

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİMDALI

135884

N-ASETİL SİSTEİN'İN ERİTROSİTLERDE XENOBIOTİKLERLE
KONJUGASYONUNUN VE TRANSPORTUNUN ARAŞTIRILMASI

CEMİLE İŞİL KURAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

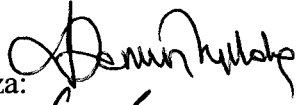


ANTAKYA
EYLÜL-2003

135884

Mustafa Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yrd. Doç. Dr. Deniz YILDIZ danışmanlığında, Cemile Işıl KURAN tarafından hazırlanan bu çalışma 16 / 09 / 2003 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından, Biyoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Deniz YILDIZ
Üye : Prof. Dr. Haydar ÖZTAŞ
Üye : Yrd. Doç. Dr. Kemal SANGÜN

İmza: 
İmza: 
İmza: 

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

Kod No : 148



İmza

16 / 09 / 2003

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Abdurrahman YİĞİT



Bu çalışma M.K.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca desteklenmiştir.

Proje No : 03 M 0302

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

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ÖZET | I |
| ABSTRACT | II |
| ÖNSÖZ | III |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | IV |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | V |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1- Serbest Radikallerin Oluşumu | 2 |
| 1.1.1- Membran Lipitlerinin Peroksidasyonu | 4 |
| 1.1.2-Disülfit Bağ Oluşumu | 4 |
| 1.1.3- DNA Hasarı | 5 |
| 1.2- Serbest Radikaller | 5 |
| 1.2.1- Süperoksit Radikalleri | 5 |
| 1.2.2- Hidroksil Radikalleri | 6 |
| 1.2.3- Nitrik Oksit | 6 |
| 1.3- Serbest Radikallere Bağlı Hastalıklar | 6 |
| 1.3.1- Oksijen ve Diğer Gazların Toksisiteleri | 7 |
| 1.3.2- Yaşlanma | 7 |
| 1.3.3- DNA'ya Etkisi | 7 |
| 1.4- Detoksifikasyon Reaksiyonları | 8 |
| 1.4.1- Enzimler | 10 |
| 1.4.1.1- Süperoksit dismutaz | 10 |
| 1.4.1.2- Katalaz | 10 |
| 1.4.1.3- Glutasyon Peroksidaz | 10 |
| 1.4.1.4 Sülfidril Proteinleri ve Diğer Serum Proteinleri | 11 |
| 1.4.2- Antioksidant Moleküller | 11 |
| 1.5- Glutasyon Nedir ? | 12 |
| 1.5.1- GSH Nereden Salınır ve Salınımında Rol Oynayan Enzimler Nelerdir? | 15 |
| 1.5.2- GSH'ın Görevi ve Hücre İçin Önemi | 15 |
| 1.6- Hasar Tamir Mekanizmaları | 16 |
| 1.6.1- GST'nin Transport İşlemindeki Rolü | 17 |
| 1.6.2- GST Oluşumlarında Polimorfizm | 18 |
| 1.7- Glutasyon - S-Konjugatları için Export Pompaları | 20 |
| 1.7.1- Eritrositlerden GSSG Transportu | 23 |
| 1.7.2- GSSG Transportuna Etki Eden Faktörler | 24 |
| 1.7.2.1- Glikoz-6- Fosfat Dehidrogenaz Eksikliği | 24 |
| 1.7.2.2- Sıcaklık | 28 |
| 1.7.2.3- Endogenous Substratların Tükenişi | 28 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.7.2.4- Floridin Etkisi | 29 |
| 1.7.2.5 - ATP'nin Etkisi | 29 |
| 1.8-L-NAC | 30 |
| 2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR | 33 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM | 40 |
| 3.1- Materyal | 40 |
| 3.2- Yöntem | 42 |
| 3.2.1- Serbest - SH Konsantrasyonunun Ölçülmesi | 42 |
| 3.2.2- NAC Varlığında Transportun Nasıl Etkilendiğinin Gösterilmesi | 42 |
| 3.2.3- NAC'nin CDNB ile Konjugat Oluşturup Transport Edilip Edilmediğinin Gösterilmesi | 42 |
| 3.2.4- İstatistiksel Analizler | 50 |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA | 51 |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER | 58 |
| KAYNAKLAR | 59 |
| ÖZGEÇMİŞ | 62 |



I

ÖZET

N-ASETİL-L-SİSTEİN'İN ERİTROSİTLERDE XENOBIOTİKLERLE KONJUGASYONUNUN VE TRANSPORTUNUN ARAŞTIRILMASI

Glutasyon, eritrositlerde detoksifikasyon işleminde rol oynayan önemli bir tiyol içeren bileşiktir. Tiyol grubu, glutasyon S-transferaz ile katalizlenen konjugat formunda xenobiotiklerin bir kısmıyla reaksiyona girer. Oluşan bu ürün ATP'ye bağımlı bir transport mekanizması tarafından eritrositlerden dışarı bırakılır.

1-kloro-2,4-dinitrobenzen ve glutasyon konjugatının transportu tamamen deneysel bir sistemde çalışılmıştır. Biz, serbest-SH içeren N-asetil-L-sisteinin eritrositlerde detoksifikasyon işleminde glutasyonun yerini alıp alamayacağını inceledik. Sonuçlarımız N-asetil-L-sisteinin, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen ve N-etilmaleimid tarafından tüketilen hücre içi serbest -SH içeriğini yeniden düzenlediğini göstermiştir. NAC (10 mM), N-etilmaleimid ile muamele edilen eritrositlerde 10 dakika içinde eritrosit içi serbest-SH düzeyini 14 ± 1 $\mu\text{mol/ml}$ eritrosite yükseltmiştir. Kontrol düzeyi, 5 ± 0.1 $\mu\text{mol/ml}$ eritrosittir.

Sonuçlar, NAC'nin L-BSO varlığında ve yokluğunda, eritrositlerde 1-kloro-2,4-dinitrobenzen detoksifikasyon işlemini anlamlı bir şekilde yeniden kazandırdığını göstermiştir. NAC muameleli eritrositler ve önceden tüketilmiş glutatyonda transport oranı 449 ± 38 nmol/ml eritrosittir. NAC yokluğunda transport oranı 214 ± 21 nmol/ml eritrosittir ki kontrol ile benzeşmektedir. Sonuçlarımız NAC'nin dinitrofenol-glutasyon transportunu eski haline getirdiği ve de önceden tüketilen eritrosit glutatyonda 1-kloro-2,4-dinitrobenzenin detoksifikasyonunda glutasyonun yerine geçtiğini ortaya koymuştur.

2003, 62 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Glutasyon, Glutasyon konjugatları, Eritrosit, Xenobiotikler, NAC, Oksidatif stres, G-6-PD, Antioksidantlar, Serbest-SH, Detoksifikasyon.

II

ABSTRACT

CONJUGATION and TRANSPORT of XENOBIOTICS by N-ACETYL-L-CYSTEINE in HUMAN ERYTHROCYTES

Glutathione is an important thiol containing compound involved in detoxification process in erythrocytes. Its thiol group reacts with a variety of xenobiotics in a glutathione S-transferase catalyzed reaction to form conjugates that are effluxed from the erythrocytes by an ATP dependent transport mechanism.

A well studied experimental system is the transport of the conjugate of glutathione and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene. We investigated, whether N-acetyl-L-cysteine protects the free-SH content or replaces glutathione in detoxification process in glutathione predepleted erythrocytes.

Our results indicate that N-acetyl-L-cysteine restores the intracellular free-SH content following depletion by 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and N-ethylmaleimide. N-acetyl-L-cysteine (10 mM) increased the intraerythrocyte free-SH level to 14 ± 1 μ mole/ml erythrocyte in 10 minutes in erythrocytes treated with N-ethylmaleimide. The control levels was 5 ± 0.1 μ mol/ml RBC.

Results showed that N-acetyl-L-cysteine, in the presence and absence of L-buthionine sulfoximine, significantly recovered the 1-chloro-2,4-dinitrobenzene detoxification process in erythrocytes. The transport rate in glutathione predepleted and N-acetyl-L-cysteine treated erythrocytes was 449 ± 38 nmol/ml erythrocyte. In the absence of N-acetyl-L-cysteine the rate of the transport was 214 ± 21 nmol/ml erythrocyte which remained similar to the control. Our results suggest that N-acetyl-L-cysteine recovers the dinitrophenyl-glutathione transport and also replaces glutathione in detoxification of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in glutathione predepleted erythrocytes.

2003, 62 pages

Keywords: GSH, GSH Conjugates, Erythrocyte, Xenobiotics, NAC, Oxidative stress, G-6-PD, Antioxidants, Free-SH, Detoxification, Antioxidants.

III

ÖNSÖZ

Eritrositlerde bulunan glutatyon (GSH), serbest radikallerin uzaklaştırılmasının yanı sıra xenobiotiklerin yani hücreye yabancı olan kimyasal maddelerin detoksifikasyonunda da rol oynamaktadır.

GSH, yapısında üç aminoasit bulunduran ve reaktif grup olarak -SH grubunu taşıyan bir tripeptittir. Bu grup aracılığıyla reaktif xenobiotiklerle birleşmekte ve konjugatlar oluşturmaktadır. Oluşan bu konjugatlarsa daha sonra eritrositlerden uzaklaştırılıp karaciğerde metabolize edilmektedir.

Çalışmamızın amacı; GSH'ın eritrositlerdeki bu görevinin, N-asetil-L-sistein (NAC) tarafından yapılıp yapılamayacağını göstermektir.

NAC, laboratuvar ortamında oluşturulan bir bileşiktir. Çalışmamızda NAC'i kullanmaktaki amacımız, NAC'nin daha önceleri hücrel metabolizma, apoptosis, gen ekspresyonlarının düzenlenmesi, kötü huylu tümörlerin gelişimini baskılaması gibi organizma için biyolojik önemi üzerinde çalışılmış olmasıdır. NAC'nin diğer biyolojik aktiviteler üzerindeki öneminin, olası GSH eksikliklerinde de devam edebileceği düşüncesi çalışmalarımıza yön vermiştir.

NAC, hücre zarından kolayca geçerek yine oldukça kolay bir biçimde eritrositler içine girmektedir. Yapısında GSH'da olduğu gibi reaktif bir -SH grubuna sahiptir.

Çalışmamızın bir diğer önemi de NAC'nin detoksifikasyon mekanizmasında xenobiotiklere karşı, eritrositleri korumak amacıyla kullanılıp kullanılamayacağını ortaya koymasındadır.

Tez konumun belirlenmesi ve çalışmalarımın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Deniz Yıldız'a (M.K.Ü. Fen-Edb.-Biyoloji bölümü), çalışmalarım sırasında dostluğunu ve yardımlarını benden esirgemeyen Sayın Tülay Bağdadioğlu ve Uzman Nimet Okay'a (M.K.Ü. Ziraat Fak.), laboratuvar çalışmalarımında yardımlarını gördüğüm Biyoloji bölümündeki diğer saygıdeğer hocalarım ve asistanlara, Fen Bilimleri Enstitüsü çalışanlarından Sayın Havva Gençel ve Sayın Mustafa Dal'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca çalışmalarım sırasında destek ve sabırlarını benden esirgemeyen sevgili ailem ve eşime gönül dolusu teşekkürler.



IV

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| AIDS | Acquired immuno deficiency syndrome (Kazanılmış immün sistem yetersizliği sendromu) |
| ARDS | Adult respiratory distress syndrome (Yetişkin solunum zorluğu sendromu) |
| ATP | Adenozin trifosfat |
| BHP | t-bütil hidroperoksit |
| BSO | Büthionin sülfoksimin |
| CDNB | 1-kloro-2,4-dinitrobenzen |
| DMAP | 4-dimetil aminofenol |
| DTNB | 5,5 ¹ - dithiobis (-nitrobenzoat) |
| G-6-PD | Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz |
| GS-Dnp | S-(2,4-dinitrofenil) glutatyon |
| GSH | Glutatyon |
| GSSG | Okside glutatyon |
| GST | Glutatyon transferaz |
| HMP | Heksoz monofosfat |
| IPF | Idiopathic pulmonary fibrosis (Sebebi bilinmeyen akciğer fibrosis) |
| MAD | Malondialdehit |
| MRP | Multidrug-resistance-protein |
| NAC | N-asetil-L-sistein |
| NAD | Nikotinamid adenin dinükleotid |
| NEM | N-etilmaleimid |
| TCA | Trikarboksilikasit |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | Sayfa |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil-1.1 Eritrosit Antioksidant Sistemi | 9 |
| Şekil-1.2 Glutasyon | 12 |
| Şekil-1.3 Glutasyon Sentezi | 14 |
| Şekil-1.4 Merkapturik Asit Metabolik Yolu | 19 |
| Şekil-1.5 Glutasyon-S- Konjugat Pompaları | 21 |
| Şekil-1.6 Glutasyon Disülfidin MRP Aracılı Dışa Verimi | 22 |
| Şekil-1.7 N-Asetil-L-Sistein'in Kimyasal Yapısı | 30 |
| Şekil-4.1 CDNB Tarafından Serbest -SH Tüketiminde NAC Etkisi | 54 |
| Şekil-4.2 NEM Tarafından Serbest -SH Tüketimi | 55 |
| Şekil-4.3 NAC Tarafından Serbest -SH Yenilenmesi | 56 |
| Şekil-4.4 NAC Tarafından GSH'ı Önceden Tüketilen Eritrositlerde CDNB Detoksifikasyonunun Düzeltilmesi | 57 |

1. GİRİŞ

Atmosferinde bol oksijen bulunduran bir gezegende yaşamaktayız. Bu özellik, oksijene toleranslı canlıların evrimsel artışı mümkün kılmıştır. Canlıların, havadaki oksijenden güvenilir şekilde yararlanabilmeleri için hemoglobin, miyogloblin, sitokrom gibi demir içeren moleküllere sahip olmaları gerekmektedir. Demirin oksijen metabolizması ve transportu olayında, elektron transportunu kolaylaştırdığı bilinmektedir.

Oksijenli ortamda bulunan hücrelerde aktif oksijen (oksijen radikali) oluşumu kaçınılmazdır. Sonuçta elementler ve oksijen radikallerinin etkisiyle oluşan zararlı oluşumlar, eritrositlerde, aerobik çevrenin oluşturduğu tek bir yaralanmada dahi potansiyel bir tehlike oluşturmaktadır. Bunun sonucu olarak ta eritrositlerin demir yükleriyle zardaki doymamış lipitler, sonsuz bir oksijen akımına maruz kalırlar. Bu düzenli akıma maruz kalma ve eritrositlerin antioksidanlarla muamelesi, evrimsel açıdan oksijene toleranslı organizmaların oluşumunu katalizlemektedir.

Moleküler oksijenin, diğer kimyasal bileşikleri oksitleme yeteneği çok azdır. Bu nedenle oksijenin önce aktif bir forma çevrilmesi şarttır. Birçok forma sahip olan bu aktif oksijene 'Serbest Oksijen Radikalleri' adı verilmektedir.

Somatik hücrelere ve bağışıklık sistemine saldıran ve oksidasyona neden olan serbest radikaller, temel olarak oksijen kaynaklı metabolitler (süperoksit anyonları O_2^- , hidrojen peroksit H_2O_2 , hidroksil radikali OH^-), hipoklorik asit, kloraminler, azotdioksit, ozon ve lipit peroksitlerdir. Bunlar organizmalar tarafından hücre içinde mitokondrial solunum zincirinde yada hücre dışında özellikle de fagositler tarafından oluşturulan moleküllerdir.

Doku oksijen basıncı, 40 mmHg normal değerinde bulunduğu zaman bile, erimiş moleküler oksijenden sürekli olarak az miktarda da olsa serbest radikaller oluşmaktadır. Bununla beraber dokular, bu serbest radikalleri uzaklaştıran öncelikle peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutazı da içeren çeşitli enzimler taşımaktadır. Bu nedenle hemoglobin-oksijen tampon mekanizması uygun olarak çalıştığında ve normal doku oksijen basıncı devam ettirildiği sürece, okside edici serbest radikaller öyle hızlı uzaklaştırılır ki dokularda ya çok az etkili olurlar yada hiç etkili olmazlar.

1.1 Serbest Radikallerin Oluşumu:

Sigara, herbisit ve pestisitler, çözücüler, petrokimya ürünleri, ilaçlar, güneş ışınları, x-ışınları, yiyeceklerde bulunan bazı bileşikler hatta ve hatta yoğun egzersiz oksijen kullanımındaki artışa bağlı olarak serbest radikal oluşumuna katkıda bulunmaktadır.

Kuantum kimyasına göre, bir bağın yapısına ancak iki elektron girebilmektedir. Ayrıca bu iki elektronun, ters dönüş doğrultusunda olması gerekmektedir. Yani yukarı doğru dönen bir elektronun eşi, aşağıya doğru dönen bir elektrondur. Elektron çiftleri, oldukça kararlıdır ve insan vücudunun neredeyse tüm elektronları, bu elektron çiftleri halinde bulunmaktadır.

Bir bağ koptuğunda, elektronlar ya birlikte kalır (ikisi bir atoma katılarak) yada ayrılırlar (biri bir atoma diğeri diğeri atoma geçerek). Eğer birlikte kalırlarsa oluşan atom bir iyonu, ayrılırlarsa da serbest radikalleri oluştururlar. Bu eşlenmemiş elektronlar oldukça yüksek enerjiye sahiptirler ve eşleşmiş elektronları ayırıp işlevlerini yapmalarına engel olurlar. Bu işlem, serbest radikalleri hem tehlikeli hem de kullanışlı yapmaktadır.

Serbest radikaller, elektron transferi, enerji üretimi ve diğer pek çok metabolik işlevde temel oluşturmaları nedeniyle yaşamsal öneme sahip yapılardır. Ancak bu yapıların zincir reaksiyonu, kontrolsüz bir davranış gösterirse, hücrede çeşitli hasarlara neden olmaktadır. Bilim adamları 1954'lerden bu yana, serbest radikallerin yaşlanma ve dejeneratif hastalıklara neden olduğunu bilmektedirler.

Serbest radikaller, elektron çiftlerinden oluşan yapıda eşleşmiş elektronları birbirinden ayırarak reaksiyonu durdurmaktadırlar. Bunun sonucunda serbest radikal kendine bir elektron alarak elektron çifti haline geçerken, diğer elektron serbest radikali oluşturmaktadır. Tüm bunlara karşın vücudumuzda, serbest radikallerin bu zararlı etkilerini nötralize eden, kanser, kalp hastalıkları ve erken yaşlanmaya neden olabilecek zincir reaksiyonlarını önleyen antioksidant adını alan moleküller bulunmaktadır. Antioksidantlar, serbest radikaller için kolay bir elektron hedefi oluşturmaktadır.

Böylece iki serbest radikali birleştirerek nötralize edebilme özelliğine sahip bir enzime (glutasyon peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz) taşınana dek radikalle stabil

bir yapı oluştururlar. Serbest radikaller nötralize edilmedikleri takdirde vücutta oldukça ciddi hasarlara neden olabilmektedirler. Bu hasarların birçoğuna değinecek olursak;

- a) Hücre membran proteinlerini yıkarak hücrelerin ölümüne neden olma
- b) Bağışıklık sistemindeki hücreleri yok ederek bağışıklık sisteminin zorlanması
- c) Membran lipid ve proteinlerini yok ederek hücre membranının sertleşmesine dolayısıyla hücre fonksiyonunun engellenmesine yol açma
- d) Nükleer membranı yararak nükleustaki genetik materyali etkileyip DNA'ı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirme.

Bu şekilde çeşitli stres modellerinin de oluşumunu hızlandırdığı ve lipid peroksidasyonlarına da neden olan reaktif oksijen ürünlerinin (Serbest oksijen radikalleri) vücutta oluşturduğu oksidatif hasara 'Oksidatif Stres' yada 'Oksidan Stres' adı verilmektedir (ULAKOĞLU ve ark., 1998).

Serbest oksijen radikalleri, hücre içinde glikoliz ve oksidatif fosforilasyonu inhibe etmektedir. Serbest oksijen radikali oluşumunun enerji metabolizmasındaki bu negatif etkileri, bir yandan GSH sentezinin ve rejenerasyonunun azalmasına yol açarken, diğer yandan GSSG salgılanmasında hatalara neden olmaktadır. Ayrıca bu radikaller, hidrojen peroksidin detoksifikasyonunda rol oynayan glutatyon peroksidazın da (GPx) oksidatif inaktivasyonuna neden olmaktadır. Meister (1983) ve Deneke (1989) tarafından bildirildiğine göre, serbest oksijen radikallerinin artışı sonucunda, GSH miktarları, GPx'a substrat oluşturduğundan azalmakta, sentezi yavaşlamaktadır. Diğer yandan bu olay GSSG'nin salgılanmasında azalmaya neden olarak, hücre içi GSSG birikimini arttırmakta ve serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu hasarlara ilaveten GSSG'e bağlı etkileri de kamçulamaktadır. Ayrıca Ambrosio ve Santoro (1992) tarafından bildirildiğine göre; bu radikallerin etkisiyle meydana gelen doku enerji mekanizmasıyla ilgili değişiklikler, glutatyon redüktaza kofaktörlük yapan NADPH'm miktarının ve GSH düzeylerinin azalmasına neden olmaktadır (ULAKOĞLU ve ark., 1998).

Bu noktada, serbest radikallerin bu hasarları nasıl oluşturduğu sorusuyla karşı karşıya kalmaktayız. Bu sorunun cevabı Ambrosio (1992) ve Cochrane (1991) tarafından çeşitli mekanizmalara dayandırılmakla birlikte bunların en etkili olanlarının, lipid peroksidasyonları, proteinler arası disülfid bağı oluşumu ve DNA hasarları olduğu belirtilmiştir (ULAKOĞLU ve ark., 1998).

1.1.1-Membran Lipitlerinin Peroksidasyonu:

Serbest radikallerin hücre membranına saldırmasıyla gerçekleşmektedir. Hücre membranının stabilizasyonunu ortadan kaldırarak hızlı bir şekilde hücre ve doku bozulmalarına neden olmaktadır.

Hallwell ve Gutte (1985), tarafından belirtildiğine göre; Serbest radikaller, membran lipid ve proteinlerinin geri dönüşümsüz şekilde hasara uğramasına neden olmaktadır. Serbest radikallerin protein metabolizmasına etkisi genellikle sülfidril grupları üzerinedir. Etki altında kalan sülfidril grupları -S-S- şekline dönüşmektedir. Reaktif oksijen türleri, kolayca membran lipidlerinin etkileyerek doymamış aldehitlerin oluşmasına neden olmaktadır. Bunlar, serbest radikallerden daha dayanıklı olup direkt hücredeki biyomoleküllerin yapısını bozarak, proteinlerin ve diğer moleküllerin modifikasyonuna ve lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır. Dolayısıyla doymamış aldehitler, eritrositlerin hemolizine ve protein sentezinin inhibisyonuna neden olmaktadır (TAMER ve ark., 1998).

1.1.2-Disülfid Bağı Oluşumu:

Glutasyon (GSH) gibi tiyollerin (R-SH) oksidasyonu sonucunda tiyol ve oksijen radikalleri oluşmaktadır. Bunlar sülfür merkezli radikallerdir ve proteinlerdeki homolitik fizyon (sülfürlerin karşılıklı bağlanması) reaksiyonları sonucu disülfid bağı oluşmaktadır. Bu olay da proteinlerin konfigürasyonunu bozarak vücuttaki metabolik aktiviteleri engellemektedir. Oksidatif stres, vücutta GSH düzeylerinin azalmasına neden olmaktadır. Bu duruma bağlı olarak hücre yüksek oranda oksidana maruz kaldığında GSSG oluşumu metabolik sınırları aşmakta ve oksidatif stres oluşmaktadır. Detoksifiye olamayan oksidanla, membran lipidlerinin ve hücrenin çeşitli fonksiyonel ve yapısal proteinlerinin bozulmasına neden olmaktadır. Ayrıca Ambrosio (1992) ve Scherer (1986) tarafından belirtildiğine göre; GSSG'nin kendisi de proteinlerin

sülfhidril gruplarıyla (-SH) reaksiyonlaşarak kalıcı zararlı etkiler meydana getirmektedir (ULAKOĞLU ve ark., 1998).

1.1.3-DNA Hasarı:

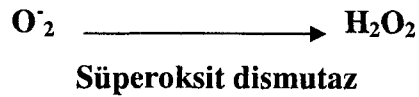
Elektromanyetik, ultraviyole ve x-ışınlarına maruz kalan bir canlıda DNA, hidroksil radikallerinin saldırısına uğramaktadır. Serbest radikal etkisiyle DNA'nın yapısının değişmesi, mutasyonlara ve hatta canlının eşey hücrelerindeki mutasyonlara bağlı fetus ölümlerine neden olmaktadır.

Vücuttaki en temel serbest radikallere kısaca değinmekte yarar vardır.

1.2- Serbest Radikaller

1.2.1-Süperoksit Radikalleri:

Süperoksit radikalleri, hücrede enerji metabolizmasında, oksidasyon sırasında yada oksidazlar gibi bazı enzimlerin aktivitesi sonucunda oluşurlar. Bu radikaller süperoksit dismutaz denen bir enzimle inaktive edilebilmektedirler.



Süperoksit radikali, fagositlerin bakterisit etkilerinin temel mekanizmasını oluşturmakla birlikte, yangı reaksiyonlarında normal dokulara dahi zarar verebilecek araçlardır.

1.2.2-Hidroksil Radikalleri:

Hidroksil radikallerinin oluşumu çeşitli reaksiyonlarla gerçekleşmektedir.

Bunlar:

- a) Haber-Weiss reaksiyonu
- b) Hidrojen peroksitle demirin birleşmesi (Fenton reaksiyonu)
- c) Suyun hidrolizi sonucu hidroksil ve hidrojen radikallerinin oluşumu

Hidroksil radikalleri, diğer radikaller içinde en reaktif olanıdır ve vücuttaki serbest radikal hasarının en önemli sorumlularındır.

1.2.3-Nitrik Oksit (NO.) :

Çözülebilir bir serbest radikal gazıdır. Vazodilatatör mesajı endotelyumdan düz kasa taşıyan bir enerji aktarıcısı olarak merkezi ve çevresel sinirsel aktarımda ve bağışıklıkta aktif olarak rol oynamaktadır.

1.3-Serbest Radikallere Bağlı Hastalıklar:

Serbest radikaller, vücudun hastalıklara karşı olan direncini, vücuda giren organizmaları yok ederek arttırmaktadır. Buna karşın, fazla üretildiğinde çeşitli hasarlara neden olarak bunlara bağlı hastalıklara yol açmaktadır. Bu hastalıklar üç grupta toplanabilir;

- 1-Genetiğe bağlı olanlar: Fanconi anemi, bloom sendromu.
- 2-Çevresel bileşenlere bağlı olanlar: İş hastalıkları, zehirlenmeler, virüs ve bakteriyel enfeksiyonlar.
- 3-Genetik + Çevreye bağlı olanlar: Bronşial astım, diabetes mellitus, kanser ve kardiovasküler hastalıklar.

Bunlara örnek verilecek olursa;

1.3.1-Oksijen ve Diğer Gazların Toksisiteleri:

Yüksek oksijen ve diğer gazlara maruz kalındığında, canlılar için zararlı hatta bazı durumlarda ölümcül etkilere rastlanmaktadır. Oksijenin hasara neden olan etkileri, oksijen oluşturan serbest radikallerin yada diğer serbest radikallerin ara ürünlerinin hücre membranı gibi hücrenel komponentleri okside etmesindedir.

1.3.2-Yaşlanma:

Denham Harman tarafından ortaya atılan serbest radikal teorisine göre; normal yaşlanma, aerobik metabolizma sırasında oluşan serbest radikallerin dokularda birikmesi sonucu oluşan hasarlar nedeniyle meydana gelmektedir. Buradan da canlıların kendi ürettikleri çöplüklerde ölen organizmalar olduğu kanısına varılabilir.

1.3.3-DNA'ya Etkisi:

Hidrojen peroksit, oksidantlar arasında en kötü üne sahip olanıdır. Hücrede pek çok bölgeyi hedef alarak, bu bölgelere saldırır ve hidroksil radikalının oluşumuna neden olur. Hidrojen peroksit, hücre içi antioksidantları tüketir, süperoksit dismutazı inhibe ederek ortamda süperoksit radikallerinin birikimine, dolayısıyla da oksidatif strese yol açar. Hidroksil radikallerinin saldırısına karşı en hassas yapıya sahip olan DNA'da, zincir kırılmalarına ve bazların hidroksilasyonuna neden olmaktadır. DNA zincirinin kopması bir DNA bağlayıcı protein olan poli (ADP) polimerazı aktif hale geçirir. Bu protein, NAD'i substrat alarak nükleer proteinlere bağlı ADP-riboz polimerlerini

oluşturur. Bu durumda da NAD turnover'ı azalır ve sonuç olarak ta ATP sentezi (mitokondrial sentezi) inaktive edilir.

1.4-Detoksifikasyon Reaksiyonları:

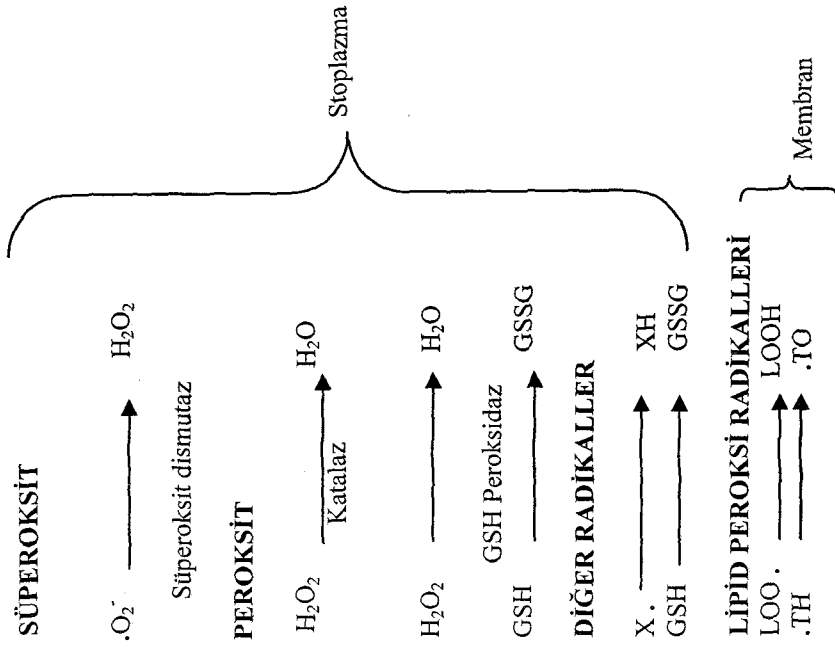
Hücrelerde kendiliğinden oluşan yada belki de düz endoplazmik redikulumdan tomurcuklanarak oluştuğuna inanılan peroksizomlar içinde, oksidaz enzimleri bulunmaktadır. Bu enzimlerin bir kısmı, farklı hücre içi kimyasal maddeleri oksijen ile birleştirerek hidrojen peroksit üretme yeteneğine sahiptirler. Hidrojen peroksitin kendisi, yüksek bir oksitleme kapasitesine sahiptir ve bir başka oksitleyici enzim olan ve peroksizomlarda bolca bulunan 'katalaz' ile bağlantılı olarak kullanılır. Bu enzimler, hücre içi zehirli olabilecek maddeleri oksitleyerek zararsız hale getirirler.

Oksijen metabolitlerinin suya indirgenmesini hızlandıran mekanizmalar, stoplazmada lokalize olmuştur. Burada süperoksit radikalının dismutasyonu, süperoksit dismutaz tarafından hızlandırılır. Sonuçta hidrojen peroksit, bu şartlar altında glutatyon peroksidaz ve GSH'ın kendisi tarafından elimine edilmektedir. Buna rağmen doğal potansiyel fazlalık, katalaz formuyla ve buna ilaveten GSH destekli bir mekanizmayla sağlanır. GSH, oksijenin diğer çeşitlerini, karbon, nitrojen ve sülfür kaynaklı radikalleri de elimine etmektedir (Şekil-1.1).

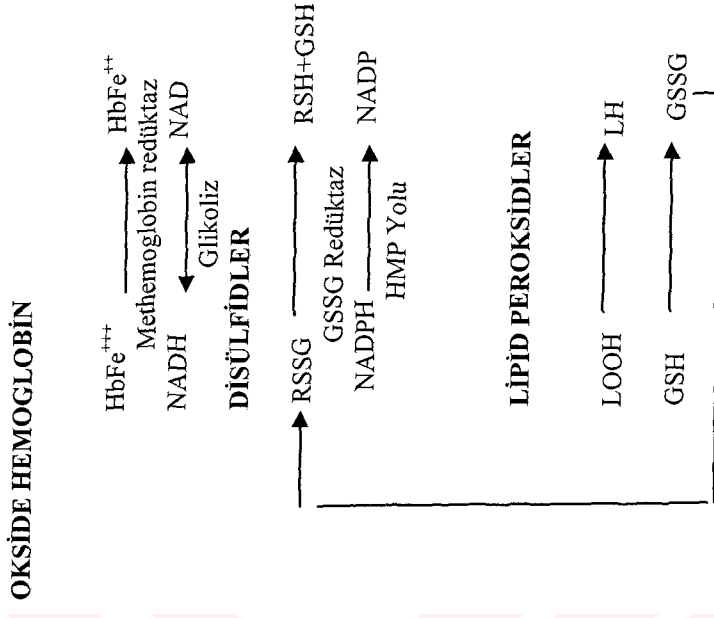
Detoksifikasyon mekanizması, spesifik olarak sadece eritrosit zarında lokalize olmuştur. Lipit peroksi radikallerinden (LOO^{\cdot}) E vitamininin (tokoferol) etkisiyle oluşan lipithidroperoksidazların bazılarının GSH tüketimiyle, GSH peroksidazlarca *invivo* şartlarda indirgendiği gözlenmiştir (WILEY ve SONS, 1988). Bu nedenle sterik karşılığı olan organik yapıli hidroperoksitlerle eritrosit zarının tamiri bu mekanizmayla sağlanır.

Aslında vücudun işlevlerini görebilmesi ve hastalıklardan korunabilmesi için gerekli olan serbest radikaller, sınırlarının üstüne çıkıp aşırı yüklenme gösterdiklerinde ters bir etkiyle vücut için zararlı yapılar haline dönüşmektedir. Bu nedenle vücutta oldukça hassas bir dengeyle kontrol edilmelidirler.

Detoksifikasyon Reaksiyonları



Hasar Tamir Reaksiyonları



Şekil 1.1. Eritrosit Antioksidant Sistemi (WILEY – SONS, 1988).

Vücudumuzda bu hassas dengeyi koruma amaçlı bazı enzimler bulunmaktadır. Serbest radikalleri yok eden bu enzimlere ve antioksidant moleküllere değinmekte yarar vardır;

1.4.1-Enzimler:

1.4.1.1-Süperoksit Dismutaz:

Hücre içinde, üç çeşidi görülen ve mitokondride doğal olarak bulunan bir enzimdir. Süperoksit radikallerini, daha az reaktif olan hidrojen peroksit formuna çevirmektedirler.

1.4.1.2-Katalaz:

İnsan hücrelerindeki peroksizomlar içinde bulunur ve hidroksil radikallerinin oluşumunu önlemek için hidrojen peroksiti suya ve moleküler oksijene ayrıştırır.

1.4.1.3-Glutatyon Peroksidaz:

Redükte glutatyonun (GSH), -SH grubundan, su oluşturmak için hidroksil radikali veya hidrojen peroksit ile birleşerek hidrojen çıkışını sağlar.

1.4.1.4-Sülhidril Proteinleri ve Diğer Serum Proteinleri:

Organik peroksitleri ve hidroksil radikallerini zararsız kimyasallara dönüştürürler.

1.4.2-Antioksidant Moleküller:

Beta karoten, askorbik asit ve alfa-tokoferol gibi antioksidantların, serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önlediği in vitro ve in vivo çalışmalarla gösterilmiştir. Bunların yanı sıra yine serbest radikal oluşumunu önleyen taurin, bilirubin ve ürik asit gibi doğal antioksidantlar ise sütte, karaciğer ve böbrekte bulunmaktadır.

Tüm bunların yanında en önemli ve üzerinde en çok çalışılan antioksidant vitaminler, vitamin E ve C'dir.

Çoğunlukla hücre zarında bulunan E vitamini, serbest radikallerin hücre zarına, DNA ve diğer hücre komponentlerine zarar vermesini önleyen önemli bir antioksidanttır. E vitamini (alfa-tokoferol), normal yeniden oluşum, kas işlevleri ve diğer pek çok vücut fonksiyonları için gereklidir.

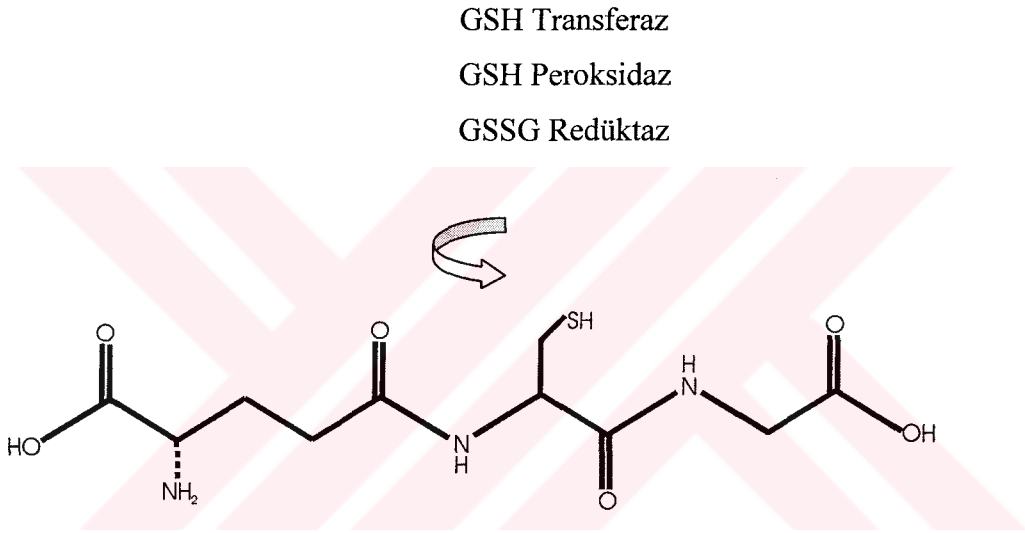
Bir diğer önemli antioksidant olan C vitamini ise (askorbik asit) elektron donörü gibi işlev görerek, E vitamini radikalini tekrar redükleyip E vitamini haline dönüştürmektedir. Ayrıca C vitamini, etkili bir anti-kanser ajanı olarak kanseri yenmede de kullanılabilir. Bu işlevlerini; lipitlerin peroksidasyonunu önleyerek, serumdaki lipit peroksitleri azaltıp, dejenerasyon ve yaşlanmayı yavaşlattığı; DNA'ya verilebilecek olası serbest radikal hasarlarını önlediği bilinmektedir. C vitamini çevre etkisiyle oluşan pek çok kirlilik, toksik, karsinojenik ve mutojenik etkileri karaciğerdeki detoksifiye edici enzimleri stimüle ederek engellemektedir.

Bir fenol olan koenzim Q'da pek çok dokuda E vitamini gibi davranmaktadır. Vitamin A ve beta-karoten, bazı durumlarda bir antioksidant gibi davranmakta; biyoflavonoitlerse antioksidant özelliğe sahip olmaktadır.

Bunlar içerisinde, konumuzun ana temasını oluşturan glutatyon ise H atomu donörü olarak, fenoller gibi işlev görmektedir.

1.5-Glutatyon Nedir?

Bir tripeptit; L- γ -glutamil-L-sistein yada GSH olarak adlandırılan glutatyon; düşük moleküler hacme sahip bir tiyol bileşiğidir (Şekil-1.2).



Şekil 1.2 Glutatyon (Sies, 1999)

Sies (1999) tarafından bildirildiğine göre; ilk olarak 1960'larda Kosower tarafından keşfedilip tanımlanmıştır. Tüm hayvan ve bitki hücrelerinde bulunan bu bileşiğin moleküler ağırlığı 307 gramdır. GSH'da peptidik γ -bağlantısı, tripeptit yapısını, aminopeptidazların yıkımından korur. Genel olarak bu bileşik, tiyol/disülfit redox potansiyelini koruyarak hücrel tiyol 'redox tamponu' olarak işlev görür.

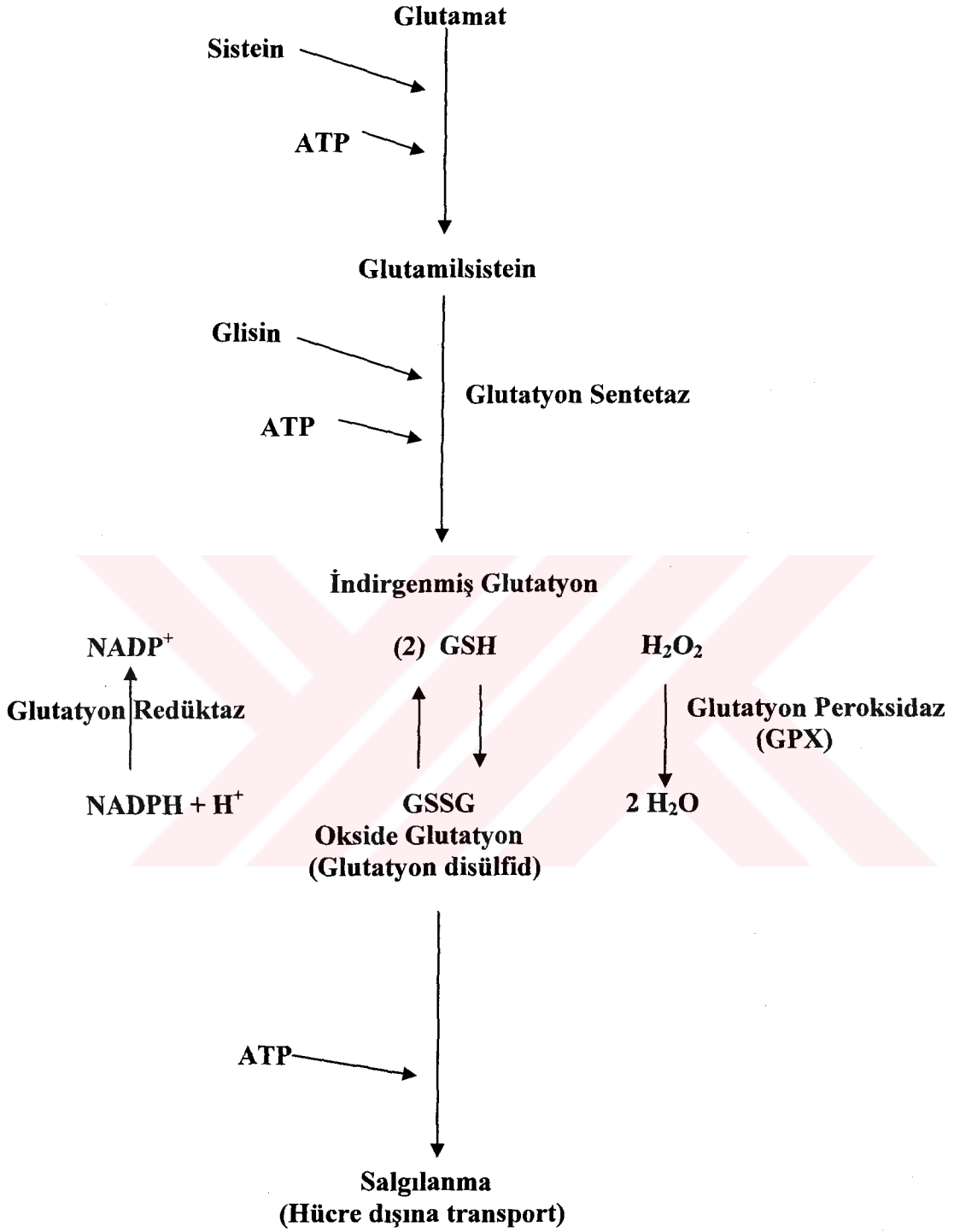
Ulakoğlu ve arkadaşları (1998) tarafından bildirildiğine göre, GSH'ın; DNA ve protein sentezleri, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, hücre içi ve dışı transportlar gibi hücrel fonksiyonlara sahip olduğu Meister (1983) ve Deneke (1989) tarafından belirtilmiştir. Bunun yanı sıra serbest radikallerin uzaklaştırılması ve xenobiotiklerin

yani hücreye yabancı olan kimyasal maddelerin detoksifikasyonunda da bir antioksidant olarak rol oynamaktadır. Redükte glutatyonun hücre içindeki görevi genel olarak; proteinleri oksidasyondan korumak ve hemoglobindeki demirin ferroz (Fe^{++}) halinde kalmasını sağlamaktır (SRIVASTAVA ve BEUTLER, 1969). Bir tripeptit olmakla birlikte bir okside forma (disülfit) ve bir indirgenmiş forma (sülhidril) sahip olan GSH, yapısında üç aminoasit bulundurmaktadır. Bu aminoasitler: L-glutamat, L-sistein ve Glisin'dir. Diğer yandan da reaktif grup olarak $-SH-$ grubunu içermektedir ve bu grup vasıtasıyla reaktif xenobiotiklerle birleşerek konjugatları oluşturmaktadır. Oluşan bu konjugatlar daha sonra eritrositlerden uzaklaştırılıp, karaciğerde metabolize edilmektedirler.

1955'lerde, insan eritrositlerindeki GSH'ın yarı ömrünün 3-4 gün olduğu belirtilmiştir (OLIVE ve BOARD, 1994). Srivastava ve Beutler (1969) tarafından yapılan çalışmalarda GSH'ın yapısı ve işlevi hakkında oldukça fazla bilgi edinilmesine rağmen, eritrosit glutatyonun metabolizmasının tam olarak açıklanamadığı belirtilmiştir. Bu konuda bilinenler ise Ulakoğlu ve arkadaşları (1998) tarafından şematize edilmiştir (Şekil-1.3).

Ulakoğlu ve arkadaşları (1998) tarafından bildirildiğine göre, GSH'ın, tüm memeli hücrelerinde bol miktarda sentezlendiği (0,5-10 mM) Muth (1990) ve Cochrane (1991) tarafından belirtilmiştir. Şekil-1.3'te görüldüğü gibi bu sentez iki basamakta gerçekleşmektedir. Birinci basamakta, γ -glutamilsistein sentetaz enzimi GSH'ı oluşturacak olan aminoasitlerden glutamat ve sisteinden, γ -glutamilsisteinin oluşumunu katalizlemektedir. İkinci basamaktaysa glutatyon sentetaz, glisin ve γ -glutamil-sisteinden glutatyonu oluşturmaktadır.

GSH, negatif feed-back ile glutamilsistein oluşum hızını ve böylelikle de kendi sentezini denetlemektedir. Bu sentezde bir molekül GSH için iki molekül ATP'nin hidrolizi gerekmektedir (ULAKOĞLU ve ark., 1998).



Şekil 1.3. Glutatyon Sentezi (ULAKOĞLU ve ark., 1998).

1.5.1-GSH Nereden Salınır ve Salınımında Rol Oynayan Enzimler Nelerdir?

L-glutamat, L-sistein ve Glisin'den birbirini izleyen iki basamakta sentezlenen GSH, Griffith (1999) tarafından verilen ve memeli glutatyon sentezinin düzenlenişinde geçerli olan bilgiye göre; Glutatyon sentetaz ve γ -glutamil-sistein sentaz tarafından oluşturulan aminoasitlerden hücre içinde sentezlenmektedir. Sisteinil-glisin dipeptidaz ve γ -glutamil transpeptidaz yoluyla bileşiği oluşturan aminoasitler içine degradasyon meydana gelmektedir. Bu olay, biyolojik fonksiyonları ilgilendiren diğer birçok önemli reaksiyonları da içermektedir. Bu reaksiyonlar, disülfid oluşumu, tiyoeter ve tiyolester oluşumu gibi redox reaksiyonlarına ilişkin tiyol grubunda gerçekleşmektedir. Redox reaksiyonları, GSH peroksidazın farklı çeşitlerince ve GSSG (okside glutatyon) redüktaz tarafından katalize edilmektedirler. Oysa tiyolester oluşumunda, enzimlerin büyük bir kısmı, glutatyon transferaz (GST) tarafından belirlenmektedir (SIES, 1999).

GSH indirgenmesi, eritrosit metabolizmasının önemli bir ürünüdür ve hücrelerin oksidatif stresten korunması için hayati bir önem taşımaktadır.

1.5.2-GSH'ın Görevi ve Hücre İçin Önemi:

Eritrositler yüksek oksijen basıncına ve demir gibi yüklü serbest radikallerce oksidatif strese maruz kaldıklarında kolayca zedelenirler. Bu nedenle etkin savunma mekanizmalarına sahiptirler. Bu mekanizmaların biri de redükte glutatyonudur.

GSH, önemli bir hücre içi antioksidanttır. Bu nedenle, sabit durum konsantrasyonuna dayanan NADPH'ın, pentoz yan yoluyla oluşumuna ihtiyaç duyulmaktadır. Aynı zamanda hücrelerin Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği de, oksidatif strese dayanma güçlerini azaltmaktadır.

Oksidatif strese maruz kalan eritrositler, taşıdıkları GSH'ı hızla okside ederek, okside glutatyon formuna (GSSG) dönüştürürler. Bu formu da aktif taşımayla hücre dışına transport ederler. GSH, hücre zarından hemen hiç penatre olmazken, GSSG çok

daha kolay transport edilmektedir. Ancak eritrositler, bu transport sistemine sahip olmadıklarından, transport işlemi hücre zarına penatre olan ajanlarca (NAC veya GSH esterleri gibi) hücre içi GSH düzeylerinin artışı sağlanarak gerçekleştirilir. Glutasyon sentetazın etkinliğiyle hücrelerde bir kere sentezlenen GSH, biyolojik zarlardan transporta maruz kalır. GSH salınımı, ana sentez kaynağı olan karaciğerde gerçekleşir ve okside formu olan GSSG'nin salınımında olduğu gibi diğer dokulara kan dolaşımıyla ulaştırılır. Ayrıca bu konudaki çalışmalar eritrositlere ilaveten hücre zarları, iris ve karaciğer hücrelerinde de GSSG transportu sırasında, hücre içi GSH düzeylerinin arttığını göstermiştir (SRIVASTAVA ve BEUTLER, 1969).

Eritrositlerin GSSG içeriği, hücre, hidrojen peroksit, azoester veya t-bütül hidroperoksit (BHP) gibi okside edici ajanlarca muamele edildiğinde, oldukça fazla miktarlarda yükseltgenmiştir. Bu şartlar altında eritrositler, hızla GSSG bırakmaktadırlar. GSSG'nin bu çıkışı, aktif bir aktif taşıma işlemine ihtiyaç duyar ki bu olay, daha sonrada değineceğimiz gibi florid tarafından inhibe edilmektedir. Çeşitli hayvan türlerinde, GSSG'nin transportu incelendiğinde, GSSG düzeylerinde suni bir artış gözlenir ve GSSG transport oranının in vitro GSH devrinin oranıyla paralellik gösterdiği anlaşılmıştır (SRIVASTAVA ve BEUTLER, 1969).

Srivastava ve Beutler (1969) ile Awasthi ve ark. (1981) yaptıkları deneylerin ilk basamağında, oksidatif strese maruz bırakılan eritrositlerin dışa doğru aktif glutasyon transportu yaptığı ve bu transport oranının, eritrositlerdeki glutasyon indirgenmesi için yeterli olduğu belirtilmiştir. Tahminen bu transport, hızlı transportun bazal düzeyini göstermekte ve oluşmalar da GSSG düzeylerinin önemli ölçüde yükseltmektedir. Böylece oksidatif strese maruz kalan eritrositler için bir koruma mekanizması oluşmaktadır.

1.6-Hasar Tamir Mekanizmaları:

Günlük tüm hemoglobin oksiditesi yaklaşık % 3'tür. Bu nedenle eritrositlerin methemoglobine (HbFe⁺⁺⁺) indirgenmesi kritik bir tamir mekanizmasıdır. Stoplazmik glutasyon redüktaz da bir detoksifikasyon ürünü olan okside glutasyonun (GSSG)

redüksiyonunda rol oynar. Ayrıca bu enzim GSH ile hemoglobin arasındaki kompleks disülfidleri ayırır. Glutasyon redüktaz enzimi, protein-protein disülfidlerini indirgemez. Sadece bunları sterik sınırlamalara maruz bırakabilir.

Eritrositlerde bulunan bir diğer enzim olan Glutasyon-S-transferaz'ın (GST) xenobiotikleri metabolize ettiği kanıtlanabilmişken, protein-protein sülfidlerini indirgediğine dair kesin veriler elde edilememiştir.

GSH reaksiyonlarının meydana geldiği yerler olan hücrel ve spesifik hücre içi doku kısımlarında oldukça çeşitli spesifik kimyasal reaksiyonlar gözlenmektedir (Xenobiotikler ve elektrofilik metabolitlerin oluşumu, GSH'dan glutasyon konjugatlarının oluşumu). Bu tür reaksiyonların gerçekleşmesinde rol oynayan enzimlerden biri de GST enzim grubudur. Bu grup, geniş bir tiyoeter grubuna sahiptir ve 'glutasyon-S-konjugatları' olarak ta bilinmektedir.

Eritrositlerde GST'in tek bir formu görülmektedir ve bu glutasyon konjugatları formuna olan kapasitelerini göstermektedir. GSH yıkımını sağlayan γ -glutamil transpeptidazın etkisiyle, γ -glutamil sistein peptid bağının ayrılması, glutasyon konjugatlarının bozulması ve metabolizmasında genellikle ilk basamak olarak düşünülmektedir. Bu nedenle bu enzim eritrositlerde bulunmamaktadır. Bu reaksiyonlar sonucu oluşturulan ürünleri ise genelde GSH kullanmaktadır. Ancak GSH, detoksifikasyon ve eliminasyon işlemlerini her zaman yapmamakla birlikte, detoksifikasyonda safısal salgı ve böbreğe ait salgının salınımı için organlar arası transportta, sahip olduğu fonksiyonlarıyla özellikle merkapturik asit metabolik yoluna öncülük etmektedir.

1.6.1-GST'nin Transport İşlemindeki Rolü:

Xenobiotiklerin detoksifikasyonu, birçok enzim ve aracı mekanizmaları içerir ve görevi; vücudu zararlı bileşiklerden korumaktır. Bu nedenle GST, hücrel detoksifikasyonda öncelikli bir rol oynamaktadır.

GST, α , γ , p ve Q sınıflarını içeren izoenzimlerin familyasındandır ki canlı vücudunda oldukça geniş bir alana yayılan zengin kaynaklardan biridir (Şekil-1.3). Bu

enzimler, konjugasyon reaksiyonları sırasında GSH indirgenmesini katalizler ve iç-dış kaynaklı etkilere bağlı elektrofilik merkeze hidrofobik bileşiklerin geniş bir kısmını kapsar. GST varlığında glutasyon tiyol eterleri, bir elektrofilik merkeze hidrofobik xenobiotiklerin konjuge bir türü olarak taşınır ki karşılığı olan merkapturik asit (Konjugat + NAC) formuna metabolize edilebilirler (OLIVE ve BOARD, 1994).

Merkapturik asit, γ -glutamil transpeptidaz, dipeptidaz ve N-asetil transferaz tarafından katalize edilme sonucunda oluşmaktadır. Eritrositler, GST'a zengin miktarda sahipken, merkapturat yolunun ikinci enzimi olan γ -glutamil transpeptidazın varlığı halen tartışma konusudur (Şekil-1.4).

GST, 1-kloro 2,4 dinitrobenzen (CDNB), 3,4-dikloronitrobenzen ve p-nitrobenzilklorid olmak üzere üç substrata sahiptir. Bozulmamış eritrositlerin CDNB ile muamele edilmesi sonucunda, süpernatantta S- (2,4 dinitrofenil) glutatyona (Dnp-SG) rastlanmıştır. Bu da eritrositlerdeki metabolitlerin, GST tarafından hücre dışına transport edildiğinin bir göstergesidir.

GST, bir dimerik süpergen ailesidir ki bu enzimler, doymamış karboniller, organik halidler (klor grubundan bir unsurla oluşan tuz) ve diğer substratları içeren okside elektrofillerin bir çeşitine GSH'ın konjugasyonunu katalizlerler. Tüm canlı gruplarında ifade edilebilmeleri bu enzimlerin önem kazanmasına neden olmuştur.

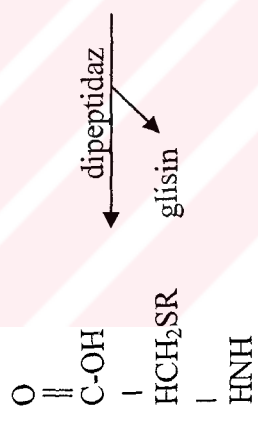
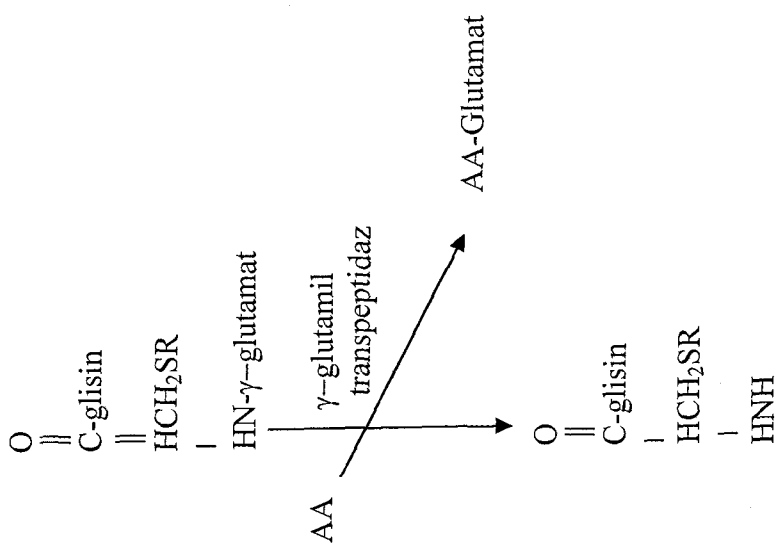
İnsanlarda GST oluşumlarında polimorfizm, yeni bilgiler ışığında genotip ve fenotipi değiştiren çeşitli hastalıklara hassasiyet ile ilişkilidir. Bu nedenle GST genotipleri tek başına ve kombinasyonlarda klinik sonuçlarla bağlantılıdır.

1.6.2-GST Oluşumlarında Polimorfizm:

Ailesel kodlu 7 sitosolik GST enzimi belirlenmiştir. Bu familyanın çeşitli varyasyonlarda 5 alellik grubuna rastlanmaktadır. Bunlar:

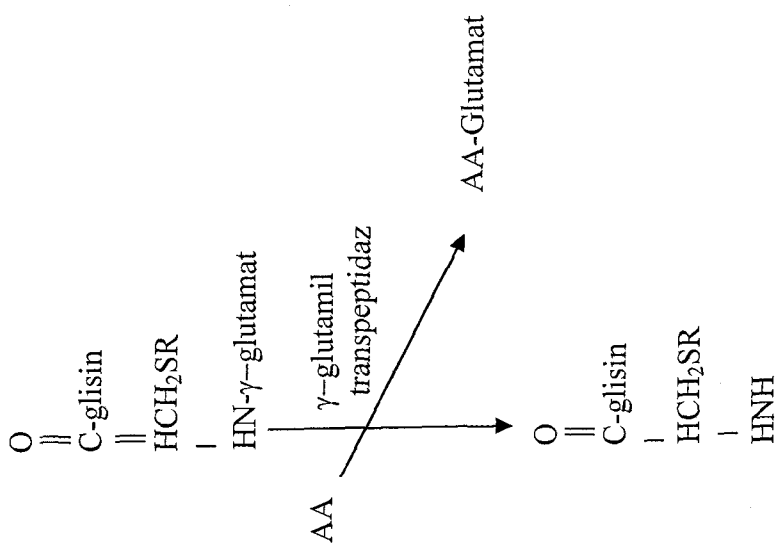
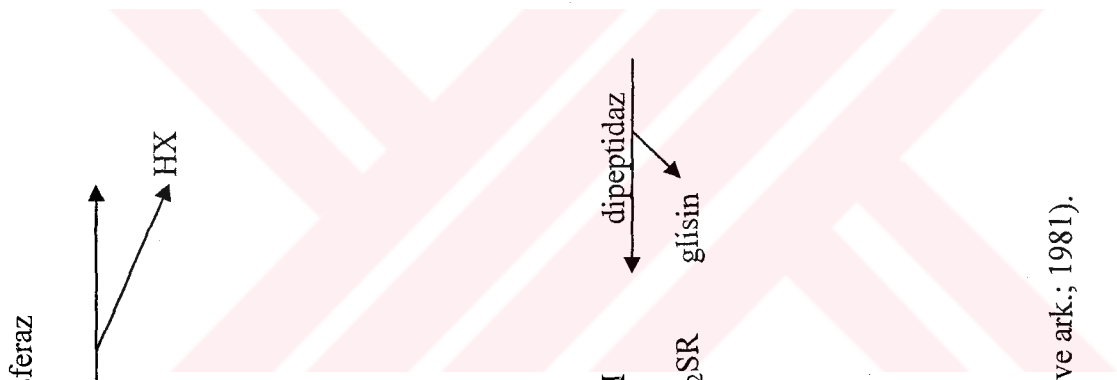
a) α -türü b) mu türü c) Teta türü d) Pi türü e) Zeta türü

Özellikle zeta türü filogenetik çalışmalarla son zamanlarda belirlenmiş bir gen türüdür ve glioksilik asite, dikloroasetik asitin oksitlenmesini katalize eden bir rekombinant insan enzimidir.



RX : A hidrofobik bileşik X elektrofilik grubuna sahip
 AA : Akseptör (alıcı) aminoasit

Şekil1.4. Merapturik Asit Metabolik Yolu (AWASTHI ve ark.; 1981).

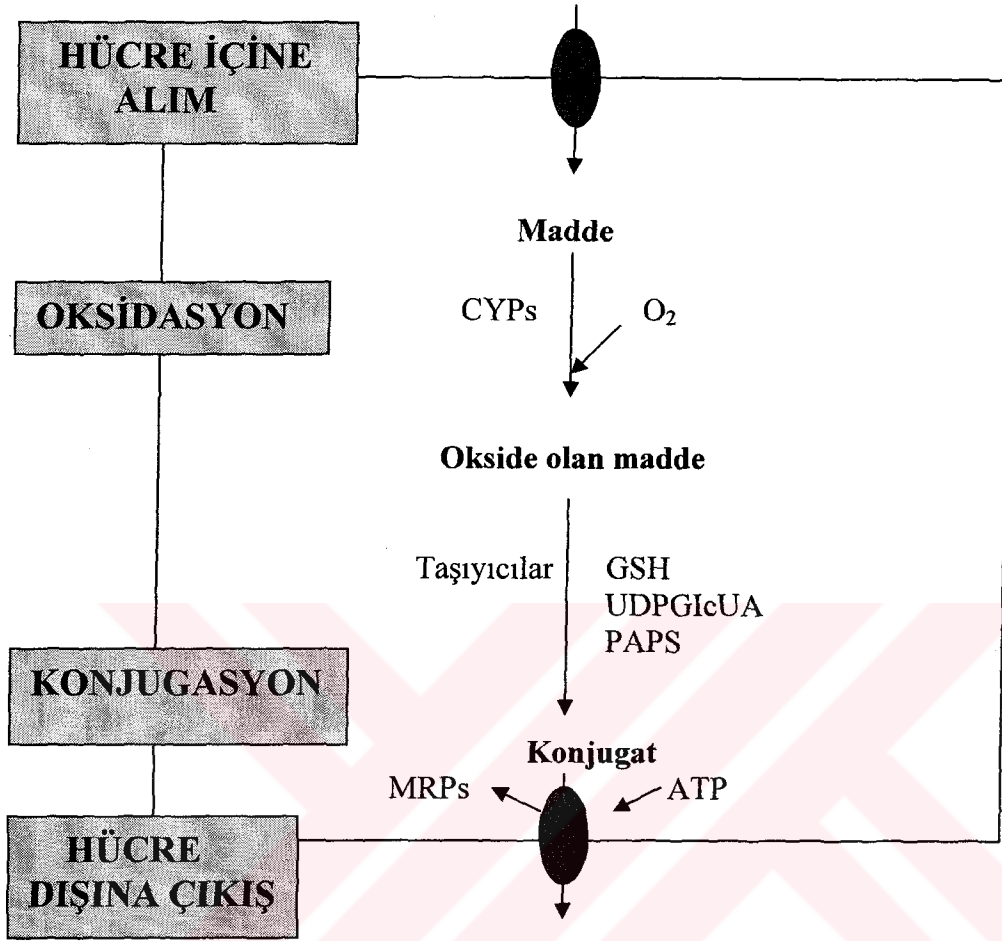


GSH'nin transportu ve glutatyon metabolitleri, okside olan glutatyonu (GSSG) içerir ve hücre dışında GSH'nin hücrel döngüsüne yardım ederler. Olive ve Board (1994) tarafından bildirildiğine göre; Faz-1 (oksidasyon) ve Faz-2'nin (konjugasyon) ürünlerinin ayırımında Ishikawa (1992) tarafından GS-X pompası olarak adlandırılan spesifik bir ATP bağımlı glutatyon S- konjugat dış pompasına ihtiyaç duyulmaktadır.

1.7-Glutatyon –S- Konjugatları İçin Export Pompaları:

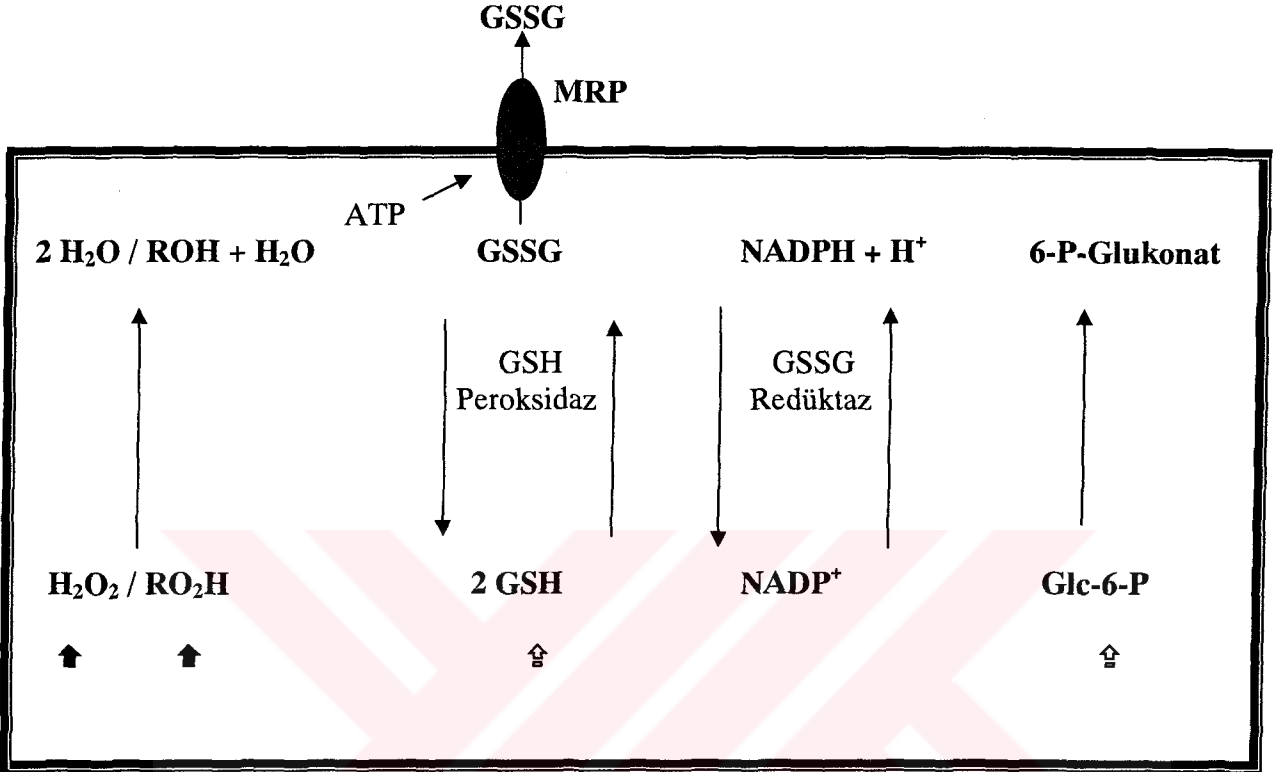
Glutatyon konjugatlarının aktif transportu, orijinal olarak insan eritrositlerinde gösterilmiştir. Bununla birlikte salgı glutatyon konjugatları gibi düzenleyici faktörler olarak ifade edilen spesifik taşıyıcıların yapı ve moleküler mekanizmaları hakkında çok az şey bilinmektedir. Hücrelerden glutatyon-S-konjugatlarının bırakımı, son zamanlarda keşfedilen Multi Drug-Resistance Protein (MRP) familyasına ait olan integral zar glikoproteinlerince yapılan ATP bağımlı aracı bir işlemdir. Glutatyon, glukuronat veya sülfat ile konjuge edilen birçok lipofilik bileşik, MRP familyasının export pompaları için substrat olarak rol oynar. Ortologların, bitkiler, nematotlar ve bira mayalarını içeren birçok türde aynı olduğunu ispatladığı MRP familyasının, insanlarda farklı genlerce kodlanan 6 izoformu bulunmaktadır.

İnsan MRP1 ve MRP2'si günümüzde en iyi olarak iç-dış zar veziküllerine ATP bağımlı transportun ölçümlerince spesifik substrata göre karakterize edilmektedir. Yüksek affiniti substratları, glutatyon S-konjugat lökotrini C₄, S-(2,4 dinitrofenil) glutatyon, bilirubin, glukuronositleri ve 17 b- glukuronosit estradiol içerirler. Ayrıca glutatyon disülfid, MRP1 ve MRP2 tarafından transport edilmektedir (Şekil-1.5). İndirgenen glutatyon, MRP familyasının üyelerince direk yada indirek aracı bir işlemde hücrelerden salınmaktadır. MRP familyasının proteinleri, hücre dışı ortama glutatyon disülfid ve glutatyon S- konjugatlarının transportu ve hareketi için zorunludur. Bu nedenle oksidatif strese karşı savunma detoksifikasyondaki rolü kesindir (Şekil-1.6) (KEPPLER, 1999).



Şekil 1.5. Glutasyon S- konjugat Pompaları (KEPPLER, 1999).

İlaçlar ve karsinojen endogenous maddelerin transport ve detoksifikasyonu. Konjugatlar ile glutasyon, glukoranat veya sülfat, MRP ailesinin bir üyesi tarafından ATP bağımlı transport aracılığı ile hücreden ayrılırlar. Konjugatlar, MRP aracılı dışarıya atımın yokluğunda hücrede tutulurlar.



Şekil 1.6. Glutatyon disülfidin MRP aracılı dışa verimi (KEPPLER, 1999).

MRP1 ve MRP2 için GSSG bir substrattır. Oksidatif stres şartları altında glutatyon redüktaz tarafından GSSG'nin redüksiyonu son sınırdadır. Böylece, GSSG'nin dışarı alımındaki artış öncelikli olarak meydana gelir. Hidroperoksit oluşumunun artışı siyah oklarla, oksidatif streste temin edilen metabolitlerin karşı hareketi, kesik oklarla gösterilmiştir.

1.7.1-Eritrositlerden GSSG Transportu:

GSSG transportu için gereken enerjinin kaynağı tam olarak bilinmemekle birlikte bunun ATP olabileceğine inanılmaktadır. GSSG transportunun florid iyonunca inhibisyona duyarlı olduğu ve bir Mg^{++} tutucusu tarafından enerji kaynağında ATP ile birbirini tuttuğu bulunmuştur. Bununla beraber floridin transport sisteminin bir kısmını doğrudan baskıladığı da göz önüne alınmalıdır.

Hücre içi GSSG, heksokinazı ve asit fosfatazı tutabilmektedir. GSSG'nin komplekslerde hemoglobinle bağlandığına inanılır. Görüldüğü gibi GSSG transport sistemi, eritrositlerde GSSG birikimine karşı ikinci bir savunma olayıdır. (İlki, GSH'ın okside GSSG'e dönüşümüydü.) Bu transport sistemi, özellikle G-6-PD eksikliğiyle, bu durumdaki deneklerde önemlidir ve eritrositlerden GSSG'nin aktif dışı transportunun, total glutasyon düzeyini (GSH + GSSG) azalttığı belirtilebilir ki bu, G-6-PD eksik eritrositlerde Srivastava ve Beutler'in (1969) yaptığı çalışmalar sonucu gözlenmiştir. Bu hücrelerce GSSG oldukça hızlı bir şekilde transport edilirler. Bu hızlı transportun nedeni belki de kronik bir şekilde artan GSSG düzeylerine yönelik bir tepkidir ki yine bu hücreler ve bu hücrelerin habercilerinde bu durum gözlenmiştir.

İnsan eritrositlerinden iç ve dış veziküller kullanılarak GSSG için 2 ATP bağımlı transport sistemi belirlenmiştir. Eritrositler dışında göz, karaciğer ve kalp gibi dokuların da GSSG transport ettiği, üstelik karaciğerden transport edilen glutasyon S- konjugat oluşumlarının, tercihen safra içine salgılandığı rapor edilmiştir. Ayrıca karaciğer, kanal membran transportu açısından GS-Dnp ve GSSG arasında bir rekabet olduğu da gözlenmiştir.

Eritrositlerin kapasitelerine oranla oluşan xenobiotikler daha azdır. Bunun nedeni yabancı bileşiklerin biyotransformasyonu için ihtiyaç duyulan enzimlerin bu hücrelerde bol bulunuşudur. Bu nedenle oksihemoglobinle bir monooksijenaz gibi etki eden 25 mM demirin, hücre içi konsantrasyonu, oksijenat-1 kloroanilin ve C oksijenat anilin olarak gösterilmektedir. Hatta oksihemoglobinin peroksidatik aktivitesi, özellikle aminofenoller ve fenil hidroksilaminlerle reaksiyonlarında daha etkilidir. Eckert ve Eyer (1986) tarafından eritrositlerde aminofenollerin reaksiyonları üzerindeki çalışmalar 4-

dimetil aminofenolde (DMAP) yoğunlaşmıştır. DMAP, yüksek oranlarda *in vivo* ve *in vitro* ferrihemoglobinin oluşumunu katalizlemektedir. Bu olay, DMAP'nin siyanür zehirlenmesi tedavisinde kullanımını mümkün kılmaktadır.

Katalitik ferrihemoglobin oluşumu, yan reaksiyonlarca (hemoglobinde reaktif –SH gruplarına okside olan DMAP'nin hızla bağlanması ve tiyoeter oluşumuyla GSH indirgenmesi) sonlanır. DMAP ile Glutasyon S- konjugatlarının oluşumu, insan eritrositlerinde *in vitro* olarak meydana gelmektedir.

Geliştirilen HPLC yöntemiyle, *in vitro* insan eritrositlerinde DMAP'lerle glutasyon S- konjugatlarının oluşumu ve transportu Eckert ve Eyer (1986) tarafından incelenmiştir. Bu yolla ayrıca diğer bir elektrofilik bileşiğin; 1-kloro-2,4-dinitrobenzenin (CDNB) etkisi de araştırılmıştır.

CDNB, GST tarafından kabul gören bir substrattır. CDNB ile muamele edilen hücrelerde GS-Dnp denen bir glutasyon S- konjugatı meydana gelmektedir. Bu glutasyon konjugatı da GST tarafından hücre dışına transport edilmektedir. Transport sistemi, ATP konsatrasyonu, değişen sıcaklığa duyarlılık ve florid tarafından inhibe edilmektedir. Bu özellikler, eritrositlerden glutasyon konjugatları transportunun, metaboliksel bağımlı ve belki de aktif bir ürün olduğunu açıklamaktadır. Bu karakteristikler, eritrositlerden transport edilen glutasyon konjugatları ve GSSG'nin her ikisinin, aynı mekanizmayla transport edildiği fikrini ortaya çıkarmaktadır.

1.7.2-GSSG Transportuna Etki Eden Faktörler:

1.7.2.1-Glikoz –6-Fosfat Dehidrogenaz Eksikliği:

Tamer ve arkadaşları (1998) tarafından bildirildiğine göre, enzim eksiklikleri içinde en yüksek insidansı gösterdiği bilinen G-6-PD (D-glikoz-6-fosfat: NADP +

oksidoredüktaz) enziminin, yeryüzünde 400 milyondan fazla insanı etkilediği Beutler, 1975, 1991; Say ve ark. (1965) tarafından belirtilmiştir. G-6-PD enzim eksikliği, Türkiye genelinde, Say ve ark. tarafından (1965) % 6 olarak, Çukurova bölgesinde ise Yüreğir ve İsbir (1984) tarafından % 8,2 olarak rapor edilmiştir (TAMER ve ark., 1998).

Enzimin, X kromozomu üzerinde resesif halde bulunduğu ve X'e bağlı geçiş gösterdiği 1985'te DeLeon ve ark. tarafından bildirilmiştir (TAMER ve ark., 1998).

Eritrositlerde glikozun % 10'u heksoz mono fosfat (HMP) yoluna girmektedir. Enzim, glikoz-6-fosfat'ın, 6-fosfoglukanolaktone dönüşümünü katalizlerken Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat'ın (NADP) redükte hale geçmesini sağlamaktadır. Oluşan redükte NADP'ler de birçok kimyasal olayların düzenlenmesinde ve hücreye redükte glutatyon (GSH) temininde kullanılmaktadır. Bu enzim eksikliğinde, redükte glutatyon üretimi azalacağından, hücrenin kendisini oksidatif strese karşı koruyamayacağı ve hemolitik anemi tablosu gelişeceği Beutler (1978) tarafından belirtilmiştir (TAMER ve ark., 1998).

Joseph ve Peter (1982) tarafından belirtildiğine göre, herhangi bir travmaya maruz kalan dokular, immünolojik olan veya olmayan bir etkene karşı, fagositik hücrelerle korunmaya çalışırlar ve bu fagositik hücrelerin en fazla çalışanları nötrofiller, doku makrofajları ve monositlerdir (TAMER ve ark., 1998). Tamer ve ark. (1998) tarafından bildirildiğine göre, nötrofil ve makrofajların aktivasyonu, respiratuar bir patlamayla sonuçlanmaktadır. Bu olay da HMP yolu üzerinde glikoz metabolizmasını ve oksijen tüketimini 2-20 kat arttırmakta ve oksijen tüketimindeki bu artışla birlikte nötrofillerin ve makrofajların süperoksit anyonu (O_2^-) ile hidrojen peroksit (H_2O_2) salgıladıkları Reslinski ve ark. (1988) tarafından belirtilmiştir.

Murray ve arkadaşlarının (1993) belirttiğine göre, G-6-PD enzim aktivitesini, alınan besinlerin kalite ve kantitesi, hormonlar ve NADP düzeyi etkilemektedir. Enzimin kataliz ettiği reaksiyon sonucunda oluşan redükte NADP'ler, sülfhidril gruplarının korunmasında, serbest radikallerin ve peroksitlerin detoksifikasyonunda, yağ asiti sentezi gibi bir çok biyosentetik reaksiyonda kullanılmaktadır (TAMER ve ark., 1998).

Okside glutatyonun hücre içi reaksiyonunu kataliz eden Glutatyon redüktaz enziminin koenzimi olan NADPH'lar, G-6-PD enzim eksikliği durumunda yeterince üretilmeyeceği için eritrositler oksidatif strese karşı korunamamalarıyla 120 günden önce yıkılacağı Arese ve De Flora (1990), Beutler (1978) tarafından belirtilmiştir (TAMER ve ark., 1998).

Enzim eksikliği olan olgularda oksijen tüketiminin ve serbest radikal üretiminin arttığı bilinmektedir. Serbest radikal üretimindeki artış methemoglobin oluşumuna neden olacağı ve antioksidant mekanizmasının, oluşan methemoglobini dolaşımdan temizleyemeyeceği; hemoglobin oksidasyonu ile oluşan süperoksit anyonlarının enzim eksikliği nedeniyle yeterince üretilmeyen NADPH eksikliğine bağlı olarak uzaklaştırılmayacağı ve yetersiz GSH nedeniyle, glutatyon peroksidazın işlevini tam olarak göremeyeceği, Arese ve De Flora (1990), Beutler (1978,1991), Janney ve ark. (1986) tarafından belirtilmiştir (TAMER ve ark., 1998).

G-6-PD enzim eksikliğinde gözlenen hemoliz olayının fizyopatolojisine açıklık getirmek amacıyla bu enzim eksikliği saptanan hücrelerde; eritrosit membran enzimlerinden olan $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{/Mg}^{++}$ adenozin 5'- trifosfataz ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{/Mg}^{++}$ ATPaz) ile süperoksit dismutaz (SOD) ve hasarın göstergesi olarak ta plazma malondialdehit (MDA) düzeyleri Tamer ve ark. (1998) tarafından çalışılmıştır.

Çalışmaları sonucunda G-6-PD enzim eksikliği gözlenen olgularda plazma MDA düzeyinin % 61 artarken, eritrosit SOD enzim aktivitesinin % 49 azaldığı gözlemlenmiştir.

Topçu ve ark. (1985) yaptığı çalışmalarda bu enzim eksikliğinin gözlemlendiği hücre zarı $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{/Mg}^{++}$ ATPaz ve $\text{Ca}^{++}\text{/Mg}^{++}$ ATPaz enzim düzeyinde normale göre farklılık gözlenememiştir. Aynı şekilde Akoğlu ve arkadaşları da (1984) G-6-PD eksikliği gözlenen olgularda $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{/Mg}^{++}$ ATPaz enzim aktivitesinde farklılık gözlemlememişlerdir (Tamer ve ark., 1998).

Ancak Tamer ve ark. (1998) yaptıkları çalışmalarda $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{/Mg}^{++}$ enzim düzeyinin G-6-PD enzim eksikliği görülen olgularda normale göre % 27 azalma tespit etmişlerdir. Bunun nedeni olarak ta serbest radikalleri göstermişlerdir.

Serbest radikaller, direk veya indirek yolla lipit peroksidasyonlarına neden olmakta, bu da eritrosit zar yapısını bozmaktadır. $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{/Mg}^{++}$ ATPaz enzim sistemi

zar lipid tabakasına lokalize olduğundan, bu durumdan etkilenmekte ve inhibe olmaktadır. Bunun sonucu olarak ta Na^+ ve K^+ iyonlarının hücre içi ve dışı derişimlerinde değişimlere neden olarak hemoliz meydana gelmektedir.

Bir diğer çalışma da G-6-PD eksikliği görülen insan eritrositleri ve normal insan eritrositlerinin glutatyon indirgenmesi şeklinde, Srivastava ve Beutler (1969) tarafından çalışılmıştır. Bu çalışmada indirgenme reaksiyonlarını gözlemek için hedef hücreler, H_2O_2 difüzyonuna yada metilfenil azoformata tabi tutulmuşlardır. Böylece okside olan GSH'ın bir kısmının eritrositlerden kaybolduğu ve ortamdaki geri alındığı gözlenmiştir.

Bu olay, normal hücrelerin glikoz yokluğunda inkübasyonu yada G-6-PD'ı eksik hücrelerin glikozlu veya glikozsuz ortamda inkübasyonu ile gözlenmiştir.

Srivastava ve Beutler'in (1969) yaptığı çalışmalarda řu sonuçlara varılmıştır:

Normal Hücrelerde:

Bu eritrositler, glikoz eksikliği görülen ortamda inkübe edildiklerinde ve H_2O_2 'e maruz bırakıldıklarında 4 saatlik bir periyotta GSH düzeylerinin azaldığı GSSG miktarının arttığı gözlenmiştir.

6 saatlik inkübasyon sonrasındaysa GSSG düzeyi anlaşılamaz bir miktara ulaşmış, ATP düzeyi ise kademeli olarak düşmüştür.

Glikoz yada H_2O_2 ile muamele edilmeden inkübe edilen eritrositlerde ise GSSG artışının çok czi olduğu ve total glutatyonun (GSH +GSSG) % 90'dan % 105'e ulaştığı gözlenilmiştir.

G-6-PD Eksik Eritrositlerde:

Bu hücrelerin, normal eritrositlerden daha az GSSG içermekte olduğu gözlenmiştir. Hücreler, glikozlu yada glikozsuz H_2O_2 difüzyonuna tabi tutulduklarında, GSH düzeyinin azaldığı ve GSSG içeriğinin arttığı rapor edilmiştir.

Glikozsuz ortamda inkübe edilen bu eritrositlerde ATP kademeli olarak düşerken; glikozlu ortamda inkübe edilenlerdeyse ATP düzeyinin değişmediği gözlenmiştir. Her iki durumda da G-6-PD'ı eksik eritrositlerde GSSG kaybı, normal eritrositlerden daha fazladır.

1.7.2.2-Sıcaklık:

Normal Eritrositlerde:

Daha önce belirlenemeyen GSSG transportu, glikozsuz ortamda inkübe edilen normal eritrositlerin azoester yada H_2O_2 ile muamelesi sonucu $15\ ^\circ C$ 'nin altındaki sıcaklıklarda belirlenmiştir. İnkübasyon sıcaklığı belki de endogenous substratın tükenmesi ile $30\ ^\circ C$ 'den $37\ ^\circ C$ 'e çıkarıldığında, 4 saat içinde eritrositlerden transport edilen GSSG'nin miktarında nispeten küçük bir artış gözlenmiştir.

G-6-PD'ı Eksik Eritrositlerde:

$15\ ^\circ C$ 'nin altında glikozlu yada glikozsuz ortamda H_2O_2 yada azoestere maruz bırakılan bu eritrositler, belirgin olmayan GSSG transportu gösterirken; sıcaklık arttıkça transport oranında da artış gözlenilmiştir.

1.7.2.3-Endogenous Substratların Tükenişi:

Bu substratlar tükendiğinde her iki tür eritrositlerde belirgin bir GSSG transportu gözlenememiştir.

1.7.2.4-Floridin Etkisi:

H_2O_2 'nin ve azoester muameleli eritrositlerin her ikisinde de 10^{-5} ve 10^{-3} M'lık florid konsantrasyonlarının GSSG transportunu inhibe ettiği gözlenmiştir. Özellikle 0,01 M'lık florid konsantrasyonu, GSSG transportunun tamamen inhibe etmektedir. H_2O_2 muameleli eritrositlerde, GSH'ın GSSG'e dönüşümü floridin farklı konsantrasyonlarında anlaşılabilirken, (total glutatyon geri alımı % 95'e % 100) azoester muameleli eritrositlerde bu oran % 70'e % 75'dir.

1.7.2.5-ATP'nin Etkisi:

Dış ortama, eritrositlerden GSSG transportunun, 25 kat gibi oldukça yüksek bir konsantrasyon gradientine karşın yapıldığı bilinmektedir. GSSG hareketi hücre dışına doğru yani tek yönlü bir harekettir. Bu nedenle olay difüzyondan çok bir aktif taşımadır. Serbest glikozlu bir inkübasyon ortamında bekletilen yıkanmış normal eritrositlerin, birkaç saatlik GSSG transport hacmine sahip olduğu gözlenmiştir. Bu enerjinin kaynağını ATP gibi yüksek enerjili endogenous yapılar oluşturmaktadır. Sonuçta GSSG transportu, oluşan ATP tarafından kısmen rejenere edilmektedir.

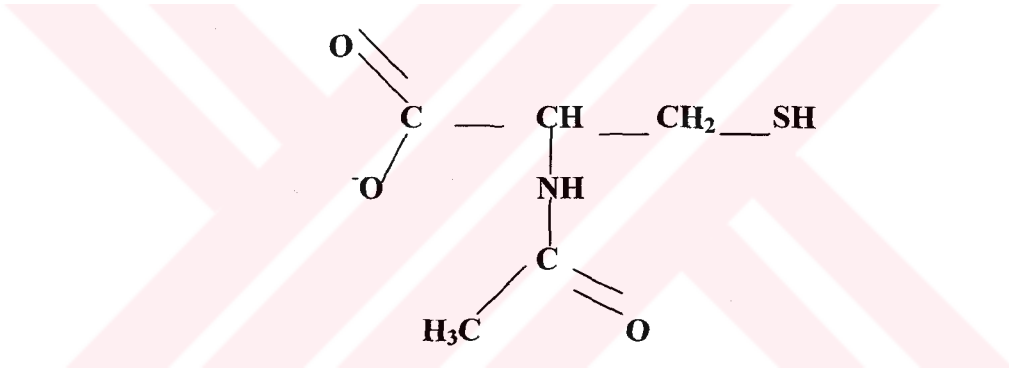
Buraya dek yapılan tüm çalışmalarda, kısaca GSH'ın eritrosit metabolizması için önemi belirtilmiştir. Üç aminoasitten oluşan ve bir reaktif -SH grubuna sahip olan GSH, hücre içinde reaktif xenobiotiklerle birleşerek glutatyon S-konjugatlarını oluşturmaktadır. Oluşan bu konjugatlarda eritrositlerden uzaklaştırılmakta ve daha sonra da karaciğerde metabolize edilmektedir. Böylece hücreler oksijenin yaratacağı bir oksidatif zarardan korunmaktadırlar.

Çalışmamızın amacı ise GSH'ın eritrositlerdeki bu görevinin N-Asetil-L- Sistein (NAC) tarafından yapılıp yapılmayacağını göstermektir. Bu çalışmada, NAC'nin genellikle GSH gibi serbest tiyolün (serbest- SH) tüketimini takiben eritrositlerden CDNB transportunu düzenleyip düzenlemediğini araştırıldı. NAC ile önceden tüketilen

eritrosit GSH'nin muamelesi, GSH yenilenmesi ve transport işlemini tekrarlamada, NAC'nin GSH için bir öncü olarak hizmet ettiği sanılmaktadır.

1.8- L-NAC:

Prescot (1979) tarafından bildirildiğine göre NAC, 1960'larda bir mukolitik ajan olarak keşfedilmiştir (YILDIZ, 1996). NAC, serbest bir sülfhidril grubuna sahiptir ve ilkin plazmada N, N^I-diasetilsistein (NAC-NAC) şeklinde disülfid formda bulunduğu Ctgraeva (1987), tarafından bildirilmiştir (YILDIZ, 1996) (Şekil-1.7).



Şekil 1.7. N-Asetil- L-Sistein'in Kimyasal Yapısı

NAC'nin, orta seviyede serbest radikal içeren çeşitli ajanların toksitesinden hücreleri koruduğu bilinmektedir (YILDIZ, 1996). NAC ve özellikle L-sistein gibi diğer tiyol içeren metabolitler, disülfid bağların kırılmasında ve glutatyon indirgenmesinde antioksidantlar gibi rol oynamaktadırlar. Parasetamol zehirlenmesinde NAC, böbrek ve karaciğerde hücrel ve mitokondrial glutatyon yenilenişinde rol oynamaktadır. Ayrıca, okside tiyollerin redüksiyonu gibi diğer mekanizmalar, nötrofil artışının inhibisyonu, protein hidrolizinin devamı yada redüksiyonu veya sitotoksik parasetamol ile direk reaksiyonu da işlevleri arasında olduğu Holdines (1991) tarafından bildirilmiştir (YILDIZ, 1996).

NAC, serbest, metal bağılı disülfid içeren yada protein tiyollerini içeren diğer tiyollerle karışık disülfidler şeklinde çok çeşitli formlarda bulunabilmektedir. NAC, hücre zar geçişlerinde intravenözden çok oral olarak alındığında hücre içi NAC konsantrasyonlarında daha fazla artış olacağından dolayı glutatyona benzememektedir.

Klinik toksikolojide NAC, karbon tetra klorid ve kloroform gibi ajanlarla zehirlenme sonrası yarar sağlamaktadır. Bazı durumlarda NAC, Howard (1987) tarafından bildirildiğine göre akut karbon monoksit zehirlenmesinin nöropsikiyatrik komplikasyonlarını önlemede de kullanılmaktadır (YILDIZ, 1996).

NAC, hücre zarını kolayca geçerek eritrositler içine giren ve yapısında tıpkı GSH gibi reaktif bir -SH grubu içeren bir maddedir. NAC, hücre zarına kolayca penetre olurken, GSH hemen hiç olmamaktadır. Dolayısı ile transport tek yönlü yani hücre dışına doğrudur.

Daha önce de belirtildiği gibi eritrositler yüksek oksijen basıncına ve demir gibi yüklü serbest radikaller tarafından oksidatif strese maruz kaldıklarında GSH'ı hızla okside etmektedirler. Ancak eritrositler, bir GSH transport sistemine sahip olmadıklarından bu işi, hücre zarına penetre olabilen NAC/GSH esterleri yapmaktadır.

Tiyol içeren bir antioksidant bileşik olan NAC, ROS olarak adlandırılan 'Reaktif Oksijen Türleri'nin' detoksifikasyonu ve GSH sentezinin devamını sağlayarak eritrositleri oksidatif strese karşı korumaktadır. Sonuçta, hücre içi tiyol düzeylerini arttırarak GSH sentezini devam ettirmektedir. NAC, bu özelliğinden dolayı, miyokardial hasarda, kanser ve benzeri hastalıkların geniş bir çeşidinin tedavisinde gösterdiği yararlı etkilerden dolayı, klinik çalışmalarda oldukça fazla kullanılmaktadır.

1984'ten bu yana yapılan çalışmalarla, NAC'nin kanser ve diğer mutasyonlara bağlı hastalıkları önleme potansiyeline sahip olduğu gözlenmiştir. Karsinogen oluşumları ve DNA zararlarına karşı koruyucu etkilere sahip etkileyici bir mekanizmalar zincirine dahil olan NAC'nin;

- Nükleofilik olması,
- Metabolizmasının antioksidant aktive modülasyonu,
- Mitokondrideki etkileri,
- Karsinogenlerin biyolojik etkilerini azaltışı,
- DNA onarımını sağlaması,

- Genotoksit oluşumunu inhibe etmesi,
- Hücre transformasyonu ve gen ekspresyonlarını düzenlemesi,
- Apoptosis ve anti-inflammatory (iltihap önleyicilik) aktivitesi,
- Kötü huylu tümörlerin gelişimini baskılaması,
- Hücre döngüsünün devamını etkilemesi,
- Ön neoplastik ve neoplastik lezyonların inhibisyonu,
- Metastasis ve istilasının inhibisyonu,
- Kimyasal ajanlar veya diğer kimyasal önleyici ajanların zararlı etkilerine karşı önleyiciliği,

bu maddenin biyolojik önemini ve çalışmamızda kullanılmadaki amacımızı açıklamaya yeterlidir. Hatta NAC'nin, çoğunlukla DNA zararı ve kansere ilişkin durumları ayarlayabilme yeteneğine sahip olduğu ispatlanmıştır.

Çalışmalarımızda, biyolojik açıdan son derece önemli olan bu maddenin, oksidatif strese karşı eritrositleri koruyup koruyamayacağını ve bunu ne derece yapabileceğini ölçerek, olası GSH eksikliklerinde (sentez veya sentezini sağlayan enzimlerin yetersizliğinde) kullanım potansiyelini ortaya çıkarmaya ve azalan GSH konsantrasyonunun tekrar artmasındaki etkisi araştırılmıştır.

Çalışmamız, üç aşamadan oluşmaktadır;

- 1.Aşamada, Eritrositlerdeki GSH transport oranı incelenmiştir.
- 2.Aşamada, Eritrositler içindeki GSH, tümüyle boşaltılarak hücreye NAC verilip eriyebilir -SH grupları gözlenilmiştir (NAC'nin işlevi).
- 3.Aşamada, Eritrositlerdeki GSH boşaltımının ardından, hücrelere BSO, NAC, NEM ve CDNB şeklinde çeşitli kimyasallar katılarak NAC'nin transporttaki rolü gözlenilmiştir.

2- ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

SRIVASTAVA ve BEUTLER, 1969 yılında insan hücrelerinden okside glutatyonun transportunu araştırmışlardır. Normal eritrositlerde, glikoz eksikliğinde inkübasyon ve H_2O_2 difüzyonuna maruz bırakılma sonucu, GSH düzeylerinin düştüğü, GSSG düzeylerinin arttığı gözlenilmiştir. Aynı şekilde ATP düzeylerinde de 4 saatlik inkübasyon sonrası kademeli bir düşüş gözlenilmiştir. Ortama (fosfat-NaCl'lü) glikoz eklendiğindeyse GSH, GSSG ve ATP düzeylerinde değişim olmadığını ve inkübasyon ortamında GSSG'nin sadece küçük miktarlarda bulunduğu gözlenilmiştir. Glikoz / H_2O_2 dışında inkübe edilen normal eritrositlerde ise GSSG içeriğinin önemsiz bir artış gösterdiği belirlenmiştir. Azoesterle yapılan deneylerde GSSG ortamından eritrositlerdeki GSSG ve GSH gibi total glutatyonun, % 70'inin geri alındığı rapor edilmiştir.

SRIVASTAVA ve BEUTLER, GSSG belirlemelerini NEM ile GSH'ın alkilasyonu sonrası enzimatik olarak sağlamışlardır. 1969'da yapılan bu çalışmada aynı zamanda G-6-PD enzim eksikliği gözlenen eritrositler üzerinde de durulmuştur. Bu tip hücrelerin normal hücrelerden daha az yüksek konsantrasyonlarda GSSG içerdiğini ve bu hücrelerin GSSG'i özellikle hızlıca transport ettiğini; glikozun varlığı yada yokluğunda H_2O_2 difüzyonuna maruz bırakıldıklarında GSH düzeylerinin düştüğü ve GSSG içeriğinin arttığı gözlenilmiştir. Bu durumda glikoz ilavesiyle inkübe edilen örneklerde, transport oranının dışa göre daha az olduğu bildirilmiştir. Ancak bu farklılığın istatistiksel önem taşımadığı da eklenmiştir. Aynı çalışmada, sıcaklığın transport oranını arttırdığı, floridinse kısmen inhibe ettiği sonucuna varılmıştır. Tüm transport işlemlerinin linear olduğunu, ortamda ATP olmadığını ileri sürerek GSSG transportunun difüzyondan çok aktif taşımaya daha yakın olduğunu bu nedenle GSSG'nin sadece hücre dışına transport edildiğini belirtmişlerdir (SRIVASTAVA ve BEUTLER, 1969).

TIETZE (1968) tarafından yapılan çalışmada okside ve total glutatyonun nanogram miktarlarının quantatif belirlenmesi için enzimik metotlardan yararlanılmıştır.

Total glutasyon, TPNH, DTNB ve TCA tipi kimyasallar kullanılarak belirlenmiştir (TIETZE, 1968).

LUNN ve ark., 1979'da yaptıkları çalışmalarda, insan eritrositlerinde glutasyon döngüsünün transport nedenlerini açıklamışlardır. ³H- glisin olarak adlandırılan birikmiş glutasyonun, eritrositlerden dışa transport edilen okside glutasyonun oranını belirlemede kullanılacağı sonucuna varmışlardır. Yaptıkları çalışmalarda ilk olarak eritrositlerin, oksidatif strese maruz bırakıldıklarında dışa doğru aktif glutasyon transportu yaptığını ve bu oranın eritrosit glutasyonunun indirgenmesi için yeterli olduğunu bildirmişlerdir. LUNN ve ark. bu transportun tahminen hızlı transportun bazal düzeyini gösterdiğini ve oluşanların da GSSG düzeylerini önemli derecede yükselttiğini belirleyip, bu sistemin oksidatif müdahaleye karşı eritrositler için bir koruma mekanizması oluşturduğu sonucuna varmışlardır (LUNN ve ark., 1979).

BOARD, 1981 yılında insan eritrositlerinden glutasyon S-konjugatlarının transportunu incelemiştir. Board, çalışmasında glutasyon S-konjugatlarının, glutasyon S-transferaz enzimi tarafından katalizlendiğini belirtmiştir. Çalışmaların sonucunda GSH ve GSSG tespitleri, önceki GSH'ın % 70'inin glutasyon S-konjugatlara dönüştüğünü ve hücrelerden transport edildiğini belirlemiştir. Transport edilen konjugat konsantrasyonlarını 9.6 extinksiyon katsayısı ve 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (BOARD, 1981).

AWASTHI ve ark. 1981'de CDNB ile eritrosit glutasyonun enzimatik konjugasyonu üzerinde çalışmışlardır. Çalışmalarında hemoglobinde glutasyon tüketiminin ve eritrositlerde glutasyon konjugatlarının akibetini araştırmışlardır. Ayrıntılı olarak eritrosit üzerindeki çalışmalarında, oluşan konjugatların özellikle eritrositler üzerinde bulunan ve fizyolojik bir role sahip olan γ -glutamil transpeptidaz enziminin merkapturik asit yoluyla ilişkisini ve bir GSH S-transferaz substratı olan CDNB'nin eritrositlerdeki akibetini araştırmışlardır. Eritrositlerin CDNB ile inkübe edildiklerinde konjugat oluşumu yoluyla GSH'ın hızla geri dönüşümsüz olarak tüketildiği sonucuna varmışlardır. Eritrosit GSH'ının % 40 kadarının tüketiminin methemoglobin oluşumunu tetiklediği, CDNB'nin bu olaya doğrudan katkıda

bulunmadığını ve tüketilen GSH'nın % 80'ninden fazlasının GSSG olarak adlandırıldığını rapor etmişler ve eritrositlerden GST tarafından xenobiotiklerin detoksifikasyonunu ve CDNB ile glutatyon konjugatlarının transportunu incelemişlerdir (AWASTHI ve ark., 1981).

ECKERT ve EYER, 1986'te eritrositlerde xenobiotik ve glutatyon S-konjugatlarının oluşumu ve transportunu incelemişlerdir. Özellikle aminofenollerin reaksiyonları üzerinde yaptıkları çalışmalarda DMAP (4-dimetil aminofenol) üzerinde yoğunlaşmışlardır. DMAP'nin yüksek oranlarda in vivo ve in vitro ferrihemoglobin oluşumunu katalizlediğini bu nedenle de bu kimyasalın siyanür zehirlenmeleri tedavisindeki kullanımını belirlemişlerdir. DMAP ile glutatyon S-konjugatlarının oluşumunun eritrositlerde in vitro olarak meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Çalışmalarında GSSG ve GS-DNP'nin ATP bağımlı transportunun belirlemişlerdir (ECKERT ve EYER, 1986).

ANSARİ ve ark. 1987 yılında yaptıkları çalışmada, insan eritrosit glutatyon S-transferazı incelemiş ve bu enzimin kimyasala maruz kalmanın olası bir işareti olduğunu belirtmişlerdir. GST'nin GSH'a elektronik bir merkeze sahip bileşiklerin konjugasyonunu katalizlediğini; non-katalitik bağlar sayesinde dolaşımdan toksik bileşikleri uzaklaştırdığını ve GSH peroksidaz II aktiviteleri aracılığı ile lipit hidroperoksitleri indirgediği sonucuna varmışlardır. Çalışmalarını, in vitro insan eritrositlerinden saflaştırılan anyonik GST tutulmasında acrolein, strene oksit gibi kimyasalların insan eritrosit GST'ı ile karşılıklı etkileşimini inceleyerek, insan eritrositlerinin GST aktivitesinin miktarını, kimyasala maruz bırakılan bileşiklerin ölçümüyle mümkün olabileceği düşüncesiyle sonuçlandırmışlardır (ANSARİ ve ark.,1987).

RUFFMANN ve WENDEL tarafından yapılan çalışmalarda NAC tarafından GSH kurtarımı üzerinde durulmuştur. GSH tüketiminin parasetamol zehirlenmesi gibi riskli bir durum yarattığı, kurtarımının ise tam tersine NAC'nin erken verilmesiyle GSH'nın potansiyel koruyuculuğunu yeniden kazandığı, bu nedenle de hayat kurtarıcı olduğu fikrine varılmıştır. GSH'nın eksikliği ve elektrofilik / oksidatif hasarın AIDS, IPF

ve ARDS tarzı hastalıklara neden olduğu belirtilmiş, deneysel ve erken klinik bilgi ile bu durumların tedavisinin NAC ile düzeltilebileceği sonucuna varılmıştır (RUFFMANN ve WENDEL, 1991).

HERCBERGS ve ark. ise, kanser hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmalarda eritrosit glutatyonunun kemoterapiye tümör cevabını incelemişlerdir. Çalışmalarında tümör GSH konsantrasyonunun kanser kemoterapisine dirençte önemli bir faktör olduğunu bildirmişlerdir. Eritrosit GSH konsantrasyonlarını çeşitli konvensiyonel kemoterapitik rejimlerle muamele öncesi ve sonrası tümörlü hastalarda ölçmüşlerdir. Çalışmalarında GSH ön muameleli GSH konsantrasyonu gösterilen hastaların tümünde düşük veya kemoterapiye kısmi cevap verdikleri belirlenmiş ve eritrosit GSH konsantrasyonu ile ileri sürülen cevap oranının korelasyonunun, bu terapiye verilecek cevabın önceden bilinmesinde yararlı olabileceği fikri öne sürülmüştür. Çalışmalar, eritrosit GSH içeriğinde kanser kemoterapisine cevap verilmediği; kanserli hastalarda tedaviye olumlu cevap verildiğinde eritrosit GSH'ları dolayısıyla da tümör GSH konsantrasyonlarının düştüğü sonucunu ortaya çıkarmıştır (HERCBERGS ve ark.,1992).

LIEBMANN ve ark., sitotoksit taksol antagonisti L- buthionin sulfoksimin tarafından glutatyon tüketimi üzerinde yaptıkları çalışmalarda, glutatyonun, farklı yapıdaki insan tümör hücrelerinde L-BSO ile tüketiminin, taksolun sitotoksit etkilerine olan direncin belirlenmesi ile sonuçlandırmışlardır. GSH tüketiminin, tüm taksol konsantrasyonlarında kalan hücrede önemli düzelmeler meydana getirdiği sonucuna varmışlardır (LIEBMANN ve ark., 1993).

OLIVE ve BOARD, 1994 yılında kültür edilen insan hücrelerinden glutatyon S-konjugat transportunu çalışmışlardır. Çalışmalarında kullandıkları hücreler ve orijinleri tabloda belirtilmiştir.

| Hücre Tipi | Orijin |
|------------|----------------------------------------|
| K 562 | Erytroleukaemia |
| U 937 | Monosit |
| HeLa | Serviks, Deri kanseri |
| Rc2A | Monosit |
| Jurkat | Lemfoma (T-hücresi) |
| HL-60 | Periferel kan, promyelocytic leukaemia |
| S 637 | İdrar kesesi kanseri |
| HepG2 | Karaciğer, Akciğer kanseri |

OLIVE ve BOARD, insan hücrelerinin CDNB ile muamelesi sonucu oluşan bir glutasyon S- konjugatı olan GS-DNP'nin bu hücrelerden transportunu araştırmışlardır. Sonuçta, HepG2 hücrelerinde (hepatomadan türeyen bir karaciğer hücresi) oldukça yüksek oranda transport gözlenmiştir. Bunun karaciğer için hiçte şaşırtıcı olmadığı; çünkü karaciğerin hücrel detoksifikasyonda başrol oynayan bir organ olduğu bir kez daha vurgulanmıştır (OLIVE ve BOARD, 1994).

MAZOR ve ark. (1996) oksidatif strese maruz kalan tiyol bileşiklerine eritrositlerin geçirgenliğini incelemişlerdir. Oksidatif ajanlara maruz bırakılan neonetal ve yetişkin eritrositlerinde hücre içi tiyol düzeylerini araştırmış ve bu hücrelerin her ikisinde de hücre içi tiyol düzeylerinde önemli bir azalış gözlemişlerdir. Neonetal hücrelerin, yetişkinlere oranla BHP (t-bütül hidroperoksit) hasarından daha çok etkilendiğini, yetişkin hücrelerinse diamid etkisine karşı daha hassas olduğunu gözlemlemişlerdir. MAZOR ve ark. yetişkin ve neonetal hücrelerin her ikisinde oksidatif stres sonrası 1 mM NAC ile ön inkübasyonu takiben hücre içi tiyol düzeylerinin önemli bir şekilde arttığını, bu önemli artışın hücre içi redükte rezervuarını NAC muamelesi tarafından düzenlediğini belirtmişlerdir. Okside edici ajanlara maruz bırakılan hücrelerde NAC muamelesinin, hücrede oksidatif stresin neden olduğu tahribatı onardığını göstermişlerdir (MAZOR ve ark., 1996).

ONARAN ve ark. 1998'de glutasyon S-konjugat pompasının oksidatif stresi takiben inhibisyonu ve eritrositlerde glutasyon konjugatlarının transportu üzerinde

çalışmışlardır. CDNB ile muamele edilen eritrositlerde Dnp-SG şeklinde konjugat transportunun 4 saatlik bir periyotta linear olduğunu belirtmişlerdir (ONARAN ve ark., 1998).

ULAKOĞLU, 1998'de strese bağlı mide mukozası hasarında endojen glutatyon tükenişinin enerji metabolizması ile ilişkisini incelemiştir. Çalışmada hareketsizlik yöntemi ile strese maruz bırakılan sıçanların mide mukozalarında GSH düzeylerinin ATP değişimleriyle ne şekilde etkilendiği üzerinde durulmuştur. Stres grubu sıçanlarda mide mukozası GSH ve ATP düzeylerinde, kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak azalmalar kaydedilmiş ve bu azalışlara GPx aktivitelerinde de rastlanmıştır. Tüm bu değişimlerinde dokuda lezyon oluşumlarını desteklediği sonucuna varılmıştır (ULAKOĞLU, 1998).

TAMER (1998) ise, G-6-PD enzim eksikliği gözlenen olgularda, eritrosit zarı $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{Mg}^{++}$ adenozin $5^1 -$ trifosfataz, eritrosit süperoksit dismutaz ve plazma malondialdehit düzeylerini incelemiştir. Çalışmalarında G-6-PD enzim eksikliğinde gözlenen hemolizin kaynağı olarak $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{Mg}^{++}$ ATPaz enzim aktivitesinin azalması ve bunun sonucu olarak ta Na^+ ve K^+ iyonlarının hücre içi ve dışı derişimlerinin değişimine bağlı olabileceği fikrine varılmıştır. Zar lipit çift tabakasında lokalize olan fosfolipitlerin $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{Mg}^{++}$ ATPaz enzim aktivitesi için gerekli olduğu ancak lipit peroksidasyon ürünlerinin zar yapısını bozmasından dolayı $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{Mg}^{++}$ ATPaz enzim sisteminin inhibe olduğu sonucuna varılmıştır (TAMER, 1998).

KEPPLER, 1999 yılında glutatyon S-konjugatları için export pompaları üzerinde çalışmıştır. Hücrelerden bu konjugatların salınmasında MRP familyasına ait integral zar glikoproteinlerince yapılan ATP bağımlı aracı bir işlemin olduğunu belirtmiştir. Oksidatif strese karşı savunma ve detoksifikasyonda MRP familyası üyelerinin fonksiyonlarını ve bu aracı proteinlerin sınırlı oranda GSSG redüktaz varlığında hücrelerden GSSG transport edilmesini sağlayarak oksidatif stresi telafi eden bir mekanizma gibi işlev gördüğü ispatlanmıştır (KEPPLER, 1999).

SIES, 1999'da yaptığı çalışmalarda hücrel fonksiyonlarda glutatyonun rolünü incelemiştir. GSH'ın tiyol redoks durumunu kapsayan tüm biyolojik işlemlerde görev alan bir tripeptit yapısı olduğunu belirtmiştir. Salınımının ana sentez kaynağı olan karaciğerde gerçekleştiğini ve GSSG'nin serbest bırakımında olduğu gibi diğer dokulara kan yoluyla ulaştırıldığını ve bu yolun merkapturik asit biyosentezinde zorunlu bir basamak olan tiyoeterlerin (S-konjugatların) transportu için de kullanıldığını bildirmişlerdir (SIES, 1999).

DURAK ve ark. (2000), hiperoksit sıçan akciğer dokusunda NAC'nin antioksidan özelliğinin histopatolojik ve biyokimyasal incelemesini yapmışlardır. Çalışmaları sonucunda NAC'nin dikkate değer olarak % 100 oksijen varlığında akciğer dokusundaki ödem ve konjesyonu azalttığı, özellikle septal hücrelerde doğal lamellerin görünümünü koruduğu sonucuna varmışlardır (DURAK ve ark., 2000).

STRANGE ve ark. (2000), toksikoloji ve genetikte glutatyon S-transferazın rolü üzerinde yaptıkları incelemelerde GST oluşumlarını ve bu enzimin konjugat transportundaki etkinliğini belirlemişlerdir. GST polimorfizmi ve genetik hastalıklara olan hassasiyeti üzerinde çalışmalar yapmışlardır (STRANGE ve ark., 2000).

KILINÇ, eritrositlerde metabolik defektlere bağlı hemolitik anemiler üzerinde yaptığı çalışmalarda, hegzoz monofosfat şart enzimleri olan G-6-PD, Glutatyon sentetaz, GSSG-R ve GSH-Px enzimlerinin eksikliklerinde meydana gelen defektleri incelemiştir. Özellikle Akdeniz bölgesi, Afrika ve Uzakdoğu'da sıkça görülen G-6-PD eksikliğinin hücre içi GSH düzeylerini düşürdüğü, methemoglobin düzeyini arttırdığı bulgularını doğrulamış, aneminin şiddetinin eritrositlerdeki enzim aktivitesinden ziyade, eritrosit yaşı ile ilgili olduğu fikrine varılmıştır. Enzim yetersizliği durumunda özellikle zenci çocuklarda kurşun konsantrasyonlarında artış olduğu, hipertroidizme, miyelofibrozis, kronik konjenital hemolitik anemi, favizm türü bozuklukların gözleendiği sonucuna varılmıştır (KILINÇ, ÇÜ. Çocuk sağlığı ve hastalıkları ABD. Eğitim faaliyetleri Cilt II, bölüm 14.9.1).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), N-asetil-L-sistein (NAC), L-Büthionin sülfoksimin (BSO) ve N-etilmaleimid (NEM) Sigma Chemical Co. USA, 5,5¹- dithiobis (-nitrobenzoat) (DTNB) ise Fluka Bio Chemica, Switzerland'dan temin edilmiştir.

Spektrofotometrik ölçümler için Shimatzu 1200 spektrofotometre cihazı kullanılmıştır.

Eritrositlerin Hazırlanışı:

Çalışmada, sağlıklı bir vericiden temin edilen heparinize insan kanı kullanılmıştır. Kan, 1500 g'de 5 dakika santrifüj edilerek plazma ayrıştırılmıştır. Üstteki sarı tabaka ve plazma ortamdandan uzaklaştırılmıştır. Elde edilen eritrosit yığını, dört hacimlik fosfat-tuz tamponuyla iki kez yıkanmış (9 kısım 0.15 M NaCl ve 1 kısım 0.1 M potasyum fosfat tamponu) ve deneylerde kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

1. AŞAMA : Eritrositlerde Hücre İçi Serbest –SH Tüketimi

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları şunlardır:

- 1- % 0,9 NaCl (1 lt)
- 2- Potasyum Fosfat tamponu (0,1 M – pH: 7.4)
- 3- Potasyum-fosfat- tuz tamponu (pH: 7.4; 9 kısım %0,9 NaCl-1 kısım 0,1 M Potasyum-fosfat-tuz tamponu)
- 4- 2mM, CDNB içeren 100ml Potasyum-fosfat-tuz tamponu

- 5- 2 mM, CDNB ve 10 mM NAC içeren 10 ml Potasyum-fosfat-tuz tamponu
- 6- 8 mM glikoz içeren 100 ml Potasyum-fosfat-tuz tamponu
- 7- 8 mM glikoz ve 25 mM NaF içeren 100 ml'lik Potasyum-fosfat-tuz tamponu

2. AŞAMA:

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları şunlardır:

- 1- 2 ml, 0,5 mM NEM içeren Potasyum-fosfat-tuz tamponu
- 2- 2 ml, 1 mM NEM içeren Potasyum-fosfat-tuz tamponu
- 3- 2 ml, 3 mM NEM içeren Potasyum-fosfat-tuz tamponu
- 4- 0,01 M sodyum fosfat / 0,005 M EDTA, (pH: 8) tamponunda hazırlanmış %10 TCA

3. AŞAMA:

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları şunlardır:

- 1- 2 ml, 0,6 $\mu\text{mol/ml}$ DTNB
- 2-25 mM BSO
- 3-4 ml,0,01M NaH_2PO_4 + 0,005 M EDTA tamponu (pH: 7.5)
- 5-0,01 M, 10 ml NAC
- 6-5 mM, 35 μl BSO
- 7-25 mM 35 μl BSO
- 8-10 mM,365 μl NAC
- 9-8 mM glikoz içeren Potasyum-fosfat-tuz tamponu

3.2. Yöntem

3.2.1. Serbest-SH Konsantrasyonunun Ölçülmesi

CDNB, NAC + CDNB ve kontrol hücreleri inkübe edildikten sonra, eritrositler tamponla yıkanmıştır. Yıkanan eritrositler, 0.01 M sodyum fosfat ve 0.005 M EDTA tamponunda (pH: 7.5) hemolize edilmiştir. Hemolizattan 25 µl alınarak karışıma eklenmiştir. Daha sonra ölçümler, spektrofotometrede 412 nm'de yapılmış ve serbest-SH konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.2.2. NAC Varlığında Transportun Nasıl Etkilendiğinin Gösterilmesi

Çalışmanın bu aşamasında eritrositler, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) yanı sıra NAC ile de muamele edilmiştir. Bu esnada daha sonraki transport çalışmaları için sürdürülen 4 saatlik inkübasyon periyodunda ortama NAC eklenmiş ve transport oranındaki olası değişimler gözlenmiştir.

3.2.3. NAC'nin CDNB İle Konjugat Oluşturup Transport Edilip Edilmediğinin Gösterilmesi

Deneylerin bu aşamasında NAC'nin CDNB ile konjugat oluşturup transport edilip edilmediği araştırılmıştır. Bunun için eritrositlerdeki GSH, NEM kullanılarak boşaltılmıştır. NEM ile GSH boşaltımı sırasında eritrositler NAC ile yüklenmiştir. GSH boşaltımından sonra eritrositleri serbest radikallerin etkilerinden korumak için ortama katalaz ve SOD enzimleri eklenmiştir. Daha sonra yine 4 saat boyunca eritrositler, 37 °C

de inkübe edilmiş ve konjugat transportunun 340 nm'deki absorbans değişimleriyle tespit edilmiştir.

1. AŞAMA :

Çözeltilerin Hazırlanışı:

1- % 0,9 NaCl (500 ml için) :

4,5 g. NaCl 500 ml distile su içerisinde çözünmüştür.

2- 0,1 M , pH: 7.4 Potasyum-fosfat Tamponu: (1 lt. için)

K_2HPO_4 : Potasyum monofosfat ; moleküler ağırlığı: 266g/mol

KH_2PO_4 : Potasyum dihidrojen fosfat ; molekül ağırlığı : 136g/mol

$$M: n / V$$

formülü uygulanarak;

$$0,1M: n / 1 \text{ lt} : 0,1 \text{ mol (her iki kimyasal için kullanılacak mol sayısı)}$$

$$n: m / m_A$$

formülü uygulanarak her iki kimyasal için hazırlanacak miktar belirlenmiştir.

K_2HPO_4 için 1 lt için m_A : 26,6g/mol; 500 ml için m_A : 13,3 g/mol

KH_2PO_4 için 1 lt için m_A : 13,6g/mol 500 ml için m_A : 6,8 g/mol

Her iki kimyasal, 500'er ml distile su içinde ayrı ayrı çözülerek birbirine karıştırılmış ve pH: 7.4 olmak üzere tampon çözelti hazırlanmıştır.

3-Potasyum-fosfat- tuz Tamponu:

9 kısım NaCl +1 kısım Potasyum-fosfat tuz tamponu

400 ml için,

360 ml NaCl + 40 ml Potasyum-fosfat-tuz tamponu (Srivastava ve Beutler, 1968)

4- 2 mM CDN B + Potasyum-fosfat tuz tamponu: (100 ml)

2 mM CDN B; $2 \cdot 10^{-3}$ M

$M : n / V$

formülünden,

$n : 2 \cdot 10^{-4}$ mol

$n : m / m_A$ CDN B $m_A : 202.6$ g/mol.

formülünden,

$m : 0.0405$ g (100 ml için) bulunmuştur.

100 ml Potasyum-fosfat-tuz tamponu içinde 0.0405 g CDN B çözülmüştür.

5- 2 mM CDN B + 10 mM NAC + Potasyum-fosfat-tuz Tamponu: (10 ml)

10 mM NAC : 0,01 M NAC

$M: n / V$

formülünden,

$n: 0,0001$ mol

$n : m / m_A$ NAC $m_A: 163,2$ g/mol.

formülünden,

$m: 0,01632$ g.

Daha önce hazırlanan 100 ml'lik 2 mM CDNB + Potasyum-fosfat-tuz tamponu çözeltisinden 10 ml alınır. Bu çözelti içine 0,01632 g. NAC katılmıştır. Karışımın pH'ı ölçülmüş ve pH: 7.4'te sabitlenmiştir.

6- 8 mM Glikoz + Potasyum-fosfat tuz Tamponu: (100 ml)

8 mM glikoz : $8 \cdot 10^{-3}$ M

$M : n / V$

formülünden,

$n : 8 \cdot 10^{-4}$ mol

$n : m / m_A$ Glikoz $m_A : 198$ g / mol

formülünden,

$m : 0.144$ g

100 ml'lik Potasyum-fosfat tuz tamponu içinde 0.144 g glikoz çözülmüştür.

7 - 8 mM Glikoz + 25 mM NaF +Potasyum-fosfat-tuz Tamponu: (100ml)

25 mM NaF :0.025 M

$M : n / V$

formülünden,

$n : 0.0025$ mol

$n : m / m_A$ NaF $m_A : 42$ g/mol

$m : 0.105$ g

100 ml'lik 8 Mm glikoz + Potasyum-fosfat tuz içinde 0.105 g NaF çözülmüştür.

Bu çalışmanın amacı eritrositlerdeki GSH transport oranını bu transport işlemine etki eden çeşitli kimyasalların katılımıyla gözlemlemektir.

Sağlıklı insanlardan alınan heparinli kan örnekleri (yaklaşık 10 cc) aşağıdaki işlemlere tabi tutulmuştur;

Eritrositler, 0.1, 0.5 ve 1 mM NEM içeren Potasyum-fosfat-tuz tamponlu glikozda 30 dakika boyunca 37 °C'de inkübasyona tabi tutulmuşlardır. İnkübasyon sonunda eritrositler, santrifüj edilip yıkanmışlardır. Yıkanan eritrositlerdeki serbest-SH grupları, SEDLAK ve LINDSAY (1968) tarafından önceden belirtildiği gibi belirlenmiştir. Kısaca 100 µl NEM ile muamele edilip yıkanan eritrositler, sodyum fosfat-EDTA tamponunda (0.01 M sodyum fosfat/ 0.005 M EDTA, pH: 8.0) hazırlanan %10 TCA'da ortadan kaldırılmışlardır. Ortadan kaldırılan eritrositler daha sonra 12.000 g'de 5 dakika santrifüje tabi tutulmuşlardır. Santrifügasyon sonrası oluşan süpernatant sodyum fosfat-EDTA tamponunda hazırlanan 2 ml 0.6 µmol/ml DTNB ile karıştırılmıştır. Örnekler, 5 dakika renk değişimi için bırakılmıştır. Örneklerin absorbansı, 415 nm'de ölçülmüş ve serbest-SH konsantrasyonları 13.6 ekstinksiyon katsayısı (mM) kullanılarak ölçülmüştür. Aynı prosedür CDNB ile muamele edilen serbest-SH'ın ölçümünde de kullanılmıştır.

2.AŞAMA :

NEM Hazırlanışı:

- 1- 2 ml, 0.1 mM NEM içeren Potasyum-Fosfat-Tuz tamponu
- 2- 2 ml, 0.5 mM NEM içeren Potasyum-Fosfat-Tuz tamponu
- 3- 2 ml, 1 mM NEM içeren Potasyum-Fosfat-Tuz tamponu

Bu aşamanın amacı, eriyebilir –SH gruplarını ölçmektir. Eriyebilir –SH gruplarının çoğunluğu, GSH ile denk olacağından dolayı bu yolla GSH düzeyi de ölçülmüştür.

Çalışmanın bu aşamasında önemli bir –SH reaktifi olan NEM (N-etilmaleimide) kullanılmıştır (Srivastava ve Beutler, 1969). NEM yapısı gereği eritrositlerden GSH'ı boşaltıcı bir etkiye sahip olduğundan deneyin bu aşamasında oldukça büyük bir öneme sahiptir. NEM 0.1 mM, 0.5 mM ve 1 mM olmak üzere üç ayrı konsantrasyonda deneyerek en iyi GSH çıkışını sağlayan konsantrasyon oranı tespit edilmiştir. Yine bu aşamada, kullanılmaya başlanılan bir diğer kimyasal olan BSO (Bütionil sülfoksimin), GSH sentez döngüsündeki ilk enzim olan γ -glutamil sistein sentetazı inhibe etmektedir.

Çalışmada öncelikle eritrositlerde bulunan GSH, NEM ile boşaltıldıktan sonra, hücreler, GSH'ın yeniden oluşumunu önleyen BSO ile muamele edilmiştir. Bu işlemdeki amaç, hücre içindeki GSH'ı tümünden ortadan kaldırarak, ortama eklenecek NAC'nin işlevini gözlemlemektir. Bu aşamada amaç, GSH'ı ortadan kaldırılan ve sentezi inhibe edilen eritrositlerde, NAC'nin kullanılıp kullanılmayacağı ; dolayısıyla da oksidatif stres sonucu hücrelerde oluşan hasarın onarılıp onarılmayacağını ölçmektir. NAC muamelesi öncesi GSH kaybı, NAC'nin hücre içindeki GSH'ı hızla indüklemesini önlemek içindir. Çünkü NAC, hücre içerisine serbestçe girerek sisteinin hücre içi konsantrasyonunu arttırmaktadır ve GSH sentezini sağlamaktadır. Bu nedenle, hücre ortamında GSH'ın hiç bulunmaması gerekmektedir.

Serbest –SH Ölçümü:

Yaklaşık 10 cc olarak alınan heparinli kan örnekleri, 1500 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst kısımda biriken süpernatant atılmış ve eritrositler iki kez 4 hacim Potasyum-fosfat-tuz tamponu ile yıkanmış ve tekrar santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Her tüp içinden 100 µl kan alınıp ependorf tüplerine aktarılmıştır. Tüpler üzerine, fosfat EDTA tamponunda hazırlanan % 10'luk TCA eklenmiştir. TCA, asidik yapısı nedeniyle hücre protein yapısını bozduğundan, geriye sadece eriyebilir –SH grupları kalacaktır. Karışım 12.000 g'de 5 dakika boyunca mikro santrifüjde santrifüj edilmiştir. İşlem sonrası her tüpten 100 µl süpernatant alınıp sodyum fosfat-EDTA tamponunda hazırlanmış 2 ml'lik 0,6 µmol / ml DTNB-fosfat tamponuna eklenmiştir (Kör olarak numunesiz DTNB-fosfat tamponu kullanılmıştır). Tüpler, 415 nm'de spektrofotometrede okunmuştur. Elde edilen veriler, eritrositler içindeki serbest –SH oranını vermektedir.

NEM Deneyi:

1 mM NEM + 25 mM BSO

30 dakika inkübasyon evresi

a- Kontrol

b- NEM

c- NEM

4 saatlik inkübasyon evresi

Kontrol

NAC (10 µl)

d- BSO + NEM
e- NEM

NAC + BSO
BSO

Tüplere 30 dakikalık evrede, üstteki maddeler katılmış ve 30 dakika inkübe edilmiştir. b-c ve e tüplerinde NEM ile hücre içlerindeki GSH'lar boşaltılmıştır. d-tüpünde ortama BSO'da eklenerek boşalan GSH'ın yerine yenisinin yapımı önlenmiştir. 30 dakikalık inkübasyon sonunda, süpernatant atılıp toplam hacim 400 ml olacak şekilde 4 saatlik evre elemanları katılmıştır.

Tüpler 4 saatlik evrede aşağıdaki işlemlere tabi tutulmuştur:

- b- tüpüne başka bir madde eklenmemiştir. Böylece eritrositlerden ne kadar GSH boşaltıldığı ölçülmüş olacaktır.
- c- tüpüne NAC katılmıştır ve eritrositlerde yeniden GSH oluşumu sağlanmaya çalışılmıştır (Gözlemlenmek istenen, GSH'ın 4 saatlik inkübasyon sonrası yeniden oluşup oluşmadığıdır).
- d- tüpüne NAC'nin yanı sıra BSO da eklenip, NAC'nin varlığında BSO'nun işlevi ölçülmüştür.
- e-tüpüne ise sadece BSO eklenerek boşalan GSH'ların yerine yenilerinin yapımı tamamen önlenmiştir.

3.AŞAMA :

1-0.005 M/ ml EDTA + 0,01 M /ml NaH₂PO₄

EDTA için; 0,005 M / ml EDTA :0,005 mol

EDTA m_A : 370 g/mol

m : 1.85 g

NaH₂PO₄ için; 0,01 M /ml NaH₂PO₄ : 0,01 mol

NaH₂PO₄ m_A: 138 g/mol

m : 1.38 g

1.85 g

A-B-C-D tüplerine (Kontrol tüpleri) 400'er µl Glikoz fosfat tuz + 100 µl kan, E tüpüne ise 25 mM BSO + Glikoz fosfat tuz (365 µl Glikoz-fosfat-tuz + 35 µl BSO) + 100 µl kan eklendi. Tüpler 2 saat boyunca 37 °C'de inkübe edildiler. İnkübasyon sonrası tüpler 1500 g'de 5 dakika santrifüj edildiler.

A ve B tüpleri yine kontrol olarak kalırken, C ve D tüpüne 1 mM NEM, E tüpüne ise 1 mM NEM + 5 mM BSO (365 µl NEM + 35 µl BSO) eklenerek GSH uzaklaştırılması sağlanıp ve tüpler 30 dakika 37 °C'de inkübasyona tabi tutulmuştur.

İnkübasyon sonrası GSH'ı boşaltılan hücrelerin NAC ile doldurulması için, A, B ve C tüplerine kontrol, D tüpüne 10 mM NAC, E tüpüne ise 10 mM NAC (365 µl) ve 5 mM BSO (35 µl) eklenip tüm tüplerin hacimleri 400 µl'e tamamlanmıştır. NAC'nin GSH sentezini arttırdığı, E tüpündeysen BSO varlığı nedeniyle GSH sentezinin olmadığı işlem sonrası gözlenmiştir.

Son olarak A tüpü yine kontrol olarak ancak glikozsuz Potasyum-fosfat-tuz tamponu ile, B, C ve D tüplerine 2 mM CDNB, E tüpüne 2 mM CDNB (365 µl) + 5 mM BSO (35 µl) eklenmiş ve hacim 400 µl'e tamamlanmıştır. Tüm tüpler 20 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüpler, 1500 g'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Üzerlerine 400 µl (toplam hacim 500 µl olacaktır) glikoz + Potasyum-fosfat-tuz tamponu eklenip 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüpler içinde olası kalabilecek CDNB kalıntılarını uzaklaştırmak için tüm tüpler 1500 g'de yeniden santrifüj edilmiştir. Oluşan süpernatanttan 100 µl alınıp içlerinde 2 ml'lik Potasyum-fosfat-tuz-Glikoz olan tüplere konulmuş ve 340nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır.

Eritrositler yıkanıp 2 mM CDNB ile muamele edilmiştir. Eritrositler, 10 mM NAC varlığında ve yokluğunda 20 dakika inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrası her grubun serbest -SH'ı ölçülmüştür. Eritrositlere 2 mM CDNB eklendiğinde serbest SH'ın tüketildiği gözlenmiştir. Buna rağmen eritrositlerin 10 mM NAC + 2 mM CDNB ile muamelesi sonucunda serbest -SH oranının eritrositler içinde korunduğu gözlenmiştir.

3.2.4. İstatistiksel Analizler

Çalışmamızda Student-Newman-Keuls Multiple Comparison ve tek yönlü değişim analizi kullanılmıştır. Testler, istatistiksel bilgi yöntemine dayalı olarak yürütülmüştür. Tüm testler, üçer örnekle uygulanmıştır. Sonuçlar, ortalama \pm S.D. $p < 0.05$ değerleri olarak ifade edilmiş ve anlamlı olabileceği düşünölmüştür.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Şekil-4.1'de, 2 mM CDNB ile muamele edilen eritrositlerin düzeyleri belirlenemeyen hücre içi serbest-SH içeriğinin boşaltılışı gösterilmektedir. Bununla birlikte CDNB ile inkübasyon ortamında NAC'nin varlığı hücre içi serbest-SH'ın tüketimine karşı koruyucu etki oluşturmaktadır.

CDNB muameleli eritrositlerde 10 mM NAC ile 2.9 ± 0.5 $\mu\text{mol/ml}$ eritrositte ve 5 mM NAC ile 1 ± 0.2 $\mu\text{mol/ml}$ eritrositte hücre içi serbest-SH içeriği değişmektedir. Kontrol düzeyi 5.7 ± 0.5 $\mu\text{mol/ml}$ eritrosittir. CDNB, hücre içi -SH'ı boşaltmaktadır. Ancak NAC varlığında, hücre içi -SH belirli bir miktar korunmaktadır.

GSH havuzu tüketiminde ortaya çıkan konsantrasyon 30 dakika farklı NEM konsantrasyonlarıyla eritrositlerin inkübasyonu ile sağlandı ki sistemimizde serbest-SH'ların tümü boşaltılmıştır (Şekil-4.2). NEM'in en etkin konsantrasyonu 1 mM olarak tespit edilmiştir. Bu konsantrasyonda serbest-SH içeriğinin fark edilemez düzeye geldiği gözlenmiştir. Serbest-SH düzeyleri, 0.1 mM NEM ile 3.6 ± 0.3 $\mu\text{mol/ml}$ eritrositte ve 0.5 mM NEM ile 0.3 ± 0.05 $\mu\text{mol/ml}$ eritrositte değişmiştir.

Deneyler sırasında, NEM tarafından boşaltılan eritrosit içi serbest-SH'ın yeniden oluştuğunu saptadık. Şekil-4.3'te görüldüğü gibi, NAC varlığında eritrosit içi serbest-SH içeriği yukarıdaki gibi yüksek bir düzeye ulaşmıştır. 10-60 ve 240 dakikada serbest-SH artışı, yaklaşık olarak 14.3 ± 1 , 28.5 ± 3.2 ve 26.9 ± 1.0 $\mu\text{mol/ml}$ eritrosit olarak bulunmuştur.

Diğer basamakta, bu serbest-SH havuzunun Dnp-SG transportuyla yeniden temin edilip edilmediğini ve CDNB'nin detoksifikasyonunda GSH yerini alıp almadığını inceledik. Çalışmamızda NEM kullanarak GSH'ı boşalttık, BSO varlığı yada yokluğunda NAC tarafından eritrositlerde serbest-SH'ı yeniden elde ettik, CDNB ile muamele ettik ve daha sonra transport aktivitesini ölçtük. Şekil-4.4, NAC'nin eritrositlerde CDNB detoksifikasyonunda GSH'ın yerini aldığını ve Dnp-SG transportunu yenilediğini ifade etmektedir. NAC yokluğunda, NEM + CDNB muameleli eritrositler (C-grubu), 214.6 ± 21.5 nmol/ml eritrosit transport aktivitesi göstermektedirler ki bu oran kontrol değerine eşittir. (235.6 ± 50 nmol/ml eritrosit) NAC ile muamele edilen eritrositler, NEM'e maruz bırakıldıklarında (D-grubu)

transport aktivitesi önemli bir şekilde telafi edilmiştir (449 ± 38 nmol/ml eritrosit). Bu tekrar kazanım, GSH sentezinden dolayı olabilmektedir. Bununla birlikte BSO varlığında (E-grubu) transport aktivitesinde de yeniden kazanım kaydedilmiştir (544.0 ± 174.6 nmol/ml eritrosit). Sadece CDNB ile muamele edilen (B-grubu) eritrositler, 624.6 ± 29.9 nmol/ml eritrosit transport aktivitesi ile gösterilmiştir.

Sonuçlarımız, NAC'nin, CDNB tarafından serbest-SH tüketiminden eritrositleri koruduğunu göstermiştir. CDNB, bir elektrofilik bileşiktir ve eritrositler içine giren GST tarafından GSH ile konjuge edilirler. Bu konjugasyon reaksiyonu, özellikle hücre içi önemli antioksidandı, GSH'ı boşaltarak, hücreleri toksik veya oksidatif tahribata karşı daha savunmasız hale getirmektedir. Bu nedenle NAC, CDNB tarafından GSH tüketiminin zararlı etkilerini hafifletmede kullanılabilir. CDNB'nin, bağışıklık sisteminin uyarılmasına neden olduğu bilinmekte ve buna istinaden de kimi araştırmacılar tarafından AIDS tedavisinde kullanıldığı TRAUB ve arkadaşları tarafından (1997) rapor edilmiştir. Bu anlamda, deneysel sistemde, CDNB'nin NAC ile ortak verilmesi, CDNB'nin toksik strese karşı koruyuculuk sağlamasıyla pozitif sonuçlar vermektedir. Sonuçlarımız, NEM tarafından tüketilen serbest-SH içeriğinin, NAC tarafından yeniden oluşturulduğunu göstermektedir.

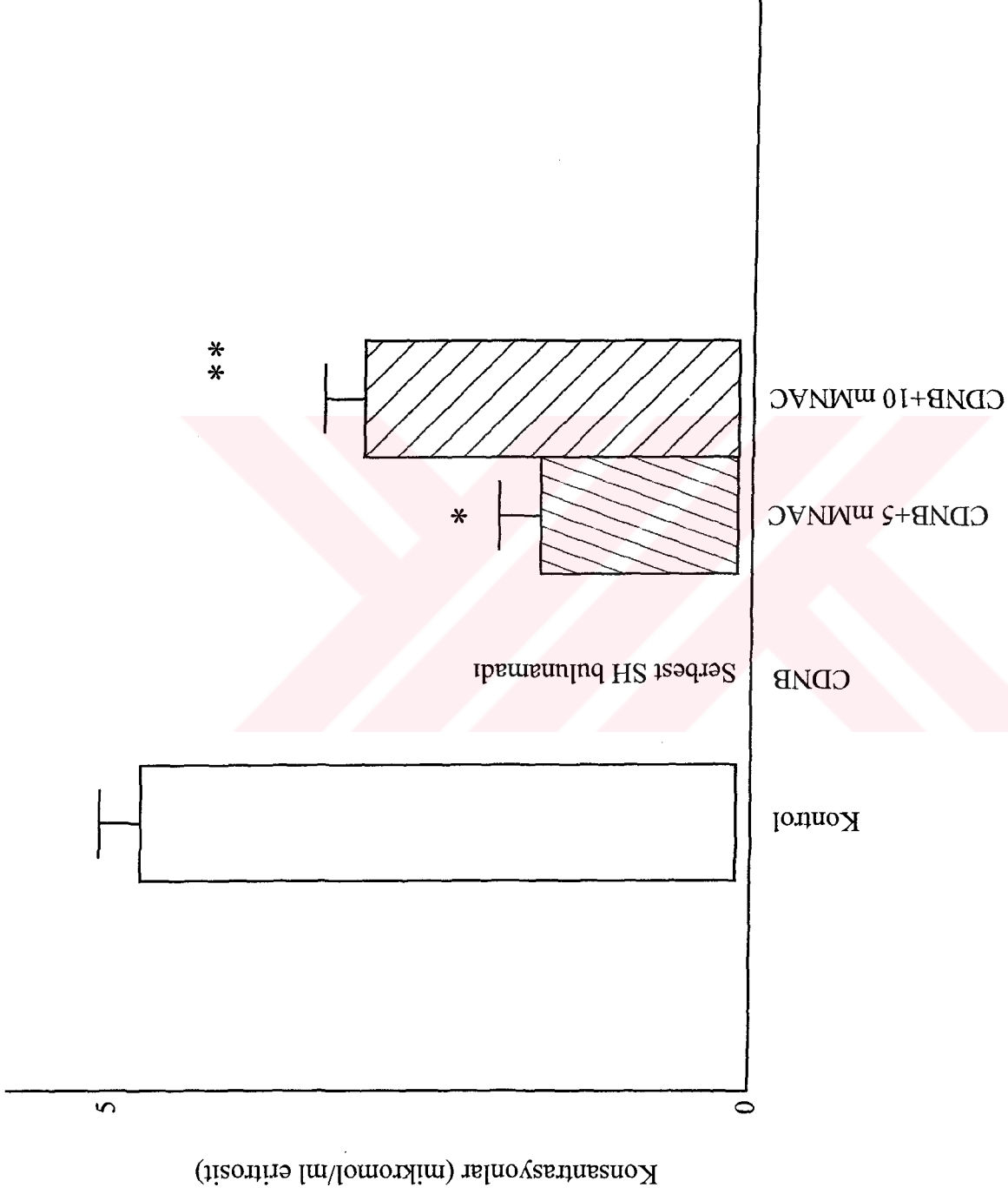
Şekil-4.3'te görüldüğü gibi, yeniden oluşum oldukça verimlidir ve konsantrasyonlar 10 dakikada 2 katına çıkmıştır. Elde edilen veriler, eritrositler içine NAC alımının 40 dakikada dengeye ulaştığını göstermektedir. Ayrıca NAC'nin serbest-SH düzeyi artışına daha fazla maruz kalma süresini kısalttığı gözlenmiştir.

Diğer basamakta ise Dnp-SG transportunu eski durumuna getiren NAC tarafından, bu serbest-SH havuzunun yeniden oluşturulup oluşturulmadığını ve eritrositlerden CDNB'nin uzaklaşmasında GSH'ın yerini alıp almayacağını araştırdık. Ortaya çıkan ve Şekil-4.4'te gösterilen sonuçlara göre, NAC, eritrositlerden CDNB akışında GSH'ın yerini almakta ve Dnp-SG transportunun tekrar başlamasına neden olmaktadır.

NAC'nin yokluğunda, NEM + CDNB muameleli eritrositler, kontrol ile eşit transport aktivitesi göstermektedir. Bu da eritrositlerden CDNB'nin dışarı çıkmadığını yada yayılmadığını göstermektedir. NAC'nin varlığında ise CDNB'nin ortamdan uzaklaştırıldığı gözlenmiştir. NEM'e maruz kalmaya takiben NAC ile muamele edilen eritrositlerde, anlamlı bir transport aktivitesi kaydedilmiştir. Bu geri alım, GSH

sentezinden dolayı olabilmektedir. Bununla birlikte, BSO varlığında da transport aktivitesinde geri alım kaydedilmiştir. Bu gruptaki eritrositler daha sonra BSO ile ön muameleye tabi tutulmuşlar ve takip eden basamaklarda BSO'a maruz bırakılmışlardır. GSH sentezinin, öncelikle CDNB detoksifikasyonunun oluşumu sayesinde telafi edildiği ve daha sonra eritrositlerden GSH ile konjugasyonu ve transportu saptanamamıştır. BSO, GSH sentezinin gerçek bir inhibitörü olarak birçok deneysel sistemde gösterilmiştir ve zehirlemeden yüksek konsantrasyonlarda kullanılabilir (HERCBERGS,1992; LIEBMANN,1993; GRIFFITH, 1999). Bir diğer olasılık ise 30 dakikalık NEM muamelesini izleyen NEM ile GSH formlarının gösterilmesidir. Bu ifadeler, daha sonra NAC-NEM ifadeleri formuna NAC'nin yüksek konsantrasyonlarının varlığında yeniden ayarlanmış ve GSSG yeniden oluşturulmuş olabilir. Yeniden oluşan GSSG, GSH'a indirgenmiştir ve daha sonra CDNB ile konjuge edilerek eritrositler dışına transport edilmiş olabilir.

FLORA ve ark. (1985) tarafından NAC'nin, GSSG redüktazı uyarıcı özelliğe sahip olduğu belirtilmiştir. NAC'nin varlığında, GSSG'nin hızlı bir şekilde GSH'a dönüşümü beklenmektedir. Sonuçlarımız, NAC'nin, BSO varlığı ve yokluğunda, CDNB'nin dışa akışını yeniden sağladığını göstermektedir. Eritrositler, düşük moleküler hacme sahip eriyebilir-SH içeren bileşiklere bir dereceye kadar kullanarak bağımsız bir acil detoksifikasyon mekanizmasına sahip olabilirler. NAC, CDNB ile doğrudan reaksiyona girebileceği, diğer araştırmacılar tarafından sunulan kanıtları desteklemektedir.

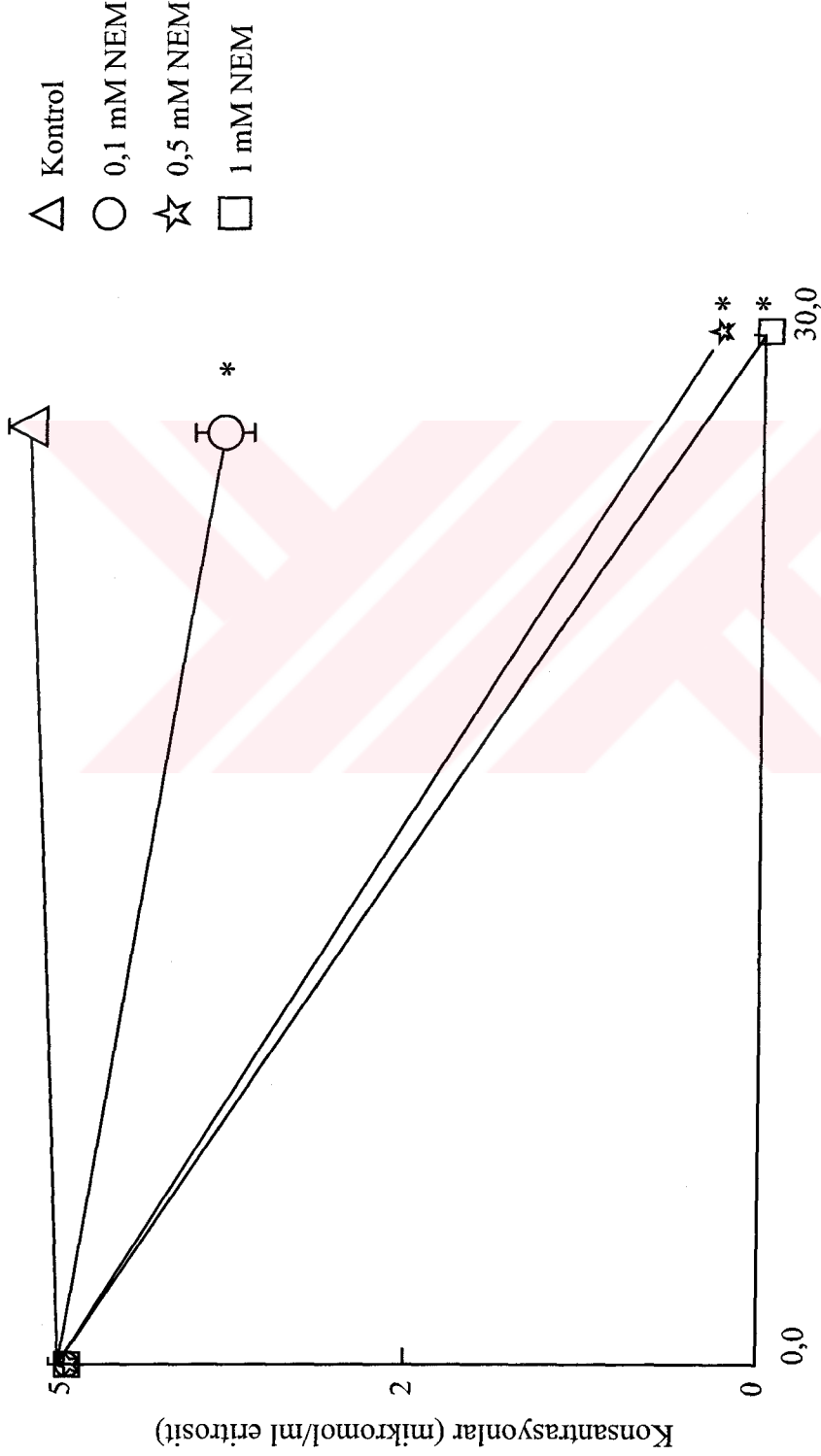


Şekil 4.1 : CDNB tarafından serbest SH tüketiminde NAC'ın etkisi. Yıkanan eritrositler, potasyum-fosfat-tuz tamponunda 5 ve 10 mM CDNB ile muamele edildiler. 20 dk. sonunda eritrositlerdeki SH içeriği ölçüldü üç farklı deneyin aritmetik ortalaması ve standart saptaması alındı.

* kontrolden farklı değer

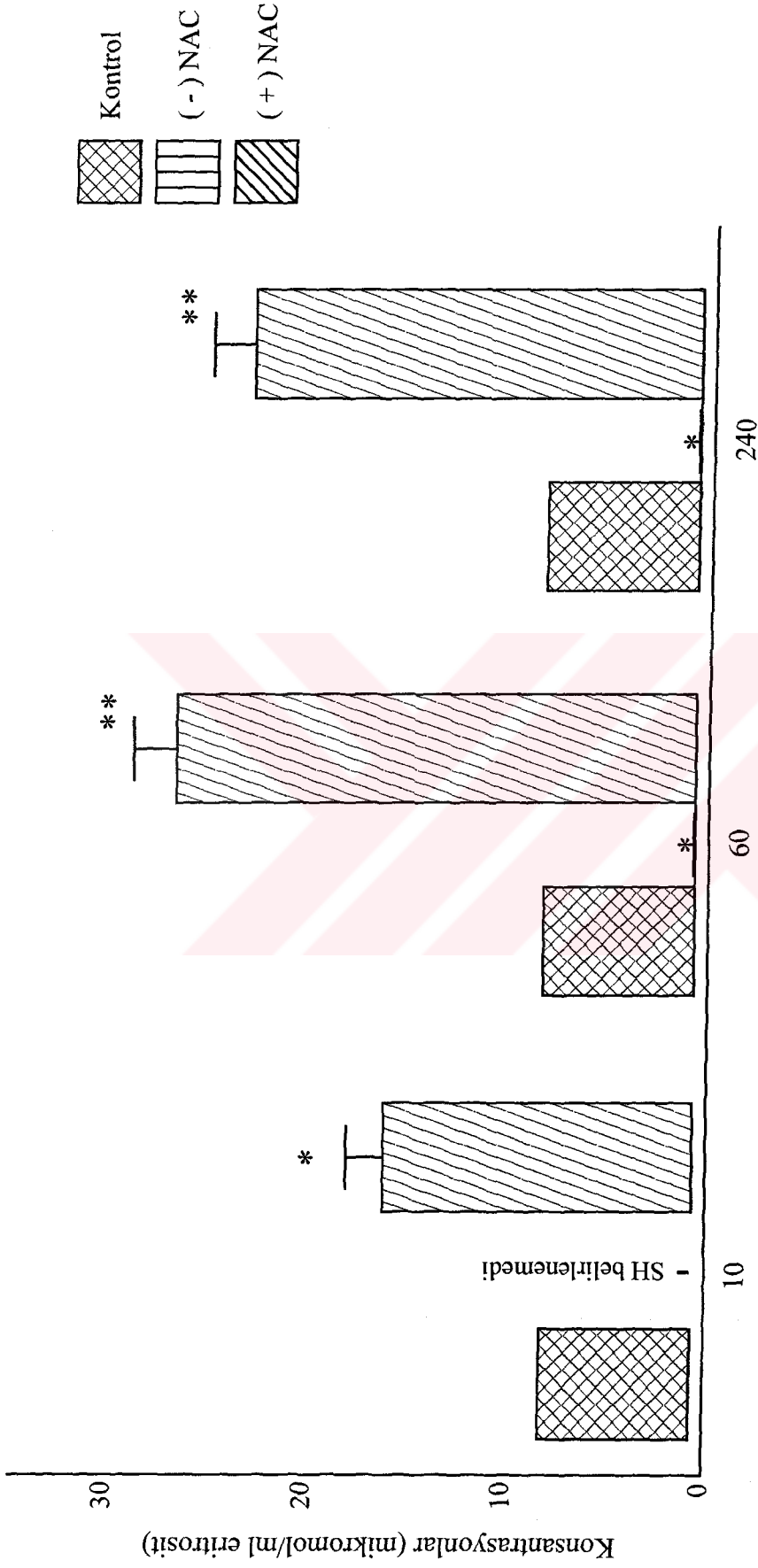
** CDNB+5mM NAC grubundan farklı değer

P<0.05



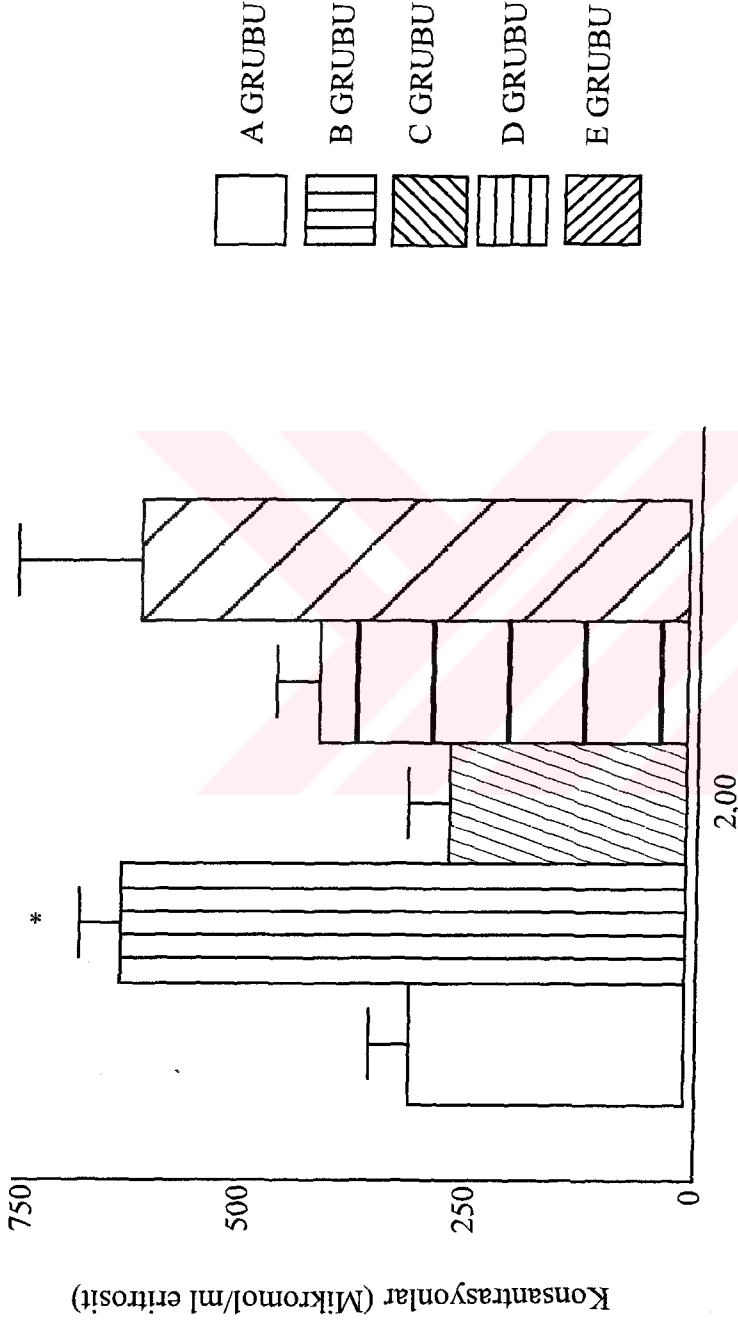
Şekil 4.2 : NEM tarafından serbest SH tüketimi. Yıkanan eritrositler 30 dakika boyunca 37° de potasyum-fosfat-tuz tamponu glikozda NEM'in belirtilen konsantrasyonları ile muamele edildiler. 30 dakika sonunda eritrositlerdeki serbest SH içeriği ölçüldü. 3 farklı deneyin aritmetik ortalama ve standart saptaması alındı.
* kontrolden farklı değer

P<0.05



Şekil 4.3 : NAC tarafından serbest -SH'in yenilenmesi. Kontrol eritrositler muamele edilmediler. (-) NAC grubu NEM ile muameleyi takiben NAC katılmamış gruptur. (+) NAC grubu NEM muamelesini takiben 10 mM NAC ile muamele edilmiştir. 3 farklı deneyin aritmetik Ortalama ve standart saptama alınmıştır.

* kontrol grubundan farklı değer
 ** (-) NAC grubundan farklı değer
 P < 0,05



Şekil - 4.4 : NAC tarafından GSH'ı önceden tüketilen eritrositlerde CDNB detoksifikasyon'unun düzeltilmesi. Kontrol (A grubu) sadece CDNB ile muamele edilen Grup B ve grup C'nin GSH'ı CDNB öncesi NEM ile ön muameleyle tabii tutularak boşaltılmıştır. Grup D'nin GSH'ı NEM ile ön muamele sonucu boşaltıldıktan sonra CDNB muamelesi öncesi NAC'nin varlığında inkübe edilmiştir. Grup E'nin GSH'ı, NEM ile ön muamele sonucu boşaltılmış ve daha sonra CDNB muamelesi öncesi BSO+NAC'nin varlığında inkübe edilmiştir. (Detaylar için materyal ve yöntemlere bakınız.) 3 farklı deneyin aritmetik ortalama ve standart sapması alınmıştır.

* A ve C gruplarından farklı değerler
P<0,05

5-SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmalarımızın genel amaçları arasında GSH'ın eritrosit metabolizması üzerinde öneminin belirtilmesi bulunmaktadır. Üç aminoasitten oluşan ve reaktif bir -SH grubuna sahip olan GSH, hücre içerisinde reaktif xenobiotiklerle birleşerek glutasyon konjugatlarını oluşturmaktadır. Meydana gelen bu konjugatlar ise eritrositlerden uzaklaştırılmakta ve karaciğerde metabolize edilmektedir. Hücreler böylece oksijenin yaratacağı bir oksidatif zarardan korunmaktadırlar.

Canlı yaşamı için son derece önemli olan bu olayda biz, GSH gibi yapısında reaktif bir -SH grubuna sahip olan NAC'nin etkinliğini ölçmeye çalıştık. Daha önce biyolojik önemine değindiğimiz ve çalışmada kullanılmakta olan amacımızı açıkladığımız NAC'nin, deneylerimiz sonunda, oksidatif strese karşı eritrositleri koruduğu ve azalan GSH konsantrasyonunun tekrar artmasında (hücre içi -SH gruplarının oluşumundaki etkisiyle) etkin olduğu sonucuna ulaştık.

NAC'nin, diğer biyolojik aktiviteler üzerindeki öneminin, olası GSH eksikliklerinde de devam edebileceği düşüncesi çalışmalarımıza ışık tutmuştur. Bu çalışmamızın bir diğer önemi de, NAC'nin detoksifikasyon mekanizmasında xenobiotiklere karşı eritrositleri koruduğunun ortaya çıkarılmasıdır.

Çalışmalarımızın, NAC'nin eritrositlerde uygulama alanlarına daha geniş ölçüde ışık tutacağına inanmaktayız.

KAYNAKLAR

- 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. **Toxicology Letter**, 37 (1987) 57-62
- ATALAY ,Ö.; BOLAYIR, E.; BAKIR, S.; ATALAY, A.; 2001. Demanslı Hastalara Ait Plazma Bakır Düzeltmeleri ve Eritrositlerde Antioksidan Enzim Aktiviteleri. **DEU Tıp Fakültesi Dergisi**, Aralık 2001
- AWASTHI, Y.C.; GARG, H.S.; DAO, D.D.; PARTRIDGE, C.A.; SRIVASTAVA, S.K.; 1981. Enzymatic Conjugation of Erythrocyte Glutathione with 1-Chloro-2.4- dinitrobenzene : The fate of glutathione conjugate in erythrocytes and the effect of glutathione depletion on hemoglobin. **Blood**, Vol. 58. No.4 (October), 1981
- BOARD, P.G.; 1981. Transport of Glutathione S-Conjugate from Human Erythrocytes. **Febs Letter**, Volume 124, Number 2, 1981
- COSSUM, P.A.; 1988. Role of The Red Blood Cell in Drug Metabolism. **Biopharmaceutics&drug disposition**. 9: (1988) 321-336
- DEVES, R.; CHAVEZ, P.; BOYD, C.A.R.; 1992. Identification of a New Transport System in Human Erythrocytes That Recognizes Cysine and Leucine with High Affinity. **Journal of Physiology**, 454: 492-501
- DURAK, P.; CANPOLAT, O.; MÜFTÜOĞLU,S.; ERDEMLİ,Ö.; KULTUFAN, S.; ÖZGEN, G.; EBİL, S.; 2000. Hiperoksit sıçan akciğer dokusunda N-asetil Sisteinin antioksidant özelliğinin histopatolojik incelenmesi. **SBAG 1862 numaralı TUBİTAK projesi**.<http://www.arss.org/dergi/0025.htm>.
- ECKERT, K.G.; EYER, P.; 1986. Formation and Transport of Xenobiotic Glutathione S-Conjugates in Red Cells. **Biochemical Pharmacology**, VOL.35,No.2 pp.325-329,1986
- FLORA, S.D.; BENNICELLI, C.; CAMOIRANO, D.; SERRA, D.; ROMANO, M.; ROSSI, G.A.; MORELLI, A.; FLORA, A.D.; 1985. In Vivo Effects of N-acetylcysteine on Glutathione Metabolism and on The Biotransformation Carcinogenic and/or Mutagenic Compounds. **Carcinogenesis**. 6:(1985) 1735-1745
- FLORA, S.J.S.; 1999. Arsenic-Induced Oxidative Stress and its Reversibility Following Combined Administration of N-acetylcysteine and Meso 2.3-Dimercaptosuccinic acid in Rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**.26:(1999) 865-869
- FRAGA, C.G.; TAPPEL, A.L.; LELBOVITZ, B.E.; KUYPERS, F.; CHLU, D.;LACONO, J.M.; KELLEY, D.S.;1990. Lability of Red Cell Membranes to Lipid Peroxidation: Application to Humans Fed Polyunsaturated Lipids. **Lipids**. 25: 111-114
- FRANCHI-GAZZOLA, R.; GAZZOLA, G.C.; DALL'ASTA, V.; GUIDOTTI, G.G.; 1982. The Transport of Alanine, Serine and Cysteine in Cultured Human Fibroblasts. **The Journal of Biological Chemistry**, 257 (16) : 9582-9587
- FRANK, T.; 1969. Enzymic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian Blood and Other Tissues. **Analytical Biochemistry**, 27:502-503

- GRIFFITH, O.W.; 1999. Biologic and Pharmacological Regulation of Mammalian Glutathione Synthesis. **Free Radical Biology & Medicine** 27: (1999) 922-935
- HERCBERGS, A.; BROK-SIMONI, F.; HOLTZMAN, F.; BAR-AM, J.; LEITH, J.T.; BRENNER, H.J.; 1992. Erythrocyte Glutathione and Tumour Response to Chemotherapy. **Lancet**,1992; 339:1074-76
- HINHMAN, C.A.; MATSUMOTO, H.; SIMMONS, T.W.; BALLATORI,N.; 1991. Intrahepatic Conversion of Glutathione Conjugate to its Mercapturic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, 266:(1991) 22179-22185
- KARACA, H.; 1999. Tavşanlarda Deneysel Olarak Aşırı Demir Yüklenmesiyle Eritrositlerde Oluşturulan Akut Oksidatif Hasar Üzerine E vitamini ve Melatoninin Etkilerinin Araştırılması. www.sdu.edu.tr/old/saglik/tez
- KEPPLER, D.; 1999. Export Pumps for Glutathione S-conjugates. **Free Radical Biology Medicine**, vol 27, Nos.9/10. pp.985-991, 1999 Copyright.
- KILINÇ, Y.; Eritrositlerde Metabolitik Defektlere Bağlı Hemolitik Anemiler. Ç.Ü. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.B.D. **Eğitim Faaliyetleri**. Cilt II, Bölüm 14.9.1
- LABELLE, E.; SINGH, S.; AHMAD, H. ; WRONSKI, L.; SRIVASTAVA, S.; AWASTHI, Y.; 1988. A Novel Dinithrophenile Glutathione- Stimulated ATP ase in Present in Human Erythrocyte Membranes. **Published by Elsevier Science Publishers**, 228 (1): 53-56,1988
- LIEBMANN, J.E.; HAHN, S.M.; COOK, J.A.; LIPSCHULTZ, C.; MITCHELL, J.B.; KAUFMANN, D.C.; 1993. Glutathione Depletion by L-Buthionine Sulfoximine Antagonizes Taxol Cytotoxicity. **Cancer Research**, 53, 2066-2070, May 1,1993
- LUNN, G.; DALE, G.L.; BEUTLER, E.; 1979. Transport Accounts for Glutathione Turnover in Human Erythrocytes. **Blood**, Vol. 54, No.1 (July), 1979
- MATSUDA, Y.; EPSTEIN, L.F., GATMAITAN, Z., ARIAS, I.M.; 1996. The Role of Thiols ATP Dependent Transport of S-(2,4-dinithrophenyl) Glutathione by Rat Liver Plasma Membrane Vesicles. **Biochemical at Biophysica Acta**, 1279: 35-42
- MAZOR, D.; GOLAN, E.; PHILIP, V., KATZ, M.; JAFE, A.; BEN-ZVİ, Z.; MEYERSTEIN, N.;1996. Red Blood Cell Permeability to Thiol Compounds Following Oxidative Stress. **European Journal of Haematology**, 1996: 57: 241-246
- McLAGGAN, D.; RUFINO, H.; JASPARS, M. and BOOTH, I.R.; 2000. Glutathione Dependent Conversion of NEM to the Maleamic Acid by Escherichia coli : **Applied and Enviromental Microbiology**, 66 (4) : 1393-1399
- OLIVE, C.; BOARD,P.;1994. Glutathione S-conjugate Transport of Cultured by Human Cells. **Biochimica et Biophysica Acta** 1224 (1994) 264-268
- ONARAN, İ.; ÖZAYDIN, A.; GÜLTEPE, M.; SULTUYBEK, G.;1998. Transport of Glutathione Conjugate in Erythrocytes from Aged Subjects and Susceptibility to Oxidative Stress Following Inhibition of the Glutathione S-Conjugate Pump. **Mechanism of Ageing and Development** 103 1998, 195-207
- REBBEOR, J.F.; WANG, W.; CLIFTON, D.; BALLATORI,N.; 1998. Glutathione S-conjugate Formation and Metabolism in HepG2 cells: a Cell model of Mercapturic acid Biosynthesis. **Journal of Toxicology and Environmental**

- Health**. 53:(1998) 651-663
- RUFFMANN, R.; WENDEL, A.; 1991. GSH Rescue by N-Acetylcysteine. **Clinical Pharmacology, Klin Wochenschr** (1991) 69: 857-862
- SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H.; 1968. Determination of Sulfhydryl Groups in Biological Samples. **Analytical Biochemistry**. 25: (1968) 192-205
- SIES, H.; 1999. Glutathione and its Role in Cellular Functions. **Free Radical Biology and Medicine**, vol.27,nos.9/10. pp. 916-921,1999.
- SRIVASTAVA, S.K. and BEUTLER, E.; 1969. **The Journal of Biological Chemistry** Vol. 244, No.1, Issue of January 10, pp. 9-16, 1969.
- STRANGE, R.C.; JONES, P.W.; FRYER, A.A.; 2000. Glutathione S-transferase: Genetics and Role in Toxicology. **Toxicology Letters** 112-113 (2000) 357-363.
- SUGIMOTO, M.; KUHLENKAMP, J.; OOKHTENS, M.; AW, T.Y.; REEVE, J.JR.; KAPLOWITZ, N.; 1985. Gamma- glutamylcysteine: a Substrate for Glutathione- S-transferase. **Biochem Pharmacol**. 34 (20) : (1985) 3643-7
- TAMER, L., ÜNAL, B., AKSOY, K.; 1998. Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz Enzim Eksikliği Gözlenen Olgularda Eritrosit Zarı $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{Mg}^{++}$ adozin 5^1 - trifosfataz, Eritrosit Süperoksit dismutaz ve Plazma Malondialdehit Düzeyleri. lokman.cu.edu.tr/tfd/CILT23SAYI3YIL1998/lulufer.html.
- TIETZE, F.; 1968. Enzymic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian Blood and Other Tissues. **Analytical Biochemistry**, 27, 502-522 (1969)
- TRAUB, A.; MARGULIS, S.B.; STRICKER, R.B.; 1997. Topical Immune Modulation with Diclorobenzene in HIV Disease: a Controlled Trial from Brazil. **Dermatology**, 195(4): (1997) 369-73
- ULAKOĞLU, E.; GÜMÜŞTAŞ, M.K.; BELCE, A.; ALTUĞ, T.; KÖKOĞLU, E.; 1998. Strese Bağlı Mide Mukozası Hasarında Endojen Glutasyon Tükenişinin Enerji Metabolizması ile İlişkisi. **Cerrahpaşa J.Med.** 1998; 29 (3) : 127-131
- VRIES, N. D.; FLORA, S.D.; 1993. N-acetyl-L-cysteine. **Journal of Cellular Biochemistry**. 17F:(1993) 270-277
- WEINANDER, R.; ANDERSON, C.; MORGENSTERN, R.; 1994. Identification of N-acetylcysteine as a New Substrate for Rat Liver Microsomal Glutathione transferase. A study of thiol ligands. **J. Biol. Chem**. 269 (1) : (1994) 71-6
- WILEY, J. ; SONS, 1988. Role of the Red Blood Cell in Drug Metabolism. **Biopharmaceutics-Drug Disposition**, 9: 321-336, 1988
- YILDIRIM, N.; 1999. Bronşial Astımlı Hastalar ile Sağlıklı Bireylerde Melatonin, Süperoksit dismutaz ve Glutasyon peroksidaz Düzeyleri ve Lateralite ile İlişkilerinin Araştırılması. www.sdu.edu.tr/old/saglik/tez
- YILDIZ, D.; 1996. The Effects of 4-Hydroxynonenal and N-Acetyl-L-Cysteine on c-MYC Induced Apoptosis. **Master of Science in Chemistry**. 1996.

ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Antakya'da doğdum. İlköğrenimimi Niğde, orta ve lise öğrenimimi Antakya'da tamamladım. 1997 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun oldum ve aynı sene bir dershanede biyoloji öğretmeni olarak çalışmaya başladım. 1998 yılında Samandağ ilçesi Gözene köyü ilköğretim okulunda sınıf öğretmenliği görevine atandım. 1999 yılından beri M.K.Ü. Mediko-Sosyal Ünitesi'nde Biyolog olarak görev yapmaktayım.

