Cysteine .[www.medical library.net/ content/view/138/45](http://www.medical library.net/content/view/138/45).
- 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.

- 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.
- Li, WQ., Sylvester, J., Ahmad, M., 2003. Molecular mechanisms of Nacetylcysteine actions. **Cell Mol Life Sci.**; 60: 6-20.
- Lu, C. S., Sun, M. W., Yi, 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.
- 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.
- Mazzor, D., Golan, E., Philip, V., Katz, M., Jafe, A., Benzvi, Z., Meyerstein, N., 1996. Red Blood Cell Permeability to Thiol Compounds Following Oxidative Stress. **European Journal of Hematology**, 57: 241-246
- McBean, G.J, Flynn, J., 2001. Molecular mechanism of cystine transport. **Biochemical Society Transactions**, 29 (6) 717-722
- Meister, A, Anderson E., 1983. Glutathione. *Ann Rev Biochem*; 52:711-760.
- Meister, A., 1985. Methods for selective modification of Glutathione Metabolism and Study of Glutathione Transport. *Methods Enzymol*. 113: 571-85.
- Meister, A., 1988. Glutathione Metabolism and its Selective Modification. *J Biol Chem*; 263; 17205-8.
- Meister, A., 1991. Glutathione Metabolism. **Methods Enzymol**;;251: 3-7.
- Meister, A., 1995. Glutathione Deficiency Produced by Inhibition of Its Synthesis, and Its Reversal; Application in Research and Therapy. *Pharmacol Ther* 1991; 51:155-85.
- Milton, H., Saier, 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., 1991. Biosynthesis of nutritionally nonessential amino acids. **Harper's Biochemistry**, 22<sup>nd</sup> Ed. Appleton & Lange, USA. 267-269,
- 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.
- Nakata, K., Kawase M., Ogino S., Kinoshita C., Murata H., Sakaue T., Ogata K., Ohmori S., 1996. Effects of age on levels of cysteine, glutathione and related enzyme activities in livers of mice and rats and an attempt to replenish hepatic glutathione level of mouse with cysteine derivatives. **Mech Ageing Dev**. 90,195-207.

- 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.
- Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E. Y., 2002. **İnsan Biyokimyası**. Palme yayıncılık, Bölüm-1-4; Hücre, Amino Asitlerin Metabolizması, 1-18s, 80-104s, Ankara.
- Palacin, M., Estevez, R., Bertran, J., Zorzano, A., 1998. Molecular Biology of Mammalian Plasma Membrane Amino Acid Transporters. **Physiol. Rev**, 78: 969–1054.
- 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.
- Pratt, S., Ioannides C., 1985. Mechanism of the protective action of N-acetylcysteine and methionine against paracetamol toxicity in the hamster. **Arch Toxicol** 57 : 173-177.
- Raftos, J.E., Whillier, S., Chapman, B.E., Kuchel, P.W., 2007. Kinetics of uptake and deacetylation of N-acetylcysteine by human erythrocytes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 39 : 1698–1706.
- Rose, V.C., 1984. New Aspects of Glutathione Biochemistry and Transport-Selective Alteration of Glutathione Metabolism. **Nutrition Reviews**, (42) 12, 397-410.
- Rosenberg, R., 1982. Na-independent and Na-dependent transport of neutral amino acids in the human red blood cells. **Acta Physiol. Scand.**, 116, 321-330.
- 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.
- Sedlak, J., Lindsay, R. H., 1963. Determination of sulfhydryl groups in biological samples. **Analytical Biochem.**, 25: 192-205
- Serteser, M., 1999. **Deneysel 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.
- Shaikh, ZA, Vu TT, Zaman, K., 1999. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. **Toxicol Appl Pharmacol.**;154: 256–63.
- 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., Dlużewski, A.R. 2000. Interaction of membrane skeletal proteins with membrane lipid domain. **Acta Biochimica Polonica**, 47: 565-578.
- Skrydzewska, E., Farbiszewski, R., 1999. Protective Effect of N-Acetylcysteine on Reduced Glutathione, Reduced Glutathione-Related Enzymes and Lipid Peroxidation in Methanol Intoxication. **Drug and Alcohol Dependence**, 57:61-67.
- 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.

- 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
- Strayer, L., 1981. **Biochemistry**. Stanford University. W.H. Freeman and Company New York. Second Edition, Part-IV; Biosyntheses, 592-593.
- Thorburn, DR, Kuchel, PW., 1985. Regulation of the Human Erythrocyte Hexose Monophosphate Shunt Under Conditions of the Oxidative Stress. **Eur J Biochem.**; 150: 371-86.
- Türker, H., 2000. Kronik obstrüktif akciğer hastalığında mukolitikler ve antioksidanlar. In: Umut, S. ve Erdiñç E; eds. **Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı**, İstanbul, 2:124-127.
- Ulakoğlu, E. Z., Gümüřtař, M. K., Belce, A., Altuđ, T., Kökođlu, E., 1998. Strese Bağlı Mide Mukozası Hasarında Endojen Glutatyon Tükenisinin Enerji Metabolizması ile iliskisi. **Cerahpařa J.Med**, 29(3); 127–131.
- Woods, JS., Ellis, ME., 1995. Up-regulation of glutathione synthesis in rat kidney by methylmercury. Relationship to mercury-induced oxidative stress. **Biochem Pharmacol.** 50:1719-1724.
- Vries, N.D., Flora, S.D., 1993. N-acetyl-l-cysteine. **Journal of Cellular Biochemistry**. Supplement 17F: 270-277
- 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.
- 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.
- Yalın, E. A., Yalın, S., Yıldız, S. M., Yüzbaşıoğlu S., Aksoy, K., 2001. **Eritrositlerin Membran Proteinlerine Serbest Radikallerin Etkisi** Cilt:26, Sayı : 4
- Yenerel, M. N., 2004. Herediter eritrosit membran anomalileri. **Hematoloji**, 2:125-130.
- Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M., 2003. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. **Cell Mol Life Sci.**; 60: 6-20.
- Zaragoza, A., Diez-Fernandez C, Alvarez AM, Andres D, Cascales M., 2001. Mitochondrial involvement in cocaine-treated rat hepatocytes: effect of N-acetyl-cysteine and deferoxamine. **Br J Pharmacol**; 132: 1063–70.
- Zhang, S. M., Willett, C. W., Sehub, J., Manson, J. E., Colditz, G. A., Hankinson, S.E., 2003. A prospective study of plasmtotal cysteine and risk of breast cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers& Prevention**, 12: 1188–1193.
- Zhao, L., 2001. Glutathione, a ubiquitous thiol. Iowa University. **Free radical and Radiation**, Biology graduate program, Iowa, 10s.
- 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.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında büyük bir titizlik, sabır ve özveriyle bana destek olan ve yol gösteren danışman hocam sayın Doç. Dr. Deniz YILDIZ'a (M.K.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü), çalışmalarımın düzenli ilerlemesinde bana yardımcı olan Yeliz ÇAKIR, Züleyha ÇİVİ, Hüseyin DOĞRU ve Ar. Gör. Hasan YILDIZ'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca yüksek lisans eğitimim sırasında, görev yaptığım okullarda bana kolaylık sağlayan tüm okul yöneticilerine teşekkür ederim.



## ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Hatay'ın Hassa ilçesinde doğdum. İlk ve ortaöğrenimi Hassa Arpalıuşağı Köyü İlkokulu, Aktepe İlkokulu, Aktepe İlköğretim Okulu ve Aktepe Lisesi'nde tamamladım. 1998 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde yükseköğrenimime başlayıp 2002 yılında mezun oldum. Aynı yıl Gaziantep Nurdağı Lisesi'nde Biyoloji Öğretmeni olarak göreve başladım. 2004 yılında İslahiye Boğaziçi Atatürk Lisesi'ne naklen atandım. 2006 yılında, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladım. 2007 yılında Kırıkhan Lisesi'ne ve bir dönem sonra aynı yıl sınavla Hassa Anadolu Lisesi'ne atandım ve halen Hassa Anadolu Lisesi Biyoloji Öğretmeni olarak görev yapmaktayım.