

**OKSİDATİF STRES KAYNAKLI NÖRON HASARINDA
ANTİOKSİDANLARIN KORUYUCU ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF PROTECTIVE EFFECTS OF
ANTIOXIDANTS ON NEURON INJURY BASED ON
OXIDATIVE STRESS**

ÖZGÜ ZUĞA ÖRSOĞLU

DOÇ. DR. ÖZER AYLİN GÜRPINAR

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2022

‘Her Őey zehirdir; mühim olan dozdur.’

Paracelsus’a

ÖZET

OKSİDATİF STRES KAYNAKLI NÖRON HASARINDA ANTIOKSİDANLARIN KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ÖZGÜ ZUĞA ÖRSOĞLU

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özer Aylin Gürpınar

Haziran 2022, 71 sayfa

Sunulan bu tez çalışması kapsamında nöronal bir hücre hattı olan SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattında, iki boyutlu in vitro oksidatif stres modeli oluşturulması ve bu modelde iki farklı antioksidanın koruyucu etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda SH-SY5Y hücreleri kültüre edilmiş ve hidrojen peroksit ile hücrelerde oksidatif stres modeli oluşturulmuştur. Bu model üzerinde artan dozlarda n-asetil sistein ve selenyumun koruyucu etkileri deneysel çalışmalarla incelenmiştir. Antioksidanların hücre canlılığına olan etkileri 24, 48 ve 72. saatlerde yapılan 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolyum bromür kalorimetrik testi ve akridin/orange propidyum iyodür floresan boyaması ile belirlenmiştir. 72. saatte, hücrelerde oluşan toplam antioksidan ve oksidan kapasite tayini yapılarak oksidatif stres indeksi tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, n-asetil sistein ve selenyumun belirlenen doz aralıklarında hücreleri oksidatif hasara karşı koruduğu, ancak yüksek dozlarda hücreler için toksik olabilecekleri belirlenmiştir. 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalarda hidrojen

peroksid hücre canlılığında önemli ölçüde azalmaya sebep olurken, hidrojen peroksid uygulaması öncesinde n-asetil sistein ve selenyum uygulanan gruplarda hücre canlılığı anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Toplam antioksidan ve oksidan kapasitesi tayinleri sonucu elde edilen oksidatif stres indekslerinde hidrojen peroksid uygulanan grubun en yüksek oksidatif strese sahip olduğu, antioksidan uygulanan gruplarda ise oksidatif stresin daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Selenyum ve n-asetil sistein koruyucu etkileri arasında ise anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Bu doğrultuda, n-asetil sistein ve selenyumun oksidatif stres kaynaklı nörodejenerasyonda koruyucu olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Bununla birlikte, gelecekte yapılacak olan kapsamlı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla bu sonucun desteklenmesi sayesinde bu iki antioksidan molekülün etkileri çok daha iyi anlaşılmış olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Oksidatif stres, antioksidan, n-asetil sistein, selenyum, nörodejenerasyon, SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF PROTECTIVE EFFECTS OF ANTIOXIDANTS ON NEURON INJURY BASED ON OXIDATIVE STRESS

ÖZGÜ ZUĞA ÖRSOĞLU

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özer Aylin Gürpınar

June 2022, 71 pages

In this thesis, it was aimed to establish a two-dimensional in vitro oxidative stress model in a neuronal cell line, SH-SY5Y, and to examine the protective effects of two different antioxidants in this model. In line with this goal, SH-SY5Y cells were cultured and an oxidative stress model was created with hydrogen peroxide. The protective effects of increasing doses of n-acetyl cysteine and selenium were investigated in experimental studies on this model. The effects of antioxidants on cell viability were determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide calorimetric test and acridine/orange propidium iodide fluorescent staining at 24, 48 and 72 hours. In the 72th hour application, the total antioxidant and oxidant capacity of the cells and the oxidative stress index was determined. According to the results obtained, it was determined that n-acetyl cysteine and selenium protect cells against oxidative damage at specified dose ranges, but they can be toxic at high doses. While hydrogen peroxide caused a significant decrease in cell viability in 24, 48 and 72 hours applications, cell viability was found to

be significantly higher in the groups to which n-acetyl cysteine and selenium were applied before hydrogen peroxide application. In the oxidative stress indices obtained as a result of the total antioxidant and oxidant capacity determinations, it was determined that the hydrogen peroxide-treated group had the highest oxidative stress, while the antioxidant-administered groups had lower oxidative stress. No significant difference was found between the protective effects of selenium and n-acetyl cysteine. Accordingly, it was concluded that n-acetyl cysteine and selenium may be protective in oxidative stress-induced neurodegeneration. This result needs to be supported by more extensive in vitro and in vivo studies in the future.

Keywords: Oxidative stress, antioxidant, n-acetyl cysteine, selenium, neurodegeneration, SH-SY5Y human neuroblastoma cell line.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmasını **FYL-2020-18869** proje kodu ile destekleyen **Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi**'ne;

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca sorduğum sayısız soruyu sabırla cevaplayan, hiçbir fikir ve önerimi geri çevirmeyen, bilgi birikimini benimle paylaşarak yardımlarını esirgemeyen ve her zaman yanımda olan sevgili danışman hocam **Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR**'a;

Hiçbir sorunumda beni yalnız bırakmayan, beni destekleyip yol göstererek bilimin ışığında ilerlememe yardımcı olan, her zaman örnek alacağım çok sevgili ve saygıdeğer hocam **Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR**'a;

Tez çalışmalarım sırasında karşılaştığım her türlü problemi çözmek için bana yardım eden, her zaman bana destek olup beni anlayan, güvenen ve motive eden sevgili hocam **Dr. Öğr. Üyesi Handan SEVİM AKAN**'a; desteğini her zaman üzerimde hissettiğim, beni her konuda cesaretlendirip motive eden, sorumluluk almamı ve gelişmemi sağlayan sevgili hocam **Dr. Öğr. Üyesi Esin ÇETİN**'e;

İstatistiksel çalışmalarım için bana vakit ayırıp, bilgilerini paylaşarak öğrenmemi sağlayan sevgili hocam **Prof. Dr. Duru KARASOY**'a;

Benden güler yüzünü ve desteğini esirgemeyen, her zaman danışabildiğim sevgili hocalarım **Arş. Gör. Dr. Hanife Güler TANIR DÖNMEZ** ve **Doç. Dr. Sırma ÇAPAR DİNÇER**'e

Her konuda tecrübelerini paylaşarak bana yol gösteren, gece gündüz demeden çalışmalarına yardım eden, bilgisini, sevgisini ve dostluğunu benden esirgemeyen sevgili **Pelin DENİZ UÇGUN**'a; çalışmalarım boyunca her zaman bana destek olan, yükümü hafifleten, her türlü sorunumda yardımcı olup beni motive eden, dostluğu ve samimiyetiyle yanımda olan sevgili **Şefika ÖZCAN**'a; her konuda bana yardımcı olan, beraber çalışmaktan keyif aldığım ve iyi ki tanışmışım dediğim sevgili dostum **Elif Hatice BABAYİĞİT**'e; hiçbir yardım isteğimi geri çevirmeyen, her konuda fikir alışverişinde bulunabildiğim, her zaman yanımda olan ve desteğini üzerimde hissettiğim sevgili dostum **İbrahim KAMACI**'ya;

Tüm zamanlarımda olduğu gibi bu süreçte de yanımda olan, benden sevgisini, güvenini ve desteğini esirgemeyen, derdime hemdert olan, güler yüzü ve iyi kalbiyle dünyanın en güzel dostluğuna sahip olmamı sağlayan çok sevgili **Oya BÖLEK**'e; her zaman beni motive eden, bana yol göstererek fikir veren, sorunlarıma çözüm bulmak için uğraşan ve tezimi düzenlememde bana yardımcı olan çok sevgili **Barış Rıza VURAL**'a;

Son olarak, bana sonsuz güven duyan, beni özgür bir birey olarak yetiştiren, her kararımda arkamda durup beni destekleyen, benimle ağlayıp benimle gülen, yaşadığım hiçbir zorlukta bana kendimi asla yalnız hissettirmeyen, kızları olmaktan büyük bir mutluluk ve gurur duyduğum çok sevgili babam **Ekrem ÖRSOĞLU** ve çok sevgili annem **Melahat ALP**'e saygı, sevgi ve teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Serbest Radikaller	3
2.2. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)	3
2.2.1. Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$)	4
2.2.2. Süperoksit Radikali (O_2^{\bullet})	4
2.2.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	5
2.2.4. Hidroksil Radikali (OH^{\bullet})	6
2.3. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri Kaynakları	6
2.3.1. Eksojen Kaynaklar	7
2.3.2. Endojen Kaynaklar	7
2.4. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri'nin Fizyolojik Etkileri	8
2.4.1. Düşük ve Orta Dozlarda Etkiler	9
2.4.2. Yüksek Dozda Etkiler	9
2.4.2.1. Lipidler	10
2.4.2.2. Proteinler	11
2.4.2.3. DNA	11
2.4.2.4. Karbonhidratlar	12
2.5. Antioksidan Savunma Sistemi	12
2.5.1. Enzimatik Antioksidanlar	13
2.5.1.1. Süperoksit Dismutazlar (SOD)	14
2.5.1.2. Katalaz (CAT)	15
2.5.1.3. Glutasyon Sistemi	15
2.5.1.4. Diğer Antioksidan Enzimler	17

2.5.2. Enzimatik Olmayan Metabolik Antioksidanlar	17
2.5.2.1. Metal Bağlayıcı Proteinler (MBP)	17
2.5.2.2. Glutasyon	18
2.5.2.3. Melatonin (MEL)	18
2.5.2.4. Ürik Asit (UA)	18
2.5.2.5. Bilirubin (BIL)	19
2.5.3. Enzimatik Olmayan Eksojen Antioksidanlar	19
2.5.3.1. Askorbik Asit (C Vitamini)	19
2.5.3.2. E Vitamini	20
2.5.3.3. Flavonoidler	20
2.5.3.4. Karotenoidler	20
2.5.3.5. Selenyum (Se)	21
2.5.3.6. N-Asetil Sistein (NAC)	21
2.5.4. Sentetik Antioksidanlar	22
2.5.5. Antioksidan Takviye Edici Gıdalar	22
2.6. Oksidatif Stres	23
2.6.1. Oksidatif Stres Biyobelirteçleri	24
2.6.2. Oksidatif Stres ve Nörodejeneratif Hastalıklar	25
2.6.2.1. Oksidatif Stres ve Alzheimer Hastalığı (AH)	26
2.6.2.2. Oksidatif Stres ve Parkinson Hastalığı (PH)	27
2.6.2.3. Oksidatif Stres ve Diğer Nörodejeneratif Hastalıklar	27
2.7. Nörodejeneratif Hastalıklar ve Antioksidanlar	28
2.8. Nöronal Hücre Hatları	28
2.8.1. SH-SY5Y İnsan Nöroblastoma Hücre Hattı	29
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	31
3.1. L929 Fare Fibroblast Hücre Hattı İle Doz Aralıklarının Belirlenmesi	31
3.1.1. Hidrojen Peroksit Konsantrasyonlarının Hazırlanması	31
3.1.2. N-Asetil Sistein Konsantrasyonlarının Hazırlanması	32
3.1.3. Selenyum Konsantrasyonlarının Hazırlanması	32
3.1.4. Hazırlanan Konsantrasyonların L929 Hücre Hattında Denenmesi	32
3.2. SH-SY5Y İnsan Nöroblastoma Hücre Hattının Kültüre Edilmesi	35
3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deney Planı	37
3.4. Deneyde Kullanılan Analiz Yöntemleri	40

3.4.1. 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolyum bromür (MTT) Testi	40
3.4.2. Akridin Orange/Propidyum İyodür (AO/PI) Floresan Boyama Yöntemi ile Hücre Canlılığının İncelenmesi.....	41
3.4.3. Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAS) Tayini	42
3.4.4. Toplam Oksidan Kapasitesi (TOS) Tayini.....	43
3.4.5. Oksidatif Stres İndeksinin (OSİ) Belirlenmesi.....	43
3.5. İstatistiksel Analizler.....	43
4. SONUÇ ve tartışma.....	45
4.1. L929 Fare Fibroblast Hücre Hattında Doz Aralıklarının Sonuçları	45
4.2. SH-SY5Y Hücre Hattında Hidrojen Peroksit İçin IC ₅₀ Değeri Belirlenmesi	49
4.3. SH-SY5Y Hücrelerinde MTT Analizi Sonuçları.....	50
4.4. Akridin Orange/Propidyum İyodür (AO/PI) Floresan Boyama Yöntemi ile Hücre Canlılığının İncelenmesi	53
4.5. Toplam Antioksidan Kapasitesi Sonuçları	54
4.6. Toplam Oksidan Kapasitesi Sonuçları	55
4.7. Oksidatif Stres İndeksi Sonuçları.....	57
5. KAYNAKLAR	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Hidrojen peroksitin oluşumu [12].....	5
Şekil 2.2. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarının oluşumu [15]	6
Şekil 2.3. Süperoksit dismutazın etkisi [37]	14
Şekil 2.4. Katalazın etkisi [3].....	15
Şekil 2.5. Glutatyon peroksidazın etkisi [4].....	16
Şekil 2.6. Glutatyon redüktazın etkisi [12]	16
Şekil 2.7. Glutatyon döngüsü [11]	16
Şekil 2.8. Glutatyon-S-transferazın etkisi [48]	17
Şekil 3.1. L929 hücrelerinde deney şeması.....	34
Şekil 3.2. SH-SY5Y hücrelerinin inkübasyonun 24. saatindeki morfolojik görüntüsü (10X) (a) SH-SY5Y hücrelerinin inkübasyonun 48. saatindeki morfolojik görüntüsü (10X) (b)	36
Şekil 3.3. SH-SY5Y hücrelerinde deney şeması.....	39
Şekil 3.4. Formazen kristalleri oluşumu	40
Şekil 3.5. ABTS ^{•+} ’de renk değişimi.....	42
Şekil 3.6. TOS kitindeki renk değişimi.....	43
Şekil 4.1. İnkübasyonun 24. satinde H ₂ O ₂ , sodyum selenit ve NAC ile muamele sonrası L929 hücrelerinin morfolojik görüntüsü (10X) H ₂ O ₂ (a), Sodyum selenit (b), NAC (c), kontrol (d).....	45
Şekil 4.2. L929 hücrelerinde H ₂ O ₂ uygulaması sonrası MTT testi sonuçları.....	46
Şekil 4.3. L929 hücrelerinde NAC uygulaması sonrası MTT testi sonuçları.....	47
Şekil 4.4. L929 hücrelerinde sodyum selenit uygulaması sonrası MTT testi sonuçları.....	48
Şekil 4.5. SH-SY5Y hücrelerinde H ₂ O ₂ uygulaması sonrası MTT testi sonuçları	49
Şekil 4.6. SH-SY5Y hücrelerinde 24 saatlik MTT testi sonucu	50
Şekil 4.7. SH-SY5Y hücrelerinde 48 saatlik MTT testi sonucu	51
.....	52
Şekil 4.8. SH-SY5Y hücrelerinde 72 saatlik MTT testi sonucu	52
Şekil 4.9. SH-SY5Y hücrelerinde deney ve kontrol gruplarında AO/PI boyaması örneği.	53

Şekil 4.10. Toplam antioksidan kapasitesi tayini ** En düşük TAS miktarı	55
.....	56
Şekil 4.11. Toplam oksidan kapasitesi tayini ** En yüksek TOS miktarı.....	56
Şekil 4.12. Oksidatif stres indeksi sonuçları	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri.....	4
Çizelge 2.2. Bazı reaktif oksijen türleri ve etkili antioksidanlar.....	22
Çizelge 2.3. Bazı oksifatif stres biyobelirteçleri	24
Çizelge 3.1. L929 hücre hattı için deney ve kontrol grupları	33
Çizelge 3.2. SH-SY5Y hücre hattı için deney ve kontrol grupları.	38
Çizelge 3.3. Canlı ve ölü hücre sayısının hesaplanması	42
Çizelge 4.1. 24, 48 ve 72. saatlerdeki AO/PI boyama sonucu hücre canlılığı sonuçları.....	54
Çizelge 4.2. Toplam antioksidan kapasitesinin hesaplanması için kullanılan formül.....	55
Çizelge 4.3. Toplam oksidan kapasitesinin hesaplanması için kullanılan formül	56
Çizelge 4.4. Oksidatif stres indeksinin hesaplanması için kullanılan formüller.	57

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Δ	Delta
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Sigma
e^-	Elektron
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat
rpm	Dakikadaki Dönme Sayısı
μl	Mikrolitre
ml	Mililitre
M	Molar
μM	Mikromolar
nM	Nanomolar
mM	Milimolar
μm	Mikrometre

Kısaltmalar

ROT	Reaktif Oksijen Türleri
RNT	Reaktif Nitrojen Türleri
RST	Reaktif Sülfür Türleri
H_2O_2	Hidrojen Peroksit

$O_2^{\cdot-}$	Süperoksit Radikali
OH^{\cdot}	Hidroksil Radikali
1O_2	Singlet Oksijen
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
ATP	Adenozin Trifosfat
SOD	Süperoksit Dismutaz
Fe	Demir
UV	Ultraviyole
ETS	Elektron Taşıma Sistemi
QH_2	İndirgenmiş Koenzim Q
$\cdot Q$	Semikinon Anyonu
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid
MAPK	Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz
Cu/Zn	Bakır/Çinko
CAT	Katalaz
GSH	İndirgenmiş Glutatyon
GSSG	Yükseltgenmiş Glutatyon
GPx	Glutatyon Peroksidaz
GR	Glutatyon Redüktaz
GST	Glutatyon-S-Transferaz
MBP	Metal Bağlayıcı Proteinler
MEL	Melatonin
UA	Ürik Asit
BIL	Bilirubin

NAC	N-Asetil Sistein
MDA	Malondialdehit
AH	Alzheimer Hastalığı
PH	Parkinson Hastalığı
ALS	Amyotrofik Lateral Skleroz
MS	Multipl Skleroz
NRF2	Nükleer Faktör-E2 ile İlişkili Faktör
ARE	Antioksidan Yanıt Elementleri
NGF	Sinir Büyüme Faktörü
ATRA	All-trans Retinoik Asit
FBS	Fetal Bovin Serum
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Ham's 12
DMSO	Dimetil Sülfoksit
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolyum bromür
AO/PI	Akridin Orange/Propidyum İyodür
PBS	Phosphate Buffered Saline
ABTS ^{•+}	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
FITC	Floresan İzotiyosiyanat
TAS	Total Antioxidant Status
TOS	Total Oxidant Status
OSİ	Oksidatif Stres İndeksi
IC ₅₀	Yarı-Maksimum İnhibisyon Konsantrasyonu
LRP8	Lipoprotein Reseptörü ile İlişkili Protein 8

1. GİRİŞ

İnsan vücudunda gerçekleşen fizyolojik ve biyokimyasal süreçler sonucunda her gün belirli bir miktar serbest radikal ve reaktif oksijen (ROT) üretimi gerçekleşmektedir. Bu reaktif moleküller düşük dozda düz kas kasılması, immün savunma ve hücre içi sinyal iletimi gibi çeşitli süreçler için gereklidir. Bu nedenle vücutta reaktif moleküllerin belirli bir dengede kalmasını sağlayan antioksidan savunma sistemleri bulunmaktadır. Bu sistemler, enzimatik ve enzimatik olmayan çeşitli süreçlerle, reaktif molekülleri ortadan kaldırarak ya da daha kararlı forma getirerek etki göstermektedir.

Sağlıklı bir organizmada antioksidanlar/reaktif moleküller oranı antioksidanların üstünlüğüyle dengededir. Ancak, çeşitli faktörlerin etkisiyle antioksidan kapasitenin yetersiz kalıp, dengenin reaktif moleküller yönünde bozulması durumunda hücrelerde oksidatif stres oluşmaktadır. Oksidatif stres proteinler, lipidler ve DNA gibi organizma için önemli biyomoleküllerin yapısına zarar vererek oksidatif hasara neden olabilmektedir. Bu sebeple astım, diyabet, kanser ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın oluşumunda oksidatif stresin önemli bir parametre olduğu bilinmektedir.

Özellikle beynin yapı ve metabolizması nedeniyle oksidatif strese hassas oluşu, nörodejeneratif hastalıkların oluşumunda etkili olmaktadır. Alzheimer, Parkinson ve amyotrofik lateral skleroz hastalığında (ALS) gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda oksidatif stresin önemli bir faktör olduğu bilinmektedir.

Oksidatif stresin azaltılmasına ilişkin yaklaşımlar ise antioksidan savunma sisteminin güçlendirilerek, dengenin yeniden oluşturulmasına yöneliktir. Hem vücut içinde doğal olarak bulunan antioksidanlar, hem de diyetle dışardan alınan antioksidan moleküller bu savunma sistemine katkı sağlamaktadır. Bu nedenle çeşitli antioksidanların etkilerini belirlemek üzerine yapılan çalışmalar günümüzde giderek hız kazanmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında da selenyum ve n-asetil sistein antioksidanlarının etkileri incelenmiştir. Selenyum, enzimatik bir antioksidan olan glutatyon peroksidazın kofaktörü, n-asetil sistein ise bir glutatyon öncülüdür. Her iki antioksidan da etkisini glutatyon sistemi üzerinden göstermektedir. Beyinde glutatyon ve glutatyonla ilişkili enzim miktarının diğer organlara kıyasla düşük olduğu bilinmektedir. Glutatyon sistemiyle doğrudan ilişkili selenyum ve n-asetil sisteinin kan-beyin bariyerinden

geçebildiği bilinmektedir. Bu sebeple özellikle oksidatif stres kaynaklı nörodejenerasyon modellerinde bu antioksidanların etkilerinin belirlenmesi ayrıca önem taşımaktadır.

Bu bağlamda, tez çalışmasında SH-SY5Y nöronal hücre hattında oksidatif stres modeli oluşturularak, selenyum ve n-asetil sisteinin bu model üzerindeki doza ve süreye bağlı etkileri incelenmiştir. Etkilerin belirlenmesi için deney planına uygun olarak, hücre canlılığı analizleri ve oksidatif stres tayini yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller

Son orbitallerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron bulundurması nedeniyle, oldukça kararsız ve reaktif olan atom, molekül ve iyonlar serbest radikaller olarak sınıflandırılmaktadır [1]. Ancak, bazı geçiş metalleri eşlenmemiş elektronları olmasına rağmen serbest radikal olmayıp, serbest radikallerin oluşumunda oldukça etkilidirler.

Serbest radikaller kararlı forma geçebilmek için, elektron verici ya da alıcı gruplarla güçlü bir şekilde reaksiyona girmektedir. Bu tür reaksiyonlar, kararlı grupların yapısını bozarak yeni serbest radikallerinin oluşumuna yol açmakta ve oluşan ikincil serbest radikaller de diğer kararlı gruplarla reaksiyona girerek bir dizi zincirleme reaksiyonun başlamasına neden olmaktadır. Bu zincirleme reaksiyonlar sonucunda canlı organizma için hayati öneme sahip lipid, protein ve DNA yapılarında oksidatif hasar meydana gelmektedir [2]. Oksidatif hasar ise astım, diyabet, ateroskleroz, kanser ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın oluşumunda etkili rol oynamaktadır [3].

Serbest radikaller genellikle reaktif oksijen türleri (ROT), reaktif nitrojen türleri (RNT) ve reaktif sülfür türleri (RST) gibi çeşitli reaktif moleküllerden oluşmaktadır. Buna istinaden, serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri terimleri çoğu kez birbiri yerine kullanılsa da tüm ROT, RNT ve RST'lerin serbest radikal olmadıkları belirlenmiştir [4]. Örneğin bu tez çalışması kapsamında da kullanılan hidrojen peroksit (H_2O_2) bir reaktif oksijen türü olup, serbest radikal değildir. Ancak, serbest radikal üretimini tetiklemekte ve bu yolla hücreye zarar vermektedir.

2.2. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Reaktif oksijen türleri (ROT), temel durumdaki moleküler oksijenden türetilen bir dizi serbest oksijen radikali ve serbest radikal olmayan bazı reaktif moleküllerden oluşmaktadır (Çizelge 2.1.) [5]. ROT, esas olarak moleküler oksijenin indirgenmesi yoluyla ortaya çıkmaktadır. Moleküler oksijen, organizmalar ve biyolojik sistemler için gereklidir. Moleküler oksijende temel durumda iki adet radikal merkez bulunur, bu sebeple diradikaldir. Dış yörüngesinde eşit dönme kuantum sayısına sahip iki adet eşlenmemiş elektron bulunmaktadır. Elektronların dönme kuantum sayılarının eşit olmasından dolayı moleküler oksijen aynı anda yalnızca bir elektron ile reaksiyona

girmektedir. Oldukça kararsız ve reaktif oksijen türlerinin oluşumu ise bu elektronlardan birinin uyarılması sonucu gerçekleşmektedir. Bu uyarımlar sonucunda süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) radikali ve hidroksil radikali (OH^{\cdot}) gibi serbest radikaller ile hidrojen peroksit (H_2O_2) ve singlet oksijen (1O_2) gibi reaktif moleküller oluşmaktadır. Oluşan bu reaktif oksijen türleri, kararlı gruplarla reaksiyonlara girerek bir dizi zincirleme reaksiyonları başlatmaktadır [6].

Çizelge 2.1. Radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri [1]

BAZI REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ	
Radikal Türler	Radikal Olmayan Türler
Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)	Hidrojen Peroksit (H_2O_2)
Hidroksil Radikali (OH^{\cdot})	Singlet Oksijen (1O_2)
Peroksil Radikali (RO_2^{\cdot})	Hipokloröz Asit ($HOCl$)
Hidroperoksil Radikali (HO_2^{\cdot})	Hipobromöz Asit ($HOBr$)

2.2.1. Singlet Oksijen (1O_2)

Singlet oksijen, moleküler oksijenin elektronlarından birinin elektron transferi yoluyla uyarılmış halidir. Bu uyarım sonucu moleküler oksijen, önce delta singlet oksijene ($^1\Delta O_2$), ardından sigma singlet oksijene ($^1\Sigma O_2$) dönüşmektedir. Singlet oksijenin iki formu da eşlenmemiş elektron bulundurmamasına rağmen oldukça reaktif ve kısa ömürlüdür [7].

Singlet oksijen formlarının, organizmada özellikle DNA eşlenmesi sırasında adenin:timin baz çiftinin guanin:sitozin baz çiftine dönüşüne yol açarak, DNA yapısında hasarlara ve dolayısıyla çeşitli mutasyonlara neden olduğu bilinmektedir [8].

2.2.2. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

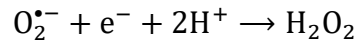
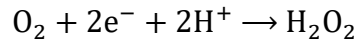
Süperoksit radikali, diradikal durumdaki oksijenin bir elektron alarak redükte olmuş halidir. Bu sebeple, negatif yüklü bir serbest radikaldir ve süperoksit anyonu olarak da isimlendirilmektedir [9]. Moleküler oksijenin bu şekilde redükte edilmesi organizmada özellikle ATP üretimi sırasında mitokondride meydana gelmektedir [10].

Süperoksit radikali primer ROT kapsamında kabul edilmektedir. Ancak, diğer moleküllerle ve bazı geçiş metalleriyle enzimatik ya da enzimatik olmayan reaksiyonlar yoluyla etkileşime girerek ikincil ROT de üretebilmektedir. Örneğin, süperoksit radikali organizmada düşük pH'da hidroperoksil olarak çok daha reaktif formda bulunabilmektedir [11].

Süperoksit radikalının önemli fonksiyonlarından biri de organizma için oldukça önemli bir ROT olan hidrojen peroksit oluşumunda rol almasıdır. Hem okside edici hem de redükte edici özelliğinden dolayı, perihidroksil radikaliyle serbest radikallerin radikal olmayan ürünler oluşturduğu dismutasyon reaksiyonuna girerek, hidrojen peroksit oluşumunda rol almaktadır [12].

2.2.3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit, organizmada farklı süreçlerle oluşmaktadır. Temel olarak moleküler oksijenin, çeşitli oksidazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar sonucu iki elektron alarak redüklenmesiyle ya da süperoksit radikalının bir elektron alarak redükte olmasıyla peroksit oluşmaktadır. Oluşan bu peroksitin iki proton (H⁺) ile birleşmesi sonucunda da hidrojen peroksit meydana gelmektedir (Şekil 2.1.) [13].

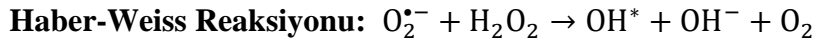
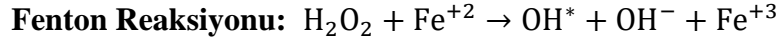


Şekil 2.1. Hidrojen peroksitin oluşumu [12]

Hidrojen peroksit, aynı zamanda dismutasyon reaksiyonu sonucunda da oluşmaktadır. Dismutasyonda, iki süperoksit radikali iki proton alarak hidrojen peroksiti oluşturmaktadır. Bu reaksiyon kendiliğinden gerçekleşebildiği gibi, süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından da gerçekleştirilebilmektedir [14].

Hidrojen peroksit, yüksek oksidan ve bir serbest radikal olmasa da, serbest radikal oluşumunda önemli bir rol oynadığı için ROT kapsamına girmektedir. Özellikle Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları sonucu organizma için en reaktif serbest radikal olan hidroksil radikalini (OH[•]) oluşturmaktadır.

Geçiş metalleri varlığında hidrojen peroksitin parçalanmasıyla hidroksil radikalının oluşumu Fenton reaksiyonu; süperoksit radikalının varlığında hidrojen peroksitin parçalanmasıyla hidroksil radikalının oluşumu ise Haber-Weiss reaksiyonu olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.2.) [15].



Şekil 2.2. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarının oluşumu [15]

2.2.4. Hidroksil Radikali (OH^{*})

Hidroksil radikali, çok yüksek reaktiviteye sahip nötr bir hidroksit iyonu şeklindedir. ROT arasındaki en reaktif formun OH^{*} olduğu düşünülmektedir [16]. Bu sebeple organizmadaki farklı moleküllerle güçlü reaksiyonlara girerek, moleküllerin yapısına zarar vermektedir. Bu zararı özellikle protein ve lipid gibi makromoleküller arası çapraz bağlar oluşturarak, moleküllere elektron transfer ederek ya da moleküllerden proton kopararak vermektedir [17].

Temel olarak hidroksil radikalının oluşumundan daha önce de bahsedildiği gibi Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları sorumludur. Fenton reaksiyonu organizmada ferröz formundaki demir iyonunun, ferrik formuna dönüşümünü gerçekleştirmektedir. Bu sebeple biyolojik sistemlerde OH^{*} oluşumunun birincil kaynağı Fenton reaksiyonudur (Şekil 2.2.). Hidroksil radikali, süperoksit radikali ve hidrojen peroksitle ilgili ikincil reaksiyonlar sonucu oluştuğu için, sekonder ROT oluşumunun en iyi örneklerinden biri olarak kabul edilmektedir [18].

2.3. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri Kaynakları

Aerobik organizmalarda serbest radikaller ve ROT oluşumu, normal fizyolojik süreçler boyunca kendiliğinden gerçekleşmektedir. Bu şekilde organizmanın doğal süreçlerinde oluşan serbest radikaller ve ROT'nin kaynakları *endojen kaynaklar* olarak isimlendirilmektedir [19]. Bununla beraber, organizmanın bulunduğu çevredeki çeşitli fiziksel ve kimyasal faktörler de organizmada serbest radikal ve ROT oluşumuna neden

olmaktadır. Bu şekilde dış etmenlerin etkisiyle oluşan serbest radikaller ve ROT'nin kaynakları ise eksojen kaynaklar olarak isimlendirilmektedir [20].

2.3.1. Eksojen Kaynaklar

Organizmanın yaşadığı çevredeki koşullar, bazı ilaçlar ve diyetle alınan çeşitli maddeler, eksojen kaynaklı serbest radikal ve ROT oluşumuna yol açabilmektedir.

Özellikle, karbonmonoksit, asbest ve sigara dumanı gibi hava kirleticiler, formaldehit, toluen ve tiner gibi kimyasal çözücüler, UV ışını ve X-Ray ışını gibi radyasyonlar ile herbisit ve insektisit gibi çeşitli pestisitlere maruz kalınması durumunda, organizmada yan ürün olarak serbest radikal ve ROT oluşumu gerçekleşmektedir [21].

Hava kirletici partiküller, içerisinde çeşitli geçiş metalleri ve oksidanlar bulunması nedeniyle; insektisitler ise mitokondrideki elektron transport sisteminde bulunan kompleksleri inhibe etmesi nedeniyle eksojen kaynaklar arasında oldukça önemli bir yere sahiptir [22].

Kanser tedavisinde kullanılan sisplatin ve doksorubisin gibi antitümör ilaçların birçoğunun etki mekanizması, ROT üretiminin aşırı artırılmasıyla, hücre DNA'sında hasar meydana getirilerek hücrenin apoptoza yönlendirilmesi şeklindedir [23].

Organizmanın diyetle aldığı demir ve bakır miktarının normalin üzerinde olması, geçiş metalleriyle indüklenen Fenton reaksiyonunun hızlanmasına ve dolayısıyla ROT miktarında artışa neden olmaktadır. Bununla beraber yine diyetle alınan yüksek oranda alkolün karaciğer hücrelerinde serbest radikal oluşumunu arttırdığı bilinmektedir [24].

2.3.2. Endojen Kaynaklar

Aerobik organizmalarda çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik süreçler sonucu her gün belirli bir miktar serbest radikal ve ROT oluşmaktadır [25].

Mitokondride bulunan elektron taşıma sistemi (ETS), endojen serbest radikal ve ROT oluşumunun ana kaynağıdır. Burada enzimatik ve enzimatik olmayan süreçler boyunca serbest radikal ve ROT üretimi gerçekleşmektedir. ETS elemanlarından kompleks I (NADH Dehidrogenaz) ve kompleks III (übikinon sitokrom c redüktaz) süperoksit radikallerinin *enzimatik olmayan yolla* üretildiği ana bölgelerdir. Elektron transferi sırasında elektronların kompleks I veya II'den koenzim Q veya ubikinon'a (Q) transferi,

indirgenmiş koenzim Q (QH₂) formunun oluşumuyla sonuçlanmaktadır. QH₂ ise Q döngüsü sırasında kararsız bir semikinon anyonu (•Q⁻) vasıtasıyla koenzim Q'yu yeniden üretmektedir. Oluşan bu semikinon anyonu elektronları hemen moleküler oksijene aktararak, süperoksit radikalinin oluşumuna yol açmaktadır. Bu süreç enzimatik olmadığı için süperoksit radikalinin üretim miktarı metabolizma hızıyla doğru orantılıdır [26].

Bu süreci takiben, oluşan süperoksit radikali mitokondrinin matriksine ve zarlar arası boşluğuna salınmaktadır. Bu aşamada ise *enzimatik yolla* H₂O₂ üretimi gerçekleşmektedir; süperoksit radikali, mitokondriyel süperoksit dismutaz enziminin kataliziyle, hidrojen peroksite (H₂O₂) dönüştürülmektedir. H₂O₂ hücrenin antioksidan kapasitesine bağlı olarak katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri tarafından detoksifiye edilmektedir. Antioskidan kapasitenin yetersiz olması durumunda ise H₂O₂ Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları sonucunda hücre için oldukça reaktif olan hidroksil radikalini (OH[•]) oluşturabilmektedir [27].

Mitokondri dışında, sitoplazmik bir enzim ailesi olan NADPH oksidaz (NOX) da serbest radikal ve ROT'ların endojen kaynaklarından biridir. NOX ailesi transmembran yapıda proteinler olup, bir elektronu NADPH'dan FAD'a aktararak moleküler oksijenin süperoksit radikaline dönüşümünü katalizlemektedirler. Özellikle immün sistemde bir patojen varlığıyla aktive olan nötrofil ve makrofajlar, membrana bağlı NADPH oksidazın moleküler oksijen üzerindeki etkisiyle süperoksit ve türevlerini üreterek, bu yolla ortamdaki patojenleri yok etmektedirler. Ayrıca fibroblastlar, endotelial hücreler, vasküler düz kas hücreleri, kardiyak monositler ve tiroid dokusu da yine NADPH oksidaz yoluyla süperoksit radikali üreterek, hücre içi sinyal yollarını düzenlemektedirler [28].

Bunlara ek olarak, endoplazmik retikulumda flavoenzim ERO1, ksantin oksidaz, siklo-oksijenazlar, otooksidasyon sırasında sitokrom p450 enzimleri, lipoksijenazlar, flavin bağımlı demetilaz oksidazlar gibi bir dizi hücre içi enzim de endojen serbest radikal ve ROT üretiminden sorumludur [29].

2.4. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri'nin Fizyolojik Etkileri

Normal fizyolojik süreçte, insan vücudunda her gün hücre başına 10.000-20.000 arasında serbest radikal ve ROT üretiminin gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu miktar vücut savunması, hücre farklılaşması ve düz kasların kontrolü gibi hücrenel süreçlerde başlama ve yanıt vermede anahtar rol oynarken, yüksek dozlar ise lipid, protein ve DNA gibi

biyomoleküller üzerinde yapısal değişikliklere neden olmaktadır. Bu sebeple serbest radikal ve ROT'nin fizyolojik etkilerinin doza bağımlı olarak değiştiği bilinmektedir [30].

2.4.1. Düşük ve Orta Dozlarda Etkiler

Hücre içi ROT seviyelerinin hücre aktivitesini büyük ölçüde etkilediğini ve hücre proliferasyonu için belirli bir ROT seviyesinin gerekli olduğu bilinmektedir. Özellikle düşük seviyelerdeki H₂O₂ ve süperoksit radikalının düz kas hücrelerinin, fibroblastların ve aort endotel hücrelerinin çoğalmasını teşvik ettiği belirlenmiştir [31]. Bununla birlikte ROT'nin hücre proliferasyonunu nasıl regüle ettiği henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu regülasyon için iki farklı olasılık söz konusudur. Bunlardan biri ROT'lerinin büyüme faktörlerini indükleyerek hücre proliferasyonunu regüle ettiği yönündedir. Diğeri ise ROT'nin mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) sinyal yolu gibi hücre proliferasyonu ile ilişkili bir sinyal yolağına dahil olarak regülasyonu sağladığı yönündedir [32].

1960-1970'lerde Babior ve ark. tarafından fagositik hücrelerle yapılan bir çalışmada, patojenlerle karşılaşan fagositik hücreler tarafından NADPH oksidaz enzimi aracılığıyla aniden ve yüksek miktarda ROT'nin üretiltiği tespit edilmiştir. Bu şekilde fagositik hücreler tarafından yüksek miktarda ROT üretimi ise solunum patlaması (oksidatif patlama) olarak tanımlanmaktadır. Solunum patlaması sırasında patojenlerin ROT aracılığıyla yok edilmesi ise ROT'nin insanda doğal bağışıklık sisteminde yer aldığını göstermektedir [33].

1980'lerin sonunda Heffetz ve Zick tarafından yapılan çalışmada da, ROT'nden olan H₂O₂'nin bir rat hepatoma hücre hattında insülin reseptörü substrat 1'in tirozin fosforilasyonundan sorumlu olduğu belirlenmiştir [34].

Bu çalışmaları takiben, ROT'nin hücre içi bir sinyal molekül olarak rol oynadığı ve hipoksik tepki, otofaji, hücre büyüme ve farklılaşması, kök hücre yenilemesi, yara iyileşmesi, nöromodülasyon, ATP üretimi, gen ifadesinin düzenlenmesi ve apoptoz gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlarda yer aldığı bildirilmiştir [35].

2.4.2. Yüksek Dozda Etkiler

Serbest radikaller ve ROT, vücutta bulunan her türlü molekül ile kolayca reaksiyona girip yapısal bütünlüğü bozabildiği için, yüksek dozda biyomoleküller için oldukça

tehlikelidir. Özellikle lipidler, proteinler, karbonhidratlar ve DNA bu moleküller için ana hedeflerdir [36].

2.4.2.1. Lipidler

Yüksek dozda serbest radikal ve ROT'nin lipidlerle reaksiyona girmesi sonucu *lipid peroksidasyonu* olarak adlandırılan bir reaksiyon başlamaktadır. Hücre membranında ve organel membranında bulunan lipidler, özellikle de çoklu doymamış yağ asitleri, serbest radikaller tarafından oksidasyona karşı daha hassastır. Bu sebeple lipid peroksidasyonu sonucu oluşan radikaller hücre membranının akışkanlığını ve geçirgenliğini değiştirmekte, ayrıca membrana bağlı proteinlerin varlığı nedeniyle enzimlerin ve reseptörlerin fonksiyonlarını da etkileyebilmektedir [37].

Bunların dışında, lipid peroksidasyonu reaksiyonu sırasında, ikincil haberciler olarak hareket edebilen, yani toksik etkilerini üretim bölgesinden uzakta gösterebilen bazı toksik ara ürünler de oluşmaktadır [38].

Lipid peroksidasyonu, serbest radikal ve ROT'lerinin yağ asidiyle reaksiyona girerek, konjuge çift bağlardan bir hidrojen atomu (H) koparmasıyla başlamaktadır. Hidrojenini kaybeden yağ asidi zinciri, karbon merkezli bir lipid radikali (L') özelliği kazanmaktadır. Lipid radikali ise moleküler oksijen ile reaksiyona girerek bir lipid peroksil radikalini (LOO•) oluşturmaktadır. Bu radikaller, ortamda bulunan diğer lipidlerden hidrojen atomlarını kopararak yeni lipid radikalleri ile lipid hidroperoksitler (LOOH) üretmekte ve böylece yeni bir lipid peroksidasyon reaksiyonunu başlatmaktadır [39].

Lipid peroksidasyonu, reaksiyon sırasındaki her basamağın kendinden sonraki basamağı tetiklemesi ve oluşan lipid peroksil radikallerinin reaksiyonu tekrar başlatabilmesi nedeniyle kendi kendini devam ettirilebilen bir zincirleme reaksiyon olarak tanımlanmaktadır [40].

Lipid peroksidasyonu sırasında alkanlar, malondialdehit ve izoprostanlar gibi bir dizi bileşik oluşmaktadır. Bu bileşikler ise lipid peroksidasyonunun tahlilinde belirteçler olarak kullanılmaktadır. Diyabet, iskemi reperfüzyon ve nörodejeneratif hastalıklar gibi pek çok hastalıkta, bu belirteçlerden yararlanılarak lipid peroksidasyonunun tayini yapılabilmektedir [41].

2.4.2.2. Proteinler

Serbest radikal ve ROT'nin proteinlerle reaksiyona girmesi, yapısal protein ve enzimlerin yapısında hasara neden olmaktadır. Bu hasar, proteindeki spesifik bir amino asidin serbest radikal tarafından modifikasyonu, serbest radikal aracılı peptid bölünmesi ve lipid peroksidasyon ürünleri ile reaksiyona giren proteinlerde çapraz bağların oluşumu gibi farklı süreçlerle oluşmaktadır [42].

Proteinlerin serbest radikaller ve ROT'inden ne ölçüde etkilendikleri içerdikleri aminoasit yapısıyla doğrudan ilişkilidir. Reaktivitelerinin yüksek olmasından dolayı özellikle sülfür grupları bulunan metiyonin ve sistein aminoasitleri ile arjinin ve histidin gibi aromatik aminoasitler içeren proteinler, oksidasyona karşı daha savunmasızdır. Oksidasyon, protein yapısında parçalanma ve birikmelere neden olduğunda geri dönüşümsüzdür. Ancak, kükürt içeren kısımlarda; özellikle sistein kalıntılarında meydana gelen oksidasyon geri dönüşümlüdür. Sistein kalıntıları okside olan proteinler disülfid redüktazlar ve metionin sülfoksit redüktazlar tarafından yeniden eski haline dönüştürülebilmektedir [43].

Oksidatif olarak hasar görmüş proteinlerin ürünleri, membrana ve birçok hücrel fonksiyona zarar verebilecek çok reaktif gruplar içerebilmektedir. Özellikle hidroksil radikali ve süperoksit radikali gibi serbest radikaller ile singlet oksijen ve H₂O₂ gibi ROT, farklı amino asitleri oksidasyona uğratarak, proteinlerin denatüre olmasına, enzim aktivitesinin bozulmasına, hücre içi sinyal iletimin aksamasına, proteoliz duyarlılığının bozulmasına, reseptörlerde ve taşıma proteinlerinde fonksiyon kaybına neden olmaktadır [35].

Genel olarak görece daha kararlı okside proteinlerin çoğu antioksidan enzimler tarafından hızla uzaklaştırılmakta ve insan vücuduna herhangi bir etkisi bulunmamaktadır. Ancak protein hidroperoksitler gibi kararsız oksitlenmiş ürünler, geçiş metalleri ile etkileşerek daha fazla radikal üretimine yol açmakta ve yavaş yavaş birikerek çeşitli hastalıklara neden olmaktadır [30].

2.4.2.3. DNA

DNA'da bulunan pürin ve pirimidin bazları, deoksiriboz şekeri ve çift sarmal yapı serbest radikallere karşı oldukça hassastır. Bu sebeple yüksek dozda serbest radikaller ve ROT, nükleik asitlere oksidatif hasar verebilmektedir. Özellikle hidroksil radikali (OH[•]) DNA

ile reaksiyona girdiğinde pirimidin bazının C4-C5 çift bağından hidrojen (H⁺) kopararak hidantoin, 5-hidroksideoksiüridin, timin glikol ve urasil glikol gibi yan ürünlerin oluşumuna neden olmaktadır [44].

Benzer şekilde, pürinlerin oksidasyonu formamidopirimidinler, 8-hidroksi deoksiguanozin ve 8-hidroksi deoksiadenosin gibi yan ürünlerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu yan ürünler ise DNA oksidasyonunun tayini için önemli belirteçler olarak kullanılmaktadır [45].

Serbest oksijen radikalleri ve ROT tarafından DNA'da oluşturulan zincir kırıkları, DNA onarımı, apoptoz, gen regülasyonu gibi birçok sürecin düzenlenmesinde yer alan poli (ADP-riboz) sentetaz enzimini aktive etmektedirler. Bu enzimin aktivasyonu ise, DNA'nın parçalanarak, hücrenin apoptoza yönlendirilmesine neden olmaktadır.

Aynı zamanda hücrede serbest radikal ve ROT üretiminin ana kaynaklarından biri mitokondri olduğu için, mitokondriyel DNA'nın tüm bu süreçlerden daha fazla etkilendiği bilinmektedir [45].

2.4.2.4. Karbonhidratlar

Karbonhidratları oluşturan disakkarit ve monosakkarit yapıları serbest radikaller ve ROT'ne karşı duyarlıdır. Özellikle hidroksil radikali monosakkaritlerde bulunan karbon atomlarından hidrojen kopararak okzalaldehytler ve süperoksitler gibi ikincil karbon merkezli radikaller oluşturmaktadır. Bu ikincil radikallerin ise yalnızca karbonhidratların yapısını bozmakla kalmayıp, hyalüronik asitte zincir kırılmalarına ve DNA, RNA ve proteinlerin yapısında değişikliklere neden olmaktadır [46].

2.5. Antioksidan Savunma Sistemi

Hücrelerin, dokuların ve hücre dışı matriksin reaktif türlerin zararlı etkilerine maruz kalması, bir dizi reaksiyona neden olmaktadır. Bu reaksiyonlar ise reaktif türlerin ortadan kaldırılmasını sağlayan çoklu iç savunma mekanizmalarının aktivasyonunu indüklemektedir. Biyomolekülleri serbest radikaller ve ROT'nin bu zararlı etkilerinden korumak için hücrede, farklı antioksidan moleküller ve enzimlerden oluşan bir antioksidan savunma sistemi bulunmaktadır [8]. Antioksidan, hedef molekülün oksidatif hasarını önleyebilen, azaltabilen, ortadan kaldıracı veya onarabilen bir molekül olarak tanımlanmaktadır. Antioksidan savunma sistemi ise serbest radikal oluşumunun

inhibisyonunu, serbest radikal üretiminin katalizi için gerekli olan redoks-aktif metal iyonlarının bağlanması ve antioksidan savunma etkisinin regülasyonunu sağlayan bir savunma mekanizmasını tanımlamaktadır [30].

Hücreler tarafından serbest radikallerin elimine edilmesi birbiriyle ilişkili birkaç karmaşık süreç tarafından gerçekleştirilmektedir. Antioksidanlar etkilerini reaktiflere hidrojen ya da elektron vererek, enzim yapıda olan antioksidanların yapısına katılarak, bazı geçiş metallerini yakalayarak ve buna benzer çeşitli yollarla gösterebilmektedirler [31].

Temel olarak antioksidanların etki mekanizması şu şekildedir:

Koruyucu/Önleyici Etki: İlk savunma hattında bulunan antioksidanların etkisi biyomoleküllerin reaktif türlerle reaksiyona girmesini önlemeye yöneliktir. Bunun için antioksidanlar reaktiflere bağlanıp zincirlerini kırarak onları etkisiz hale getirmektedirler.

İnaktive Edici Etki: İkinci savunma hattında bulunan antioksidanların etkisi reaktif türleri inaktive ederek biyomoleküllerin korunmasına yöneliktir. Bunun için antioksidanlar, reaktif türlere bir hidrojen atomu vererek onların kararlı hale geçişini sağlamaktadırlar.

Onarıcı Etki: Üçüncü savunma hattında bulunan antioksidanların etkisi, reaktif türler tarafından biyomoleküllerde oluşan yapısal hasarın onarılmasına yöneliktir.

İnsan vücudunda, doğal olarak var olan ve gıdalar veya diyet takviyeleri yoluyla alınan çok çeşitli antioksidanlar bulunmaktadır [35].

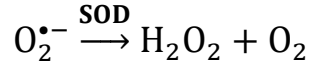
Bu antioksidanlar doğal antioksidanlar olarak sınıflandırılmaktadır. Bunlar dışında sentetik olarak üretilen çeşitli antioksidanlar da bulunmaktadır. Doğal antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere iki grupta incelenmektedir.

2.5.1. Enzimatik Antioksidanlar

Tüm hücrelerde doğal olarak ROT ve serbest radikal dengesini sağlamak ve biyomolekülleri oksidatif hasardan korumak için antioksidan enzimler bulunmaktadır. Bu enzimler, hasarlı DNA ve proteinleri onarabilmekte, oksitlenmiş lipidlere karşı savaşılabilmekte, peroksil lipid radikallerinin zincir yayılmasını durdurabilmekte ve hasarlı hücre zarlarını ve moleküllerini onarabilmektedir [47].

2.5.1.1. Süperoksit Dismutazlar (SOD)

Süperoksit dismutazlar, süperoksit radikalının hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu katalize eden metalloproteinler olarak görev almaktadır (Şekil 2.3.) [37].



Şekil 2.3. Süperoksit dismutazın etkisi [37]

Bu reaksiyon hücrede kendiliğinden gerçekleşse de SOD ile katalizlenen bu reaksiyonun hızının, kendiliğinden gerçekleşen reaksiyon hızından 4000 kat daha hızlı olduğu bilinmektedir. Bu da süperoksit radikalının biyomoleküllere verebileceği hasarın önlenmesi adına, etkisiz hale getirilmesindeki en hızlı yollardan biri olarak gözükmektedir [48].

SOD'ların aktif bölgelerinde bulunan geçiş metal iyonuna bağlı olarak bakır, çinko süperoksit dismutaz (Cu,Zn-SOD ya da SOD1), mangan süperoksit dismutaz (MnSOD ya da SOD2) ve hücre dışı süperoksit dismutaz (ECSOD ya da SOD3) olmak üzere üç farklı izoenzim formu bulunmaktadır [6].

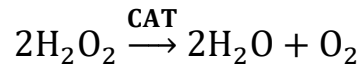
SOD1, temelde sitozolik bir enzim olup, tüm hücre tiplerinde oldukça yaygındır. Enzimin her bir alt birimi, yapısal destek görevi gören bir Zn, katalitik bir Cu ve temel bir disülfid bağı içermektedir [8].

SOD2, temelde mitokondriyal matrikste bulunan bir enzimdir. Bu sebeple matirks içinde ETS tarafından üretilen süperoksitin detoksifikasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Enzim, her alt biriminde bir Mn'ye sahip bir homotetramerdir. SOD2 geni inhibe edilen transgenik farelerde yapılan çalışmalarda ölü doğum gözlemlendiği için, SOD2'nin mitokondri fonksiyonunun devamı için önemli bir yeri olduğu bilinmektedir [9].

SOD3, tıpkı SOD1 gibi aktif bölgesinde Cu ve Zn içeren ana hücre dışı antioksidan enzimdir. Özellikle vasküler düz kas hücreleri tarafından sentezlendiği bilinmektedir. Bu sebeple özellikle vasküler kaynaklı hastalıkların patofizyolojisinde önemlidir [31].

2.5.1.2. Katalaz (CAT)

Katalaz bir reaktif oksijen türü olan hidrojen peroksitin, su ve oksijene dismutasyonunu katalizleyen, dört adet hem grubu içeren homotetramerik bir enzimdir (Şekil 2.4.) [3]. H₂O₂ molekülü çok çeşitli reaksiyonlar sırasında oluşup, diğer reaktiflerin üretimini de tetiklediği için birikimine izin verilmeden hızlı bir şekilde parçalanması hücre canlılığı için önemlidir. Katalaz enziminin dakika yaklaşık 6 milyon H₂O₂ molekülünü su ve oksijene dönüştürebildiği bilinmektedir [8].



Şekil 2.4. Katalazın etkisi [3]

Katalaz çoğunlukla peroksizomlarda lokalize olup, tüm aerobik ökaryotlarda bulunmaktadır. Özellikle yağ asitlerinin β-oksidasyonu, glioksilat döngüsü ve pürin katabolizması sırasında peroksizomlarda oksidazlar tarafından üretilen hidrojen peroksitin uzaklaştırılmasında önemli bir role sahiptir [37].

Fenton ve haber-weiss reaksiyonlarında bir substrat olan hidrojen peroksitin katalaz enzimi tarafından su ve oksijene parçalanması, hücreler için en reaktif radikal olan hidroksil radikalinin oluşumunu engelleyerek, hücreyi oksidatif hasardan korumaktadır.

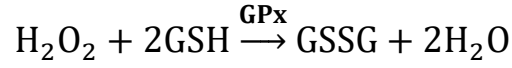
Katalaz, oksidatif doku hasarı kaynaklı çeşitli hastalıklarda önemli bir enzimdir. Örneğin, nefrektomi yapılan ve katalaz eksikliği olan farelerle yapılan bir çalışmada, bu farelerin oksidatif doku hasarına ve renal fibrozise daha duyarlı olduğu bildirilmiştir [48].

2.5.1.3. Glutatyon Sistemi

Glutatyon sistemi oldukça önemli bir hücresel antioksidan savunma sistemidir. Bu sistem redükte glutatyon (GSH) ve reaktif türleri detoksifiye eden glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon S-transferaz enzimlerinden oluşmaktadır [3].

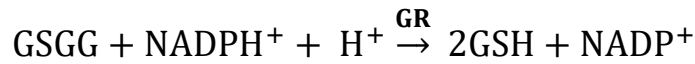
Glutatyon peroksidaz (GSH Px, GPx), GSH varlığında H₂O₂, çeşitli lipid peroksitleri ve lipid hidroperoksitlerini parçalayan, kofaktör olarak dört adet selenyum atomu bulunan tetramerik bir enzimdir. Genel olarak sitozolde bulunsa da, mitokondride de aktivite göstermektedir. Selenyum, GPx'in protein sentezi ve enzimatik aktivitesi için gereklidir.

GPx'in farklı genler tarafından kodlanan, hücresel yerleşim ve substrat bakımından farklılık gösteren en az sekiz izozimi olduğu bilinmektedir. Tüm GPx enzimleri, GSH'ı indirgeyici olarak kullanarak, hidrojen peroksitin suya indirgenmesini katalize etmektedir. Bu reaksiyon sonucunda su ve yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) oluşmaktadır (Şekil 2.5.) [4].

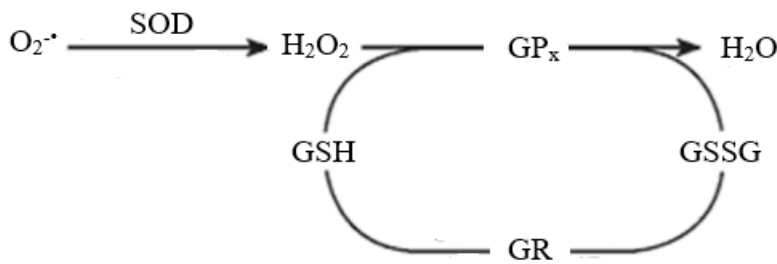


Şekil 2.5. Glutatyon peroksidazın etkisi [4]

Glutatyon redüktaz (GR) ise GSSG'nin redükte edilerek yeniden GSH formuna geçişini katalizleyen NADPH bağımlı bir enzimdir (Şekil 2.6.) [12]. GSH döngüsü (Şekil 2.7.), glutatyon sisteminin devamlılığı ve antioksidan savunma için çok önemli bir mekanizmadır. GSH/GSSG oranı, hücrenin antioksidan kapasitesini belirlemektedir [11].

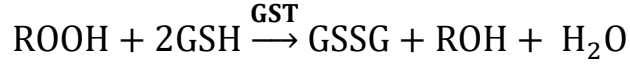


Şekil 2.6. Glutatyon redüktazın etkisi [12]



Şekil 2.7. Glutatyon döngüsü [11]

Glutatyon-S-Transferaz (GST), lineolat ve araşidonik asit gibi lipit hidroperoksitlere karşı tıpkı GSH-Px aktivitesi gibi ancak selenyumdan bağımsız olarak bir savunma sistemi sağlamaktadır (Şekil 2.8.) [48].



Şekil 2.8. Glutatyon-S-transferazın etkisi [48]

2.5.1.4. Diğer Antioksidan Enzimler

Süperoksit dismutazlar, katalaz ve glutatyon sistemi dışında, glutaredoksinler, mitokondriyel sitokrom oksidaz ve tiyol içeren birkaç enzim grubu da yine antioksidan savunma sisteminde yer alan enzimlerdir [47].

2.5.2. Enzimatik Olmayan Metabolik Antioksidanlar

Serbest radikal ve ROT'ne karşı birinci savunma hattında yer alan enzimatik olmayan antioksidanlar koruyucu/önleyici etkiye sahiptir [35]. Özellikle kan plazmasındaki seruloplazmin, ferritin, transferrin ve albümin bu tarz antioksidanlara örnektir. Bu proteinler, geçiş metal iyonlarını bağlayıp yeni reaktif türlerin oluşumunu engelleyerek işlev göstermektedirler [21].

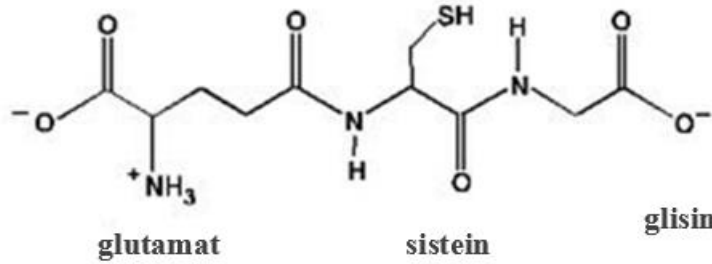
2.5.2.1. Metal Bağlayıcı Proteinler (MBP)

Tanımlanan ilk endojen antioksidanlar metal bağlayıcı proteinler (MBP'ler)'dir. MBP'ler özellikle kan plazmasının antioksidan kapasitesine katkı sağlamaktadır. Antioksidatif etkilerini metal iyonlarını bağlayarak göstermektedirler [21].

Özellikle bakır ve demir gibi geçiş metallerinin varlığında hidrojen peroksitin parçalanarak, hidroksil radikale dönüştüğü fenton reaksiyonunun baskılanmasında MBP'ler etkilidir. Örneğin transferrin, ferritin ve laktoferrin gibi MBP'ler, fenton reaksiyonunda ferröz formundaki demir iyonunu (Fe^{+2}) bağlayarak reaksiyonu baskılayabilmektedirler. Buna karşılık, seruloplazmin, hem bakır hem de demir iyonlarını bağlayarak, oksidatif zincir kırıcı bir antioksidan olarak hareket etmektedir. Albümin ise demir ve bakır iyonlarını bağlayan ve aynı zamanda hidroksil radikali ile reaksiyona girerek hücreyi oksidatif hasardan koruyan çok işlevli bir antioksidatif proteindir. Miyogloblin de esas olarak nitrik oksiti etkisiz hale getiren bir antioksidandır [49].

2.5.2.2. Glutasyon

Glutasyon, glisin, sistein ve glutamik asit aminoasitlerinden oluşan düşük moleküler ağırlıklı bir tripeptittir (Şekil 2.9.). Glutasyon fizyolojik koşullarda birçok farklı dokuda sentezlenmektedir, ancak; en yoğun glutasyon sentezi hepatositlerde meydana gelmektedir. İnsan vücudunda glutasyon, redükte glutasyon (GSH) ve okside glutasyon (GSSG) olarak farklı formlarda bulunabilmektedir [49]. Bir antioksidan olarak GSH, hem ROT'ne karşı çeşitli savunma hatlarında hem de hasarlı hücrelerin onarım sürecinde önemli bir rol oynamaktadır. Yapısında bulunan sistein kısmındaki tiyol grubu (-SH) tersinir şekilde hem oksitlenebilen hem de indirgenen bir ajandır. Bu tiyol grubu sayesinde non-enzimatik olarak proteinlerdeki diğer tiyol gruplarını oksidatif hasara karşı koruma yeteneğine sahiptir. Glutasyon bu şekilde hücrelerin redoks durumunun korunmasında çok önemli bir rol oynamakta, bu nedenle de en önemli hücresel antioksidanlardan biri olarak kabul edilmektedir [8].



Şekil 2.9. Glutasyon yapısı [8]

2.5.2.3. Melatonin (MEL)

Melatonin, hücre zarlarını ve kan-beyin bariyerini kolayca geçme yeteneğine sahip güçlü bir antioksidandır. MEL'in önemli işlevlerinden biri, diğer antioksidan enzimlerin aktivitesini düzenleyerek serbest radikal ve ROT oluşumunu önlemek ve azaltmaktır. MEL özellikle hidroksil radikali singlet oksijen, peroksinitrit anyon ve nitrik oksit gibi reaktifleri detoksifiye etme yeteneğiyle karakteristiktir [49].

2.5.2.4. Ürik Asit (UA)

Ürik asit (UA), pürin metabolizması sırasında üretilen düşük moleküler ağırlıklı organik bileşiklerden biridir. Kan plazmasındaki antioksidatif savunmanın üçte ikisinde rol almaktadır [35]. UA, peroksinitrit, hidroksil radikali, singlet oksijen ve lipid peroksitler gibi çeşitli ROT'nin güçlü bir detoksifiye edicisidir. Aynı zamanda demir ve bakır iyonları

ile kararlı kompleksler oluşturarak Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu gibi serbest radikal reaksiyonlarının inhibisyonunu sağlamaktadır. Bununla beraber UA, SOD1 ve SOD3 gibi antioksidan enzimlerin korunması ve modülasyonuna da katkıda bulunmaktadır [49].

2.5.2.5. Bilirubin (BIL)

Bilirubin (BIL), esas olarak hemoglobin ve diğer hem proteinlerinin bozunma ürünüdür. BIL, temel olarak tersinir bir mekanizma ile oluşmaktadır. Eritrositlerin parçalanmasından sonra, hemoglobinin hem kalıntısı enzimatik olarak hem oksijenaz (HO) tarafından biliverdin'e ayrışmakta ve biliverdin redüktaz (BVR) tarafından BIL'e indirgenmektedir [40]. BIL özellikle peroksil radikallerine karşı güçlü antioksidatif etkilere sahiptir [42].

2.5.3. Enzimatik Olmayan Eksojen Antioksidanlar

Serbest radikal ve ROT'ne karşı ikinci savunma hattında yer alan enzimatik olmayan antioksidanlar da inaktive edici etkiye sahiptir [36]. Bu antioksidanlar, serbest radikalleri ve oksidanları hızla inaktive etme yeteneği ile karakterizedirler. Özellikle vitaminler ve flavanoidler bu yolla reaktif türleri inaktive etmektedir (Çizelge 2.2.) [30].

2.5.3.1. Askorbik Asit (C Vitamini)

Askorbik asit olarak da bilinen C vitamini suda çözünebilen, kollajen, karnitin ve nörotransmitterlerin biyosentezi için gerekli bir vitamindir. Antioksidatif, anti-aterojenik, anti-kanserojen ve immünomodülatör özellikleri ile organizma için oldukça faydalıdır. C vitamini genellikle vücutta glutatyon ile reaksiyona girerek indirgenmiş formda tutulmaktadır. Antioksidatif etkisini de çoğunlukla nitrozamin oluşumunu önleyerek, H₂O₂ gibi ROT'ni indirgeyerek göstermektedir. Doğal C vitamini kaynakları ise asitli meyveler, yeşil sebzeler ve domatestir. C vitamini diyetle alınıp, vücutta depolanmadan idrar yolu ile atılsa da, günlük 2000 mg'dan fazla C vitamini alımının biyoyararlanımı düşürdüğü bildirilmiştir [50].

2.5.3.2. E Vitamini

E vitamini, yüksek antioksidan etkiye sahip yağda çözünen bir vitamindir. α , β , γ , δ tokoferol ve α , β , γ , δ tokotrienol olmak üzere sekiz adet izomeri bulunmaktadır. E vitamininin temel fonksiyonu hücreyi lipid peroksidasyonundan korumaktır [8]. α -tokoferol E vitamininin insanda en çok çalışılan formu olup, hücre zarına gömülü halde bulunmaktadır. Aynı zamanda bu formun insanda en yüksek biyoyararlanıma sahip olduğu bilinmektedir. α -tokoferol, lipid peroksidasyonu sırasında lipid radikalleri ile reaksiyona girerek yapısında bulunan hidroksil radikali sayesinde zincir kırıcı etki göstermektedir. Bu reaksiyon sonucunda α -tokoferol radikali oluşturmaktadır. Oluşan bu radikal form ise askorbik asit, retinol veya ubikinon tarafından orijinal formuna indirgenmektedir. α -tokoferolün yağda çözünür olması ise özellikle hücre membranlarını serbest radikallerin zararları etkilerinden korumaktadır [50].

2.5.3.3. Flavonoidler

Flavonoidler, çoğu bitkide bulunan polifenolik bileşiklerdir. Kimyasal yapıya göre 4000'den fazla flavonoid tanımlanmış ve bu flavonoidler flavanoller, flavanonlar, flavonlar, izoflavonlar, kateşinler olarak sınıflandırılmıştır. Güçlü antioksidatif özellikleri sayesinde insan sağlığı üzerinde faydalı etkileri olduğu bilinmektedir. Flavonoidler, süperoksit ve nitrik oksit gibi birçok reaktif türü detoksifiye etmekte, lipid radikallerini parçalayarak lipid peroksidasyonunu sonlandırmaktadır [51].

2.5.3.4. Karotenoidler

Karotenoidler, bitkilerde hem fotosenteze yardımcı olan hem de çiçek ve meyvelere renk veren bileşiklerdir. Karotenoidlerden Beta-karoten antioksidatif etkisi yüksek bir provitamindir. Vücutta retinole dönüştürülmekte ve özellikle singlet oksijenin ortadan kaldırılmasında rol oynamaktadır. Beta-karoten özellikle havuç, yeşil bitkiler, kabak, ıspanak gibi besinlerde bulunmaktadır. Diğer bir karotenoid olan likopen de reaktif türlerin parçalanmasında yüksek antioksidatif etkiye sahiptir. Likopenin ana kaynağı domatestir. Ancak, pişmiş domateste bulunan likopenin biyoyararlanımının daha yüksek olduğu bildirilmiştir [50, 51].

2.5.3.5. Selenyum (Se)

Bu tez çalışması kapsamında da kullanılan selenyum (Se), toprakta, suda, sarımsak, soğan, tahıllar, fındık, soya fasulyesi gibi bitkilerde, deniz ürünlerinde, kırmızı ette, karaciğerde ve mayada bulunan bir iz elementtir [50]. Özellikle glutatyon peroksidaz olmak üzere çeşitli antioksidan enzimlerin aktif bölgesinde yer almaktadır [3]. Bu yolla antioksidan enzimlerin aktivitesini regüle ederek antioksidatif etkisini göstermektedir. Düşük dozda antioksidan, anti kanserojen ve immünomodülatör olduğu bildirilmiştir. Ancak, günlük olarak 400 µg dozun aşılmasının, gastrointestinal bozukluklar, saç ve tırnak dökülmesi, siroz, akciğer ödemi ve ölümlü karakterize bir selenyum zehirlenmesi olan selenoza yol açabildiği bilinmektedir [52].

2.5.3.6. N-Asetil Sistein (NAC)

Bu tez çalışması kapsamında da kullanılan N-asetil sistein (NAC) esas olarak L-sisteinin aminoasidinin N-asetil türevidir ve bir tiyol molekülü olarak oldukça kararlı bir yapıya sahiptir. Reaktif biyobelirteçleri ölçülerek yapılan birkaç in vitro çalışmada, NAC uygulamasından sonra reaktif miktarının azaldığı, dolayısıyla NAC'in iyi bir antioksidan olduğu gösterilmiştir [53].

NAC antioksidan aktivitesini:

Direkt Etki: NAC belirli reaktif türlere karşı (süperoksit radikali hariç) doğrudan radikal süpürücü etki göstererek, reaktif molekülü ortadan kaldırmaktadır [54].

Dolaylı Etki: NAC, glutatyon biyosentezinde hız sınırlayıcı faktör olan sisteinin bir öncüsü olduğu için, bir antioksidan ve glutatyon sisteminin substratı olan indirgenmiş glutatyonun (GSH) miktarını arttırmaktadır. Bu şekilde NAC, GSH depolarının yenilenmesini sağlayarak, glutatyon ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin aktivitesini arttırmakta ve dolaylı olarak hücrenin reaktiflere karşı savunmasına destek olmaktadır. Buna ek olarak, endojen sistein ve GSH'nin tükenmesi ile karakterize edilen bazı koşullarda NAC'in, hidroksil radikali gibi bazı oksidan türler için doğrudan bir antioksidan ajan olarak hareket ettiği bildirilmiştir [54].

Disülfid Kırıcı Etki: NAC, disülfid kırıcı etkisiyle tiyollenmiş proteinleri parçalayarak tiyollerin serbest kalmasını sağlamaktadır. NAC'ın bu etkisi GSH ve tiyol içeren diğer antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırmaktadır [55].

Çizelge 2.2. Bazı reaktif oksijen türleri ve etkili antioksidanlar [21]

Reaktif Oksijen Türleri (ROT)	Etkili Antioksidanlar
Hidroksil Radikali	C vitamini, glutatyon, flavonoidler, lipoik asit
Süperoksit Radikali	C vitamini, glutatyon, flavonoidler, SOD
Hidrojen Peroksit	C vitamini, glutatyon, selenyum, n-asetil sistein, beta karoten, E vitamini, koenzim Q10, flavonoidler, lipoik asit
Lipit Peroksitleri	Beta karoten, E vitamini, übikinon, flavonoidler, glutatyon peroksidaz

2.5.4. Sentetik Antioksidanlar

Bu kısma kadar bahsedilen antioksidanların tamamı doğal antioksidanlardır. Ancak, çeşitli sentetik antioksidanların üretimi de yapılmaktadır [56]. Günümüzde özellikle bütillenmiş hidroksianisol, bütillenmiş hidroksitoluen, tersiyer bütül hidrokinon ve propil gallat gibi çeşitli sentetik antioksidanlar üretilmektedir. Bu antioksidanlar, serbest radikallerle etkileşerek serbest radikal zincir reaksiyonunu engelleyen sentetik fenolik bileşiklerdir. Özellikle besin maddeleri içerisine koruyucu olarak eklenmektedir [57].

2.5.5. Antioksidan Takviye Edici Gıdalar

Antioksidan takviyeleri, doğal gıdalardan ekstraksiyon veya kimyasal sentez yoluyla elde edilen bileşiklerdir. Ancak, gıdalarda bulunan antioksidanlarla bire bir aynı bileşime sahip değildirler. Bu nedenle, antioksidan takviyelerinin gıdalardaki antioksidanlarla aynı yararı sağlayıp sağlamadığı konusunda farklı görüşler bulunmaktadır. Yine de birçok ülkede antioksidan takviyesi kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır [50].

Pek çok epidemiyolojik veri, antioksidanların birçok kronik hastalık üzerinde faydalı bir etkiye sahip olabileceğini öne sürse de, kontrollü çalışmaların eksikliği, uzun vadeli etkilerin net olmayışı ve her hastalık türü için gerekli dozajların belirsizliği devam etmektedir. Ayrıca, antioksidan takviyelerinin önerilen dozun üzerinde alınması, antioksidanların pro-oksidanlar olarak hareket etmesine neden olabildiği bildirilmiştir [52].

Ancak, mesleğinden dolayı tüm gıdalara ulaşamayan askerler ya da denizciler, mide-bağırsak rahatsızlığı olan hastalar veya düşük gelir düzeyine sahip toplumlar gibi bazı özel durumlarda diyet takviyelerinin gerekli ve yararlı olabileceği bilinmektedir.

Özel bir durum olmadıkça, antioksidanların takviyelerden ziyade meyve ve sebzelerden zengin bir diyetten alınması en sağlıklı yol olarak gözükmektedir [58].

2.6. Oksidatif Stres

Organizmada biyokimyasal ve fizyolojik süreçlerin düzgün bir şekilde ilerleyebilmesi için belirli düzeyde serbest radikal ve ROT'ne ihtiyaç vardır. ROT, hücre içi sinyalleşme, hücre proliferasyonu ve immün savunma gibi fonksiyonlar için gereklidir. Sağlıklı bir organizmada serbest radikal ve ROT üretimi, antioksidan savunma sistemi tarafından belirli bir dengede tutulmaktadır (Antioksidan/ROT). Bu denge durumunda antioksidanlar, hücreyi reaktiflere karşı korumaktadır [59].

Denge durumundaki sağlıklı hücrelerde antioksidan/ROT dengesinin ROT yönünde bozulması durumu *oksidatif stres* olarak tanımlanmaktadır [60]. ROT ile reaksiyona giren endojen ve eksojen bileşiklerin artması, antioksidan üretimindeki azalmayla beraber rezervlerin tükenmesi ve antioksidan enzimlerin inaktivasyonu gibi sebepler hücrelerde oksidatif stres oluşumuna yol açmaktadır [61].

Oksidatif stres ve oksidatif hasar çoğu zaman birbiri yerine kullanılsa da, oksidatif stres potansiyel olarak hücre hasarına yol açabilen bir durumken, oksidatif hasar; biyomoleküllerde oksidatif stres sonucu oluşan hasarı tanımlamaktadır. Özellikle ROT konsantrasyonunun geçici veya kronik olarak artıp hücrel metabolizmayı ve metabolizma düzenlenmesini bozması sonucu hücrel bileşenler oksidatif hasar alabilmektedir [62].

Önceki kısımlarda bahsedilen ROT üretiminden sorumlu endojen ve eksojen kaynakların hepsi, antioksidan savunmanın yetersiz olduğu koşullarda oksidatif stresin de kaynağıdır. Bu nedenle ROT üretimini arttıran çeşitli hava kirleticiler, kimyasal çözücüler, pestisitler ve endojen reaksiyonlar aslında oksidatif stresi de indüklemektedir [21, 25, 27, 60].

Oksidatif stres, lipid peroksidasyonu sonucu oluşan aldehitler ve izoprostanlar, protein oksidasyonu sonucu oluşan protein karboniller ve DNA oksidasyonu sonucu oluşan baz eklentileri gibi oksitlenmiş ürünlerin birikmesiyle hücrelerde değişikliklere yol

açabilmektedir. Bu ürünler ise oksidatif stresin çeşitli hastalıklardaki rolünün saptanması için biyobelirteç olarak kullanılabilir [63].

2.6.1. Oksidatif Stres Biyobelirteçleri

Biyolojik sistemler için biyobelirteç, belirli bir durum için özgül olan ve ölçülebilen spesifik bir molekül olarak tanımlanmaktadır [63]. Oksidatif stres biyobelirteçleri, hücrede ya da dokuda meydana gelen oksidatif stresin tayini için kullanılmaktadır. Bu sayede özellikle patolojik durumlarda oksidatif stresin rolü belirlenebilmektedir [64].

Oksidatif stres belirteçleri çoğunlukla, oksidatif stresin hasar verdiği lipid, DNA ve proteinlerin oksidasyon ürünlerinden oluşmaktadır (Çizelge 2.3.). Bunun dışında azalan enzim ve antioksidan savunma da oksidatif stresin tayini için kullanılmaktadır [65].

Çizelge 2.3. Bazı oksidatif stres biyobelirteçleri [66]

OKSİDATİF STRES BİYOBELİRTEÇLERİ			
Proteinler	Lipidler	DNA	Antioksidan Kapasite
3-nitrotirozin	Malondialdehit (MDA)	8-hidroksi-deoksi-guanozin	Glutasyon
3-klorotirozin	8-izoprostaglandin	5-hidroksi-sitozin	GSH/GSSG
Ditirozin	4-hidroksi-2-nonenal	2,4-diamino-4-OH-formamidoprimidin	Süperoksit Dismutazlar (SOD)
Karbonilli proteinler	Konjuge dienler	8-hidroksi guanozin	Ferritin
SH grupları	F2-izoprostan	8-hidroksi adenin	Vitamin C

Oksidatif stres, biyomoleküllere hasar vererek tüm hücreler üzerinde çeşitli hasarlara neden olabilmektedir. Bu nedenle oksidatif stres belirteçleri diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, akciğer hastalıkları, kanser ve bu tez kapsamında da aydınlatılmaya çalışılan nörodejeneratif hastalıklar gibi çok çeşitli hastalıklarda tespit edilmiştir [67].

2.6.2. Oksidatif Stres ve Nörodejeneratif Hastalıklar

Sinir sistemi, beyin ve dolayısıyla nöronlar, oksidatif strese karşı oldukça hassastır. Bu hassaslığın temel nedenleri şu şekildedir:

- Beyindeki zar lipidlerinde ROT'ne karşı hassas ve oksidasyona eğilimli olan çoklu doymamış yağ asidi miktarı oldukça fazladır [68],
- Nöronlar diğer hücrelere kıyasla enerji üretimi için oksidatif fosforilasyonla çok daha fazla ATP üretimi yapmaktadırlar. Oksidatif fosforilasyon, yüksek miktarda ROT kaçaklarının olduğu bir reaksiyon olması nedeniyle oksidatif stres oluşumunu indüklemektedir [67],
- Beyin vücut ağırlığının sadece %5'ini oluşturmasına rağmen, solunan oksijenin yaklaşık %20'sini kullanarak yüksek oksijen konsantrasyonlarına maruz kalmaktadır. Fizyolojik koşullar altında tüketilen O₂'nin %1-2'si ROT'ne dönüştürülerek oksidatif strese yol açmaktadır [69],
- ROT oluşumu için güçlü bir katalizör görevi gören geçiş metalleri beyinde yoğunlukla bulunmaktadır. Özellikle orta beyinde dopaminerjik nöron üretimiyle karakteristik substantia nigra gibi alanlarda demir varlığı, geçiş metalleri varlığında indüklenen Fenton reaksiyonu yoluyla ROT üretimine neden olmaktadır [68],
- ROT'nin detoksifikasyona edilmesinde önemli bir rol oynayan katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimlerin beyindeki miktarının düşük ile orta düzeyde olduğu bilinmektedir [70].

Yüksek duyarlılığı ve fonksiyonel önemi nedeniyle beyin, kan-beyin bariyeri aracılığıyla korunmaktadır [71]. Kan beyin bariyeri, esas olarak mikrovasküler endotel hücreleri, astrositler, perisitler ve bazal membrandan oluşan oldukça karmaşık ve dinamik bir yapıdır. Seçici geçirgen yapısı sayesinde kandaki toksinlerin ve diğer makromoleküllerin beyne ulaşmasını engellemektedir. Oksidatif stresin perisitler ve astrositler gibi çeşitli hücre tiplerine zarar vererek, kan beyin bariyerinde hasar oluşturabildiği bildirilmiştir. Bu da çeşitli nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır [72].

Nörodejeneratif hastalıklar, beyin ve omurilikten gelen sinir hücrelerindeki hasar sonucu, nöronlarda fonksiyonel kayıp (ataksi) veya duyuşal işlev bozukluğu (demans) ile

karakterizedir [68]. Normal fizyolojik koşullarda nöronlar, homeostatik dengelerini düzenleyerek oksidan saldırılarını önleme yeteneğine sahiptir. Nörodejenerasyon oluşumu ise yanlış protein katlanmaları ve kümelenmeleri, mitokondriyel fonksiyon bozuklukları, çevresel etmenler ve genetik yatkınlık dahil olmak üzere bir dizi faktör tarafından indüklenmektedir. Bu faktörlerden biri de oksidatif strestir [20].

Nörodejeneratif hastalıklar genel olarak ilerleyen yaşla beraber ortaya çıkmaktadır. Telomer kısalması ve artan oksidatif stresin yaşlanmaya yol açan iki temel faktör olduğu düşünülmektedir. Bu da yaşlı popülasyonda nörodejeneratif hastalıkların görülme sıklığının artışı destekler niteliktedir [73].

Özellikle yaşa bağlı nörodejeneratif durumların ilerlemesi sırasında, serbest radikallerin birikimi, hücrelerin redoks dengesini koruma kapasitesinin azalması, mitokondriyal fonksiyon bozuklukları, glutamat taşıyıcıları ve nöronal glikoz taşıyıcı GLUT3'ün azalması gibi sebepler nöronal hasara yol açarak, nörodejeneratif hastalıkların oluşumunda rol oynamaktadır [68].

2.6.2.1. Oksidatif Stres ve Alzheimer Hastalığı (AH)

Alzheimer (AH), dünyada en sık görülen nörodejeneratif hastalıktır. İlerleyici hafıza bozuklukları, bilişsel bozulma ve kişilik değişiklikleri ile karakterizedir. Patolojik özellikleri neokorteks, hipokampus ve beynin diğer alt kortikal bölgelerindeki nöronların ve sinapsların kaybı; histolojik özellikleri intranöronal nörofibriller ve senil plakları (amiloid- β proteini) olarak adlandırılan hücre dışı proteinlerin birikimidir [74]. Pappolla ve ark. 1998 yılında yaptığı çalışmada, senil plağın ana bileşeni olan amiloid- β proteininin nörotoksik olduğu ve bu tür toksisitenin oluşumuna serbest radikallerin aracılık ettiği bildirilmiştir [75]. Aynı zamanda, postmortem hastalardan alınan plaklarda, sarmal filamentlerde ve beyin omurilik sıvısında yüksek seviyelerde oksitlenmiş ve nitratlanmış proteinler bulunduğu bildirilmiştir [72]. AH'daki oksidatif hasar, mitokondri ve çekirdekte artan 8-hidroksi-deoksi-guanozin gibi DNA oksidasyon ürünlerinin; 4-hidroksi-2-nonenal, malondialdehit gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin tayini yoluyla belirlenebilmektedir. Bunlar ve benzeri biyobelirteçler, AH'da oksidatif stresin etkili olduğunu göstermektedir [64, 65].

2.6.2.2. Oksidatif Stres ve Parkinson Hastalığı (PH)

Parkinson (PH), yaşlı insanlarda en sık görülen ikinci nörodejeneratif hastalıktır. PH, beynin orta bölgesindeki substantia nigra'da dopaminergik nöronlarının kaybı ve hücre içi Lewy cisimciklerinin (α -sinüklein proteinleri) birikmesi ile karakterize edilmektedir [76]. Substantia nigra içindeki nöronların karakteristik bir özelliği, metal iyonlarını, özellikle demiri biriktiren koyu kahverengi bir pigment olan nöromelaninin yaşa bağlı birikimidir. Nöromelanin içeren nöronların dejenerasyonunun PH'da daha olası olduğu düşünülmektedir [72]. Aynı zamanda dopaminin normal metabolizması sırasında ROT üretiminin gerçekleştiği bildirilmiştir. Substantia nigra'da dopaminin oksidasyon ürünleri, nöromelanini oluşturmak üzere polimerize olabilmektedir [74].

Postmortem hastalardan alınan örneklerde redükte glutatyon (GSH) seviyelerinde önemli bir azalma ve oksitlenmiş glutatyon (GSSG) seviyelerinde orta derecede bir artış gözlenmiştir. Yine postmortem çalışmalarda 4-hidroksi-2-nonenal, 8-hidroksi-2-deoksiguanosinin hidroperoksit ve malondialdehit gibi oksidatif stres biyobelirteç miktarının arttığı bildirilmiştir [72].

2.6.2.3. Oksidatif Stres ve Diğer Nörodejeneratif Hastalıklar

Alzheimer ve Parkinson hastalığı dışında farklı nörodejeneratif hastalıklarda da oksidatif stresin etkili olabileceği bildirilmiştir. Motor nöronların seçici ve ilerleyici dejenerasyonu ile karakterize edilen amyotrofik lateral skleroz hastalığında (ALS), lipid peroksidasyon ürünleri olan plazma 2-tiyobarbitürik reaktif maddelerinin yükseldiği, SOD enzim aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir [72, 10]. Özellikle striatumda ilerleyici, büyük bir nöron kaybıyla karakteristik Huntington hastalığında, striatumda demir konsantrasyonlarının yüksek seviyelere ulaştığı, bu yükselişin de oksidatif stresi indükleyerek hastalığın ilerlemesine neden olduğu bildirilmiştir [11]. Merkezi sinir sisteminde bulunan nöronların demiyelinizasyonu ile karakterize edilen Multipl Skleroz hastalığında (MS) ise, demir metabolizmasının bozulması sonucu ROT üretiminde artış olduğu, bunun sonucunda miyelin kılıfı üzerinde biriken demir plağın demiyelinizasyona neden olan bir inflamatuvar yanıtı başlattığı belirtilmiştir [1].

Sonuç olarak, birçok nörodejeneratif hastalığın oluşumunda oksidatif stresin etkili bir faktör olup, bu faktörün etkilerinin azaltılabilmesi için iyi bir antioksidan savunma sistemine ihtiyaç duyulmaktadır [77].

2.7. Nörodejeneratif Hastalıklar ve Antioksidanlar

Oksiradikallerin C vitamini, E vitamini, β -karoten gibi diyetle alınan antioksidanlar tarafından etkisiz hale getirilmesinin, nöroproteksiyonda önemli bir yaklaşım olabileceği düşünülmektedir [77]. Yapılan birkaç çalışmada diyetle ya da takviye olarak antioksidan alımının nörodejenerasyonun oluşumunu ya da ilerleyişini önlemede etkili olduğu bildirilmiştir. Bu konuda umut verici bir örnek, yüksek antioksidan özellikleriyle bilinen *Ginkgo biloba* bitkisinin Alzheimer hastalığında β -amiloid toksisitesini sınırlamasıdır [70]. Antioksidanların nörodejeneratif hastalıklara karşı etkisinde, kan-beyin bariyerinden geçiş durumu önemlidir. Antioksidanlar çok çeşitli kimyasal yapılara sahiptir ve ticari antioksidanların çoğunun terapötik kullanımı kan-beyin bariyerini geçemediklerinden sınırlıdır [71].

Çoğu antioksidan enzimin ekspresyonu, enzimatik antioksidanları kodlayan genlerdeki transkripsiyon faktörü nükleer faktör-E2 ile ilişkili faktör (Nrf2) ve antioksidan yanıt elementleri (ARE) tarafından kontrol edilmekte ve oksidatif stres tarafından indüklenmektedir. MS hastalarında, Nrf2/ARE tarafından düzenlenen antioksidanların ekspresyonunun artmasının oksidatif stresi düşürdüğü bildirilmiştir. Bu nedenle, Nrf2/ARE yolunun aktive edilerek endojen antioksidan enzimlerin indüklenmesinin ve sistemik uygulamadan sonra kan-beyin bariyerini geçebilen bir antioksidan geliştirmesinin, oksidatif stres faktörü için etkili olacağı düşünülmektedir [70].

2.8. Nöronal Hücre Hatları

In vitro araştırmalar için hücre hattı kullanımının birçok avantajı vardır [78]:

- Hücre hattında homojen bir hücre popülasyonu mevcuttur,
- Elde edilmesi oldukça kolaydır ve sıvı nitrojen içinde süresiz olarak saklanabilmektedir,
- Standart kültür ortamında kültürün devamı sağlanabilmektedir,
- Hızlı bir şekilde çoğalıp, sürekli alt kültürleri yapılarak kısa sürede çok sayıda hücre elde edilmesine olanak sağlamaktadır.

Nöronal hücrelerin *in vitro* kültürlerinin yapılması özellikle sinir sisteminin işleyişinin araştırılabilmesi açısından önem taşımaktadır. Nöronal hücrelerin kültürünün devamlılığı, olgun nöronlar hücre bölünmesine uğramadığı için oldukça zordur. Bu

nedenle nöronal tümörlerden türetilen ve ölümsüzleştirilmiş hücre hatlarının kullanımı kültürün devamlılığını kolaylaştırmaktadır [79].

Günümüzde ilaç keşfi ve çeşitli toksisite araştırmaları için in vitro model olarak kullanılan birçok nöronal hücre hattı mevcuttur. Özellikle PC12, LUHMES ve bu tez kapsamında da kullanılan SH-SY5Y gibi hatlar, in vitro çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır [80].

2.8.1. SH-SY5Y İnsan Nöroblastoma Hücre Hattı

SH-SY5Y hücre hattı, temelde SK-N-SH hücre hattının üçüncü alt kültürüdür. Esas olarak SK-N-SH hücre hattı, dört yaşındaki bir kızın metastatik kemik iliğinden alınan biyopsi örneğinden oluşturulmuştur. Nöroblastom kanser formu, küçük çocuklar arasında en yaygın kanserlerden biri olup, nöral krest hücrelerinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Sonrasında SK-N-SH hücre hattından ilk olarak SH-SY, ardından SH-SY5 ve son olarak SH-SY5Y alt kültürleri oluşturulmuştur [81].

SK-N-SH hattı, nöroblastik (N-tipi), substrata bağlı nöronal olmayan form (S-tipi) ve ara tip (I-tipi) olmak üzere morfolojik ve biyokimyasal olarak üç farklı hücre tipi içermektedir. N-tipi hücreler, kısa nöritik süreçlere sahip, zayıf şekilde bağlanmış yuvarlak hücre kümeleri olarak büyüyen nöroblastlara karşılık gelmektedir. S-tipi hücreler, büyük ve nöronal olmayan öncü hücrelere benzemektedir [82].

I-tipi hücreler ise küçük, yassı ve orta derecede yapışıklardır. Kültürde bir araya toplanma eğilimi ve bazen de küçük nöritik uzamalar göstermektedirler. SH-SY5Y hücre hattının da ikiden fazla morfolojik olarak farklı fenotipten oluştuğunu gösteren çalışmalar vardır. Örneğin, normal bir SH-SY5Y kültüründe, her ikisi de canlı olan yüzeye yapışık ve yüzen hücreler bulunmaktadır. Yapışkan ve yüzen hücreler arasındaki moleküler farklılıklar ise henüz belirlenememiştir [83].

SH-SY5Y hücre hattında özellikle farklı moleküler profillere sahip biri nöroblastik, diğeri epitel benzeri olmak üzere, iki farklı hücre tipinin varlığı biyolojik açıdan oldukça önemlidir. Nöroblastik hücreler, tirozin hidroksilaz ve dopamin- β -hidroksilazı eksprese edip, sinir büyüme faktörüne (NGF) yanıt verirken, epitel benzeri hücreler bunları yapamamaktadır [79].

SH-SY5Y hücre hattı, nörotoksinlerin özellikleri ve yeni terapötik bileşiklerin geliştirilmesi üzerine yapılan çalışmalarda, nörodejeneratif hastalıkların patogenezi ve

ilaç çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Aynı zamanda, Parkinson hastalığı modelinde en sık kullanılan hücre hatlarından biri SH-SY5Y'dir [81].

SH-SY5Y hücreler, all-trans-retinoik asit (ATRA) forbol ester 12-O-tetradekanoilforbol-13-asetat (TPA) ve farklı NGF'lerin muamelesi ile nöron benzeri hücelere farklılaştırılabilmektedir. Farklılaşma sonrasında norepinefrin, nörona özgü enolaz ve diğer nörona özgü belirteçlerin birikiminde artış olmaktadır [84].

Hem farklılaşmamış hem de farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri, in vitro çalışmalarda kullanılmaktadır [85]. Farklılaşmamış formda, SH-SY5Y hücreleri morfolojik olarak nöroblast benzeri, polarize olmayan hücre gövdeleri ve olgunlaşmamış nöronal belirteçleri ile karakterize edilmektedir. Bu hücreler, olgunlaşmamış katekolaminerjik nöronlara benzemektedir ve kümeler halinde büyümektedir [79].

SH-SY5Y hücre hattı, nörotoksisite, oksidatif stres, sinyal yolları, nörodejenerasyon ve hatta diyabetik nöropati gibi çok çeşitli araştırmalar için in vitro model olarak kullanılmaktadır [81].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. L929 Fare Fibroblast Hücre Hattı İle Doz Aralıklarının Belirlenmesi

Tez çalışması kapsamında kullanılan SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı (ATCC) sağlıklı morfolojide en fazla 15. pasaja kadar kültüre edilebilmektedir. Daha yüksek pasaj sayılarında hücre morfolojisinin değiştiği ve hücrenin sağlıklı üremediği tespit edilmiştir. Bu bağlamda Türkiye Şap Enstitüsü'nden satın alınan hücre hattının 8. pasajda olması nedeniyle, etkin doz çalışmaları hücre kültür koleksiyonunda hali hazırda var olan ve sıklıkla kullanılan L929 fare fibroblast hücre hattı (ATCC) ile yapılmıştır. L929 hücreleri, %10 oranında Fetal Sığır Serumunu (FBS) (Biowest, B.S181H-500) içeren DMEM/F12 (Biowest, B.L0092-500) besiyerinde kültüre edilmiştir. Bu hücre hattına deneyde kullanılacak oksidan ve antioksidanların geniş aralıkta dozları uygulanmış ve 24 saatlik hücre canlılığı analizi yapılmıştır. Hem hidrojen peroksitin etkin dozu bulunmuş, hem de antioksidanların tek başına hücreler üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda SH-SY5Y hücre hattındaki asıl çalışmalara başlanmıştır.

3.1.1. Hidrojen Peroksit Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Hücreler üzerinde oksidatif stres oluşturucu ajan olan hidrojen peroksit (H_2O_2) (Sigma-Aldrich, 18304-1L) su ya da besiyeri içinde hazırlanabilmektedir. Deneysel çalışmalarda hidrojen peroksit konsantrasyonları %10 FBS içeren DMEM/F12 besiyeri içerisinde hazırlanmıştır. Konsantrasyonlar daha önce literatürde yapılan farklı çalışmalar temel alınarak belirlenmiştir. Yapılan denemelerde hidrojen peroksitin taze hazırlanmadığı sürece stabil bir sonuç vermediği tespit edilmiş, bu nedenle her deneme sırasında taze olarak hazırlanmıştır.

Stok H_2O_2 'nin molaritesi 11,5 M olarak hesaplanmıştır. Bu stoktan 17,3 µl alınarak 20 ml besiyeri içerisine eklenmiş ve 10 mM'lık yeni bir stok elde edilmiştir. H_2O_2 'nin ana stoğu steril olmadığı için, yeni stok 0,22 µm'lik filtreden (ISOLAB, LB.IS.094.07.001) geçirilerek steril edilmiştir.

Bu stok üzerinden besiyeriyle bir dizi seri seyreltme yapılarak 0.1 mM ile 1 mM arasında 0.1 mM artan dozlarda 10 farklı konsantrasyon hazırlanmıştır.

3.1.2. N-Asetil Sistein Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Antioksidan ajanlardan biri olan N-asetil sistein (NAC) (SİSTECS, 300mg/ml) su ya da besiyeri içinde hazırlanabilmektedir. Deneysel çalışmalar boyunca NAC'in konsantrasyonları %10 FBS içeren DMEM/F12 besiyeri içerisinde hazırlanmıştır. Konsantrasyonlar daha önce literatürde yapılan çeşitli çalışmalar temel alınarak belirlenmiştir.

Stok NAC'in molaritesi 700 mM olarak hesaplanmıştır. Bu stok steril olup, besiyerine doğrudan eklenmiştir. Besiyeriyle yapılan bir dizi seri seyreltmelerle 0.5 mM, 1 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mM, 40 mM, 50 mM ve 100 mM olmak üzere 8 farklı konsantrasyon hazırlanmıştır.

3.1.3. Selenyum Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Antioksidan ajanlardan diğeri olan selenyumun, hücre kültürü çalışmaları için uygun olan sodyum selenit (Sigma-Aldrich, 214485) formu kullanılmıştır. Sodyum selenit de H₂O₂ ve NAC gibi su ve besiyeri içinde hazırlanabilmektedir. Deneysel çalışmalar süresince sodyum selenitin konsantrasyonları %10 FBS içeren DMEM/F12 besiyeri içerisinde hazırlanmıştır. Konsantrasyonlar daha önce literatürde yapılan farklı çalışmalar temel alınarak belirlenmiştir.

Sodyum selenit toz formda olduğu için, öncelikle tartım yapılarak bir stok çözelti hazırlanmıştır. Bunun için, 0,0432 g sodyum selenit, besiyeri içerisine eklenmiştir. Toz formun besiyerinde çözülmesini sağlamak amacıyla 1 dakika boyunca vorteksleme yapılmıştır. Toz formun tartımı steril hava kabini dışında yapıldığı için, elde edilen 25 mM'lık stok 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Besiyeriyle yapılan bir dizi seri seyreltme ile 10 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 250 nM, 500 nM, 1 mM ve 25 mM olmak üzere 8 farklı konsantrasyon hazırlanmıştır.

3.1.4. Hazırlanan Konsantrasyonların L929 Hücre Hattında Denenmesi

Hazırlanan H₂O₂, NAC ve sodyum selenit konsantrasyonlarının hücrelere uygulanması için L929 hücreleri 96 kuyucuklu kültür kabına, kuyucuk başına 1x10⁴ hücre olacak şekilde ekilmiştir. Canlı hücre sayısını belirlemek için, tripsinle süspanse hale getirilen hücrelerden 0.1 ml ve Tripan mavisi boyasından (Sigma-Aldrich, T8154) 0.1 ml alınarak Neubauer lamında hücre sayımı gerçekleştirilmiştir.

Her bir ajan üç tekrarlı olarak, belirlenen konsantrasyonlardan (Çizelge 3.1.) 100'er µl olacak şekilde hücreler üzerine eklenmiş ve 24 saat boyunca etüvde 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ oranında inkübasyon yapılmıştır (Şekil 3.1). 24. saatin sonunda yapılan tekrarlı 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) testi ile hücre canlılığındaki değişimler kaydedilmiştir. Bu denemeden elde edilen veriler, SH-SY5Y hücre hattında yapılacak olan çalışmalar için önayak olmuştur.

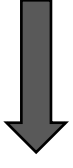
Çizelge 3.1. L929 hücre hattı için deney ve kontrol grupları

HİDROJEN PEROKSİT	
GRUPLAR	DOZLAR
1. Grup	0,1 mM
2. Grup	0,2 mM
3. Grup	0,3 mM
4. Grup	0,4 mM
5. Grup	0,5 mM
6. Grup	0,6 mM
7. Grup	0,7 mM
8. Grup	0,8 mM
9. Grup	0,9 mM
10. Grup	1 mM
Kontrol Grubu	Yalnızca Besiyeri

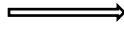
N-ASETİL SİSTEİN	
GRUPLAR	DOZLAR
1. Grup	0.5 mM
2. Grup	1 mM
3. Grup	5 mM
4. Grup	7 mM
5. Grup	10 mM
6. Grup	20 mM
7. Grup	40 mM
8. Grup	50 mM
Kontrol Grubu	Yalnızca Besiyeri

SODYUM SELENİT	
GRUPLAR	DOZLAR
1. Grup	10 nM
2. Grup	50 nM
3. Grup	100 nM
4. Grup	200 nM
5. Grup	250 nM
6. Grup	500 nM
7. Grup	1 mM
8. Grup	25 mM
Kontrol Grubu	Yalnızca Besiyeri

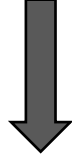
Hücrelerin Ekimi



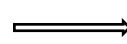
24 Saat



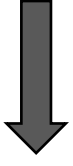
H₂O₂ Uygulamas



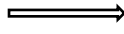
24 Saat



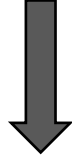
Hücrelerin Ekimi



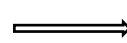
24 Saat



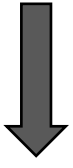
NAC Uygulamas



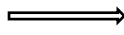
24 Saat



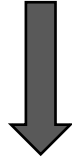
Hücrelerin Ekimi



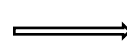
24 Saat



Sodyum Selenit Uygulamas



24 Saat

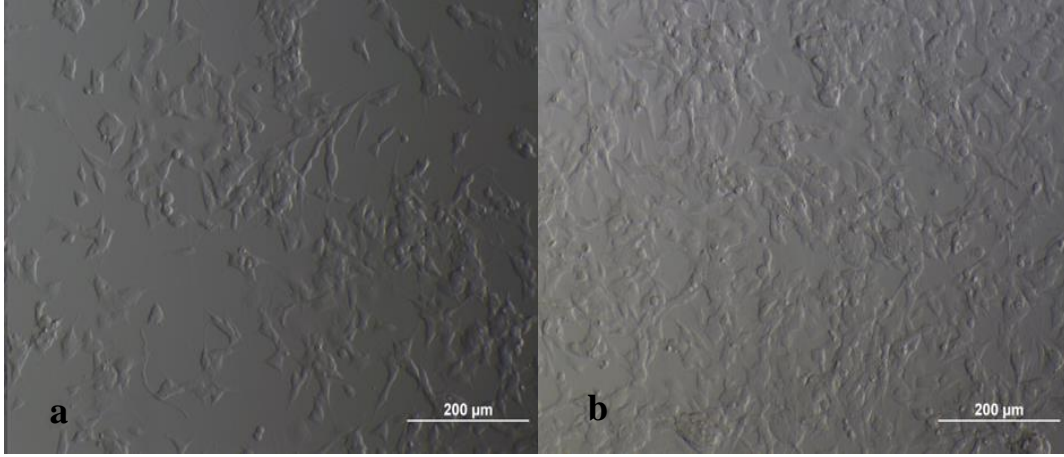


Şekil 3.1. L929 hücrelerinde deney şeması

3.2. SH-SY5Y İnsan Nöroblastoma Hücre Hattının Kültüre Edilmesi

SH-SY5Y hücre hattı (ATCC), 8. pasajda Türkiye Şap Enstitüsü'nden dondurulmuş olarak satın alınmıştır. Hücreler, deneylere başlanılmadan önce çoğaltılıp, farklı pasajlarda dondurularak stoklanmıştır.

Dondurulmuş halde satın alınan hücreler ilk olarak 37 °C'deki sıcak su banyosunda 1 dakika boyunca çözündürülmüştür. Sonrasında dondurma besiyerini uzaklaştırmak amacıyla 800 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek, steril hava kabini içinde süpernatant atılmıştır. Pelet kısmına 1 ml %20 Fetal Sığır Serum (FBS) (Biowest, B.S181H-500) içeren DMEM/F12 (Biowest, B.L0092-500) besiyeri eklenerek hücreler 25 cm²lik flaslara alınmıştır. Flask içerisine 5 ml %20 FBS içeren DMEM/F12 koyulduktan sonra homojenizasyon yapılmıştır. Flask üzerine hücrenin adı, pasaj sayısı, tarih ve araştırmacı adı yazıldıktan sonra, etüvde 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ oranında inkübasyon yapılmıştır. Hücrelerin gün aşırı besiyerleri değiştirilerek, kültürün devamlılığı sağlanmıştır. İnkübasyonun ortalama 24. saatine gelindiğinde hücreler kültür kabına tutunmuş ve yarı konfluent duruma ulaşmıştır (Şekil 3.2a.). Beşinci günün sonunda hücreler inverted mikroskop ile (Olympus IX70 Inverted Mikroskop, Japonya) morfolojik olarak incelenmiş ve flask yüzeyini tamamen kaplayan hücrelerin (Şekil 3.2b.) bir kısmı pasajlanıp, kalan kısım ise dondurularak saklanmıştır. SH-SY5Y hücrelerinin pasaj sayısının sınırlı olması nedeniyle, her pasaj sayısında mutlaka dondurarak stoklama işlemi yapılmıştır. Bu şekilde hücreler çoğaltılmış ve deney sırasında kullanılan 96 kuyucuklu kültür kaplarındaki tüm hücrelerin pasaj sayılarının aynı olması (pasaj 10) sağlanmıştır.



Şekil 3.2. SH-SY5Y hücrelerinin inkübasyonun 24. saatindeki morfolojik görüntüsü (10X) (a) SH-SY5Y hücrelerinin inkübasyonun 48. saatindeki morfolojik görüntüsü (10X) (b)

Pasajlama işlemi için besiyeri uzaklaştırılmış, 1 ml tripsinle (Biowest, B.L0930-100) bir kez yıkama yapılmıştır. Sonrasında flask içerisine 1 ml tripsin eklenerek etüvde 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ oranında 5 dakika boyunca bekletilmiştir. Kültür kabının yüzeyinden ayrılan hücreler üzerine 2 ml %20 FBS içeren DMEM/F12 besiyeri koyularak tripsinin inhibisyonu sağlanmıştır. Hücreler santrifüj tüpüne aktarılarak 800 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Steril kabinde süpernatant atılarak, hücrelerin homojenizasyonu sağlanmıştır. Hücreler yoğunluklarına göre 3 ya da 4 flaska pasajlanıp, etüvde 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ oranında inkübasyona bırakılmıştır. Her tripsin uygulaması sonrası pasaj sayısı bir arttırılmıştır. Artan hücreler ise dondurularak stok yapılmıştır.

Dondurma işlemi için pasajlama işlemindeki aynı prosedür tekrar edilmiş, santrifüj sonrası hücreler üzerine %95 oranında FBS %5 oranında dimetil sülfoksit (DMSO) içeren dondurma besiyeri eklenerek karyotüp içerisine alınmıştır. Karyotüp üzerine hücrenin adı, pasaj sayısı, tarih ve araştırmacı adı yazıldıktan sonra önce +4 °C'de birkaç dakika, daha sonra -80 °C'de bir gece bekletilip, son olarak -196°C sıvı azot tankına alınmıştır. Bu şekilde, devam eden pasajlar için de kademeli dondurma işlemi yapılarak, hücrelerin çoğaltılması ve stoklanması sağlanmıştır.

3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deney Planı

Deney aşamasında, SH-SY5Y hücresi 96 kuyucuklu kùltür kaplarına, kuyucuk başına 1×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Canlı hücre sayısını belirlemek için, tripsinizasyon işleminden sonra süspanse olarak elde edilen hücreler 0.1 ml ve tripan mavisi boyasından 0.1 ml alınarak Neubauer lamında hücre sayımı gerçekteşirilmiiştir.

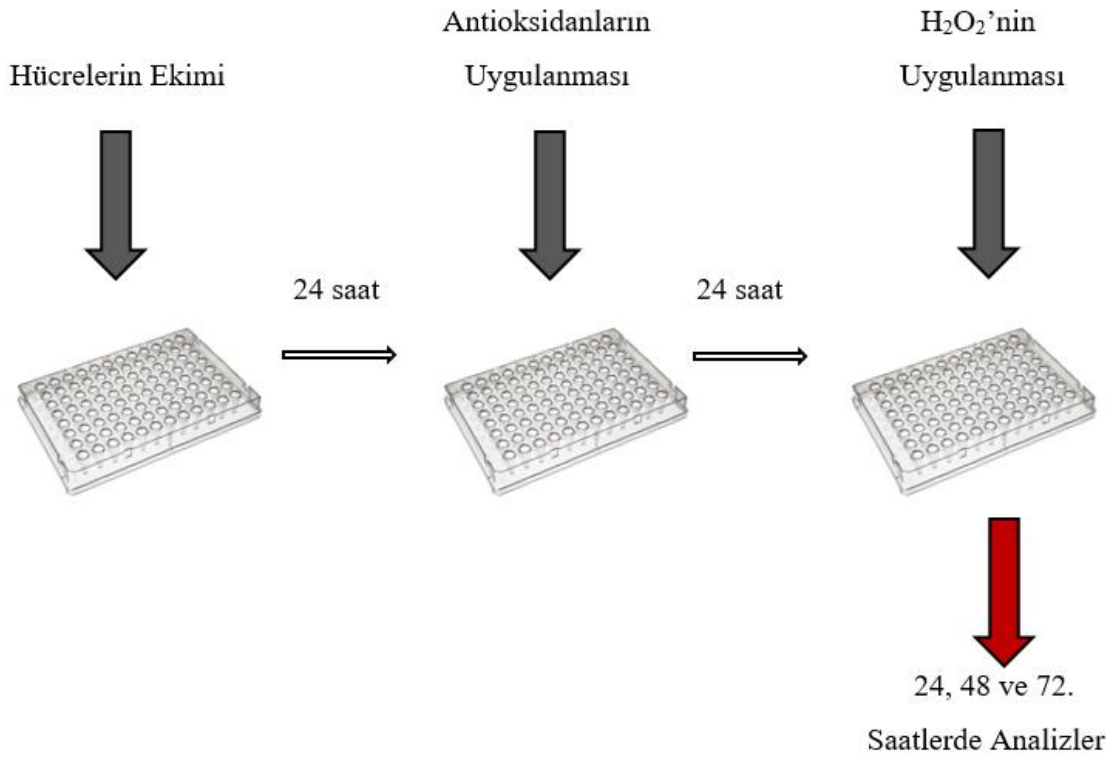
$A \times 10^4 \times 2$ (A: Neubauer lamında tüm alandaki toplam hücre sayısı) formülüyle 1 ml'de bulunan canlı hücre sayısı hesaplanmıştır.

Öncelikle H_2O_2 'nin yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonunu (IC_{50}) belirleyebilmek için SH-SY5Y hücresi 0.1 mM, 0.15 mM, 0.17 mM ve 0.2 mM konsantrasyonlarındaki H_2O_2 ile 24 saat muamele edilmiş ve hücre canlılığı analizi yapılarak, SPSS probit analizi ile IC_{50} değeri hesaplanmıştır.

NAC ve sodyum selenitin koruyucu etkilerinin belirlenebilmesi açasından hücreler NAC ve sodyum selenitin beş farklı konsantrasyonuyla 24 saat muamele edilmiştir. Bu sırada kontrol grubu ve H_2O_2 için ayrılan kuyucuklara yalnızca besiyeri koyulmuştur. 24. saatin sonunda, kontrol grubu hariç tüm gruplara 0.15 mM H_2O_2 eklenmiştir. Bu şekilde 24, 48 ve 72. saatlerde hücre canlılığı analizi yapılmış, 72. saatin sonunda ise oksidatif stres miktarı ölçülmüştür.

Çizelge 3.2. SH-SY5Y hücre hattı için deney ve kontrol grupları.

Deney Grubu	Antioksidan	H ₂ O ₂ Muamelesi ve Uygulama Süresi		
	Muamelesi ve Uygulama Süresi			
1. Grup Sodyum Selenit + H₂O₂ Grubu	24 sa. 10 nM Sodyum Selenit İçeren Besiyeri	24 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri	48 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri	72 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri
2. Grup Sodyum Selenit + H₂O₂ Grubu	24 sa. 50 nM Sodyum Selenit İçeren Besiyeri	24 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri	48 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri	72 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri
3. Grup Sodyum Selenit + H₂O₂ Grubu	24 sa. 100 nM Sodyum Selenit İçeren Besiyeri	24 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri	48 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri	72 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri
4. Grup Sodyum Selenit + H₂O₂ Grubu	24 sa. 250 nM Sodyum Selenit İçeren Besiyeri	24 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri	48 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri	72 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri
5. Grup Sodyum Selenit + H₂O₂ Grubu	24 sa. 500 nM Sodyum Selenit İçeren Besiyeri	24 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri	48 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri	72 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri
6. Grup NAC + H₂O₂ Grubu	24 sa. 0,5 mM NAC İçeren Besiyeri	24 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri	48 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri	72 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri
7. Grup NAC + H₂O₂ Grubu	24 sa. 1 mM NAC İçeren Besiyeri	24 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri	48 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri	72 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri
8. Grup NAC + H₂O₂ Grubu	24 sa. 5 mM NAC İçeren Besiyeri	24 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri	48 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri	72 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri
9. Grup NAC + H₂O₂ Grubu	24 sa. 7 mM NAC İçeren Besiyeri	24 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri	48 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri	72 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri
10. Grup NAC + H₂O₂ Grubu	24 sa. 10 mM NAC İçeren Besiyeri	24 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri	48 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri	72 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri
11. Grup Yalnızca H₂O₂ Grubu	Normal Besiyeri	24 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri	48 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri	72 sa. 0,15 mM H ₂ O ₂ İçeren Besiyeri
12. Grup Kontrol Grubu	Normal Besiyeri	24 sa. Besiyeri	48 sa. Besiyeri	72 sa. Besiyeri

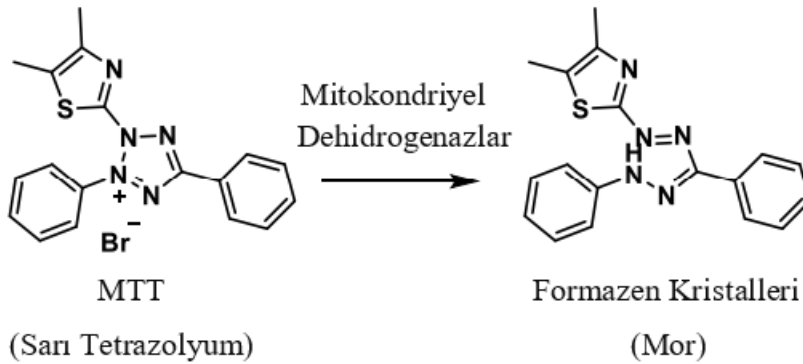


Şekil 3.3. SH-SY5Y hücrelerinde deney şeması

3.4. Deneyde Kullanılan Analiz Yöntemleri

3.4.1. 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolyum bromür (MTT) Testi

MTT testi, hücre canlılığın ölçümü için kullanılan kalorimetrik bir yöntemdir. MTT, esas olarak soluk sarı renkli bir tetrazolyum boyasıdır. Bu boya kültür ortamına koyulduğunda canlı hücrelerde bulunan mitokondriyel dehidrogenazlar tarafından indirgenmektedir. Bu indirgenme sonucunda ise mor renkli formazen kristalleri oluşmaktadır (Şekil 3.4.). Membran bütünlüğü bozulmuş, ölü hücrelerde ise mitokondriyel fonksiyonlar durduğu için tetrazolyum boyasında renk değişimi oluşmamaktadır. Sarı tetrazolyum boyasının indirgenme miktarı canlı hücre sayısına bağlı olduğundan, hücreler tarafından üretilen mor renkli formazan kristallerinin optik yoğunluğu 570 nm dalga boyunda ölçülerek, hücre canlılığının miktarı belirlenmektedir.



Şekil 3.4. Formazen kristalleri oluşumu

Çalışma boyunca hem L929 hem de SH-SY5Y hücrelerindeki deney ve kontrol grupları için MTT testi yapılmıştır. L929 hücreleriyle yapılan ön çalışmalarda antioksidanların ve H₂O₂'nin dozları geniş aralıklarda denenerek güvenli doz aralıkları bulunmuştur. SH-SY5Y hücrelerinde ise MTT testi ile öncelikle H₂O₂ için yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonu (IC₅₀) belirlenmiş, sonrasında deney gruplarıyla yapılan çalışmalarda hücre canlılığı ölçülmüştür.

MTT testi için, 96 kuyucuklu kültür kaplarından besiyeri uzaklaştırılarak, %10 oranında MTT boyası içeren serumsuz besiyeri MEM-ALPHA (Biowest, L0476) her kuyucuğa 100 µl olacak şekilde eklenmiştir. Bu şekilde hücreler dört saat boyunca etüvde 37 °C sıcaklık

ve %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir. Dördüncü saatin sonunda hücreler üzerindeki boya uzaklaştırılarak her kuyucuğa 100 µl izopropanol (Merck Millipore, 109634) eklenerek reaksiyon sonlandırılmış; hücre canlılığı 570 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda (µQuant™, BiotekW Instruments Inc). absorbans değeri olarak ölçülmüştür.

3.4.2. Akridin Orange/Propidyum İyodür (AO/PI) Floresan Boyama Yöntemi ile Hücre Canlılığının İncelenmesi

Akridin orange (Sigma, A6014) ve propidyum iyodür (Sigma, P4170) hem canlı hem de ölü hücrelerin aynı anda görüntülenebilmesi için kullanılan floresan boyalardır. AO, hücre membranından kolayca girebilen lipofilik zayıf bir baz olup, hem canlı hem de ölü hücrelerin nükleik asitlerine bağlanarak yeşil renkte floresan ışımaya yapmaktadır. PI ise, hücre membranından geçemediği için yalnızca membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerin nükleik asitlerine bağlanarak, kırmızı/turuncu renkte floresan ışımaya yapmaktadır. Böylece, hücrelerdeki renk değişimi üzerinden hücre canlılığı yüzdesi hesaplanabilmektedir.

Tez çalışmasında, H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif hasar modelinde antioksidanların hücre canlılığına etkisinin incelenebilmesi için AO/PI floresan boyama yapılmıştır. Bu boyama için 96 kuyucuklu kültür kabındaki hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak iki kere fosfat tamponlu salin (PBS) (P4417, Sigma-Aldrich) ile yıkama yapılmıştır. Sonrasında 1:1 oranında hazırlanan AO (25µg/ml) ve PI (25µg/ml) boya karışımı ile hücreler 50 saniye süre ile boyanmıştır. Boyama sonrası PBS ile tekrar iki kere yıkama yapılarak boya uzaklaştırılmıştır. Hücreler, 520 nm dalga boyunda floresan ışık altında inverted mikroskopta (Olympus IX70 Inverted Mikroskop, Japonya) FITC filtresinde incelenerek görüntülenmiştir. Bu görüntülerde, membran bütünlüğü bozulmamış, normal morfolojiye sahip yeşil renkli hücreler canlı; membran bütünlüğü bozularak normal morfolojiden uzaklaşmış turuncu renkli hücreler ise ölü hücre olarak sayıma dahil edilmiştir. Belirlenen sayım alanında yukarıda belirtilen renk dağılımına göre canlı ve ölü hücre sayıları bulunarak % canlılık oranı hesaplanmıştır (Çizelge 3.3).

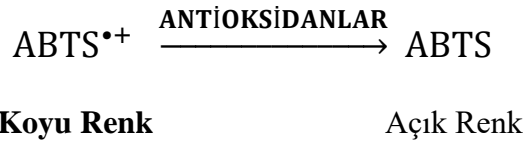
Çizelge 3.3. Canlı ve ölü hücre sayısının hesaplanması

$$\% \text{Canlı Hücre Sayısı} = \frac{\text{Canlı hücre sayısı (yeşil renkli hücreler)}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100$$

$$\% \text{Ölü Hücre sayısı} = \frac{\text{Ölü hücre sayısı (kırmızı ve turuncu renkli hücreler)}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100$$

3.4.3. Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAS) Tayini

Toplam antioksidan kapasitesi, TAS ELISA kiti (TAS, Rel Assay Diagnostics) kullanılarak ölçülmüştür. Bu kit, radikal bir katyon olan 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS^{•+})'in antioksidanlar tarafından ABTS^{•+}ye redüksiyonu ilkesine dayanmaktadır. Koyu mavi/yeşil rengi ile karakteristik ABTS^{•+} molekülü, antioksidanlar tarafından indirgendiği zaman koyu renk açılmaktadır (Şekil 3.5.). İndirgenme miktarı, renk değişimi ve absorbans, antioksidan miktarına bağlı olarak değişmektedir. Testin kalibrasyonu için ise bir E vitamini analogu olan Trolox kullanılmaktadır [94].

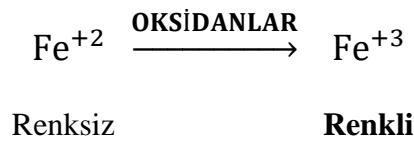


Şekil 3.5. ABTS^{•+}'de renk değişimi

TAS tayini için, deney ve kontrol gruplarının besiyerleri toplanarak, kitte bulunan reaktifler ile karıştırılmış ve 620 nm'de ELISA okuyucuda (µQuantTM, BiotekW Instruments Inc) iki ayrı absorbans ölçümü yapılmıştır. Son absorbans değerinden ilk absorbans değerinin çıkarılmasıyla elde edilen delta (Δ) değerleriyle, kitte belirtilen şekilde toplam antioksidan kapasitesi mmol Trolox Eq/L olarak hesaplanmıştır.

3.4.4. Toplam Oksidan Kapasitesi (TOS) Tayini

Toplam oksidan kapasitesi, TOS ELISA kiti (TAS, Rel Assay Diagnostics) kullanılarak hesaplanmıştır. Bu kit, ferröz formdaki demir iyonunun (Fe^{+2}) oksidanlar tarafından ferrik formdaki demir iyonuna (Fe^{+3}) oksidasyonu ilkesine dayanmaktadır. Oksidasyonla beraber artan Fe^{+3} iyonu, kit içeriğinde bulunan kromojen ile birleşerek renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Bu renk değişimi, toplam oksidan miktarıyla doğru orantılı olarak değişmektedir. Testin kalibrasyonu için ise bir reaktif oksijen türü olan H_2O_2 kullanılmıştır [95].



Şekil 3.6. TOS kitindeki renk değişimi

TOS tayini için, deney ve kontrol gruplarının besiyerleri toplanarak, kitte bulunan reaktifler ile karıştırılmış ve 570 nm'de ELISA okuyucuda (μ QuantTM, BiotekW Instruments Inc) iki ayrı absorbans ölçümü yapılmıştır. Son absorbans değerinden ilk absorbans değerinin çıkarılmasıyla elde edilen delta (Δ) değerleriyle, kitte belirtilen şekilde toplam antioksidan kapasitesi μ mol H_2O_2 Eq/L olarak hesaplanmıştır.

3.4.5. Oksidatif Stres İndeksinin (OSİ) Belirlenmesi

Oksidatif stres indeksi, toplam oksidan kapasitesinin, toplam antioksidan kapasitesine oranı ile belirlenmektedir (TOS/TAS). Bunun için öncelikle mmol Trolox Eq/L cinsinden hesaplanan TAS sonuçları μ mol Trolox Eq/L'e çevrilmiştir. Sonrasında TOS ve TAS oranları oksidatif stres indeksi belirlenmiştir.

3.5. İstatistiksel Analizler

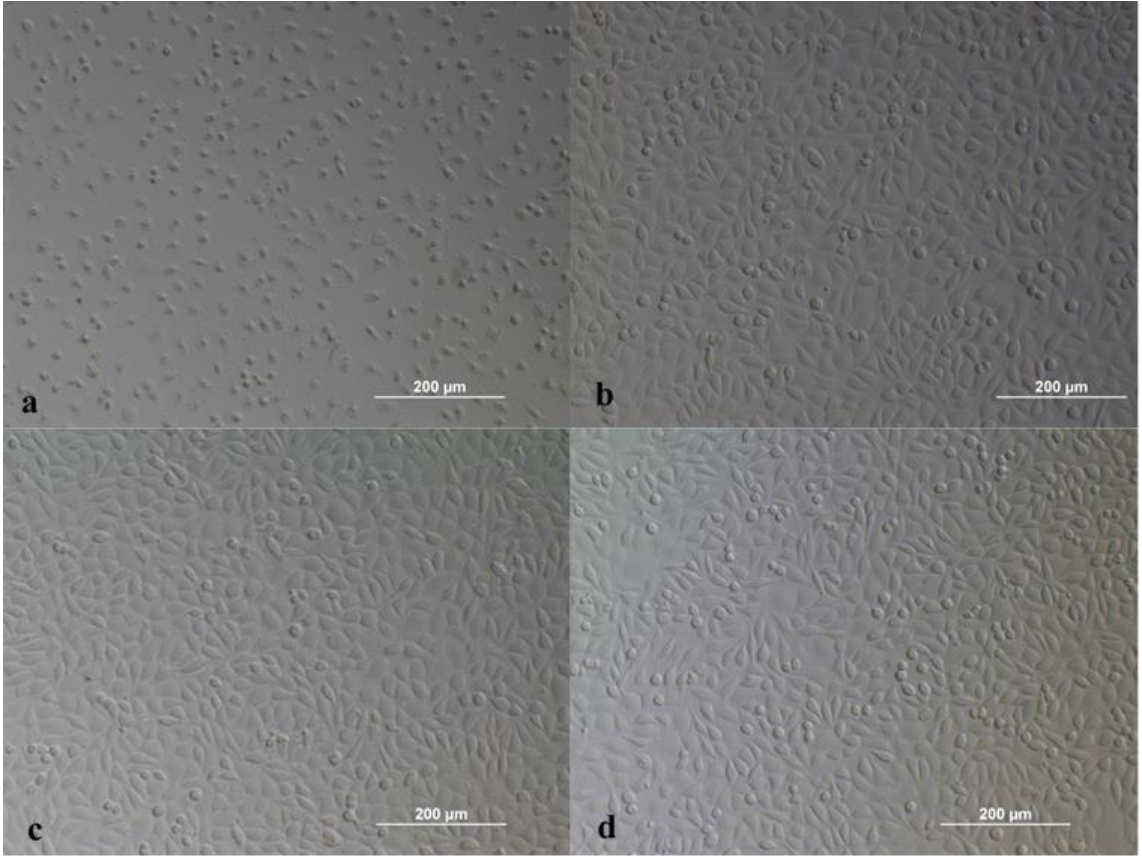
Tez çalışmasındaki analizler, bir set içinde sekiz tekrar ve her bir set için de üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Elde edilen verilerin istatistiği, IBM SPSS Statistics 23 programı aracılığıyla yapılmıştır. Ön denemelerde zaman sabit olup yalnızca uygulama dozları değiştiği için gruplar arasındaki farklılık, parametrik olmayan Mann Whitney U

testi ile yapılmıştır. SH-SY5Y hücre hattında yapılan denemelerde ise zaman ve doza bağlı değişimler için parametrik olmayan Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Yine gruplar arasındaki farklılık parametrik olmayan Mann Whitney U testi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre anlamlılık değeri $p < 0,05$ olan veriler, istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

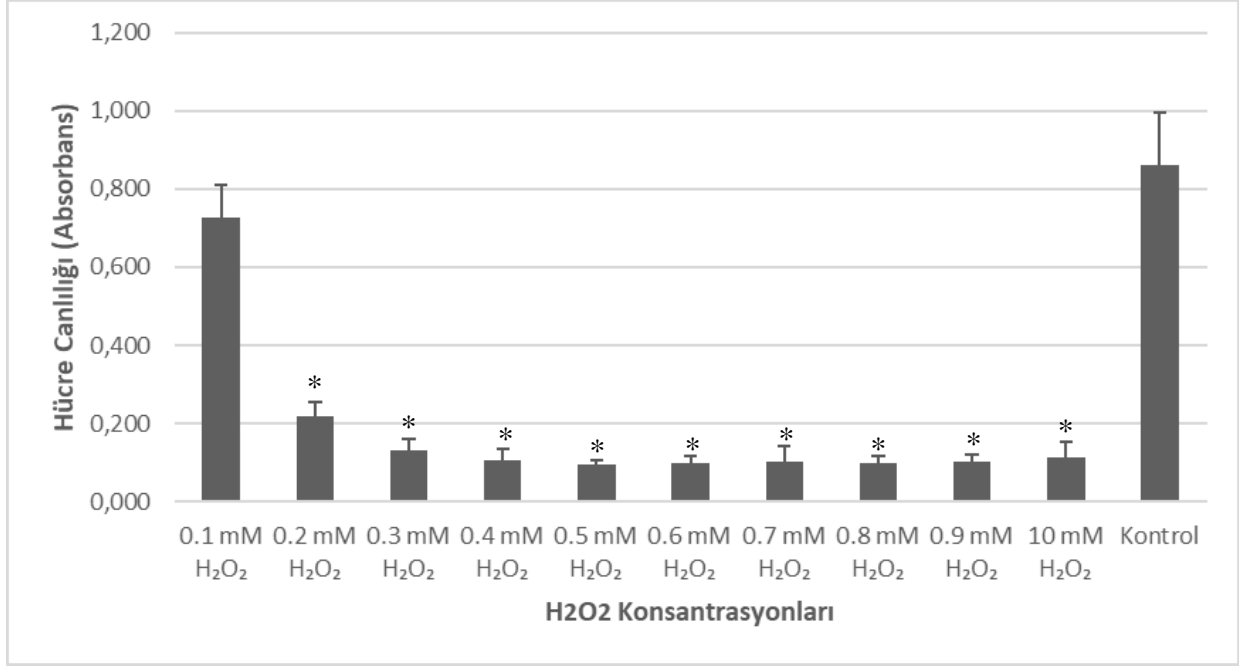
4.1. L929 Fare Fibroblast Hücre Hattında Doz Aralıklarının Sonuçları

Bu aşamada, L929 hücreleri H_2O_2 , sodyum selenit ve NAC'ın farklı konsantrasyonları ile 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve 24. saatin sonunda hücreler morfolojik olarak incelenerek görüntülenmiştir (Şekil 4.1.). Sonrasında MTT testiyle hücre canlılığı analizi yapılmıştır.



Şekil 4.1. İnkübasyonun 24. satinde H_2O_2 , sodyum selenit ve NAC ile muamele sonrası L929 hücrelerinin morfolojik görüntüsü (10X) H_2O_2 (a), Sodyum selenit (b), NAC (c), kontrol (d)

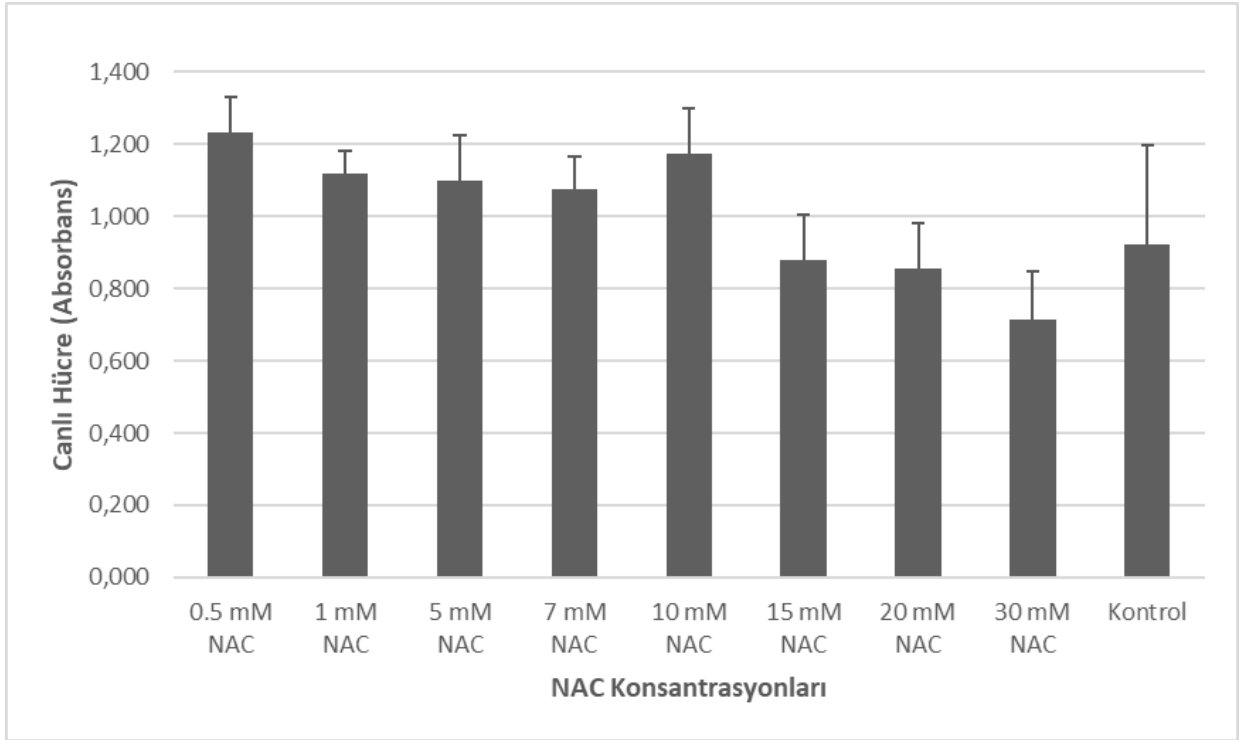
L929 hücreleri ile yapılan bu MTT testi sonucunda, H₂O₂'nin 0.1 mM dozu haricindeki tüm dozların hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı ve kontrolden anlamlı derecede farklı olduğu (p<0,05) bulunmuştur (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. L929 hücrelerinde H₂O₂ uygulaması sonrası MTT testi sonuçları

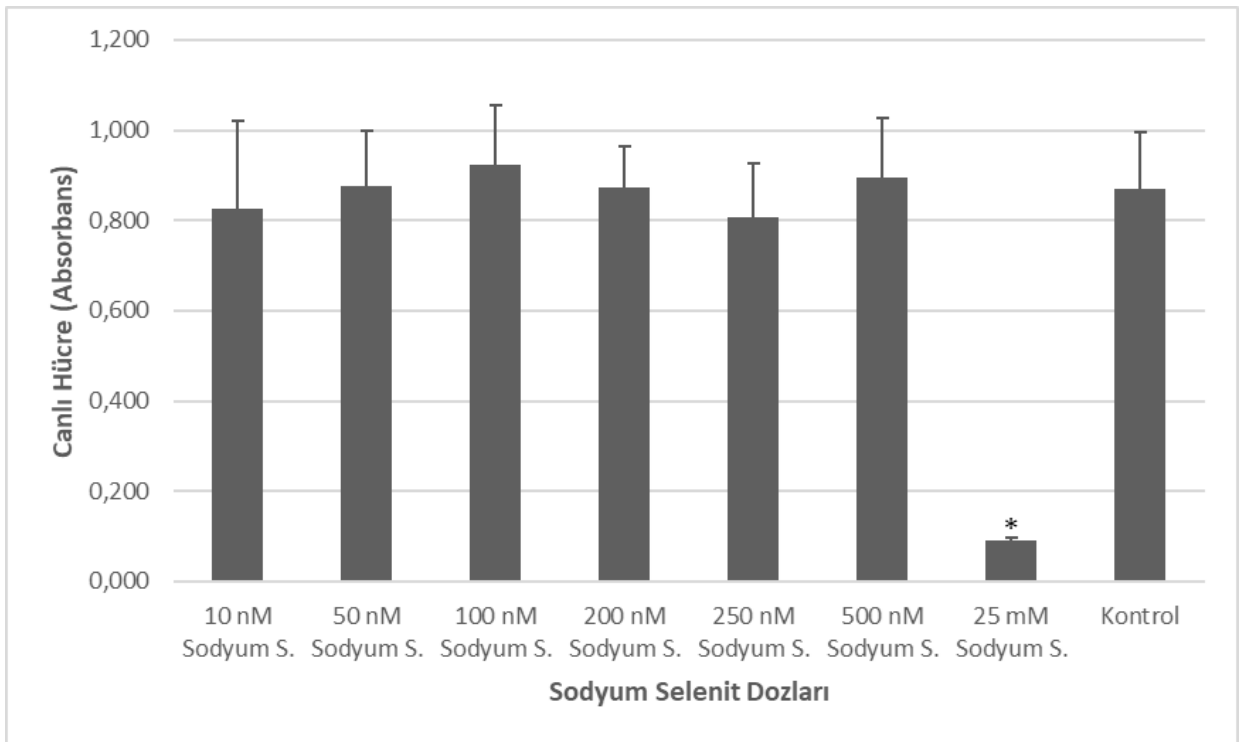
* Kontrol grubundan anlamlı derecede farklılık (p<0,05)

L929 hücreleri ile yapılan bu MTT testi sonucunda, NAC için denenilen dozların hiçbiri kontrolden anlamlı derecede farklı çıkmamıştır. (Şekil 4.3.) Bu sonuca göre NAC için belirlenen doz aralıklarının hücreler için herhangi bir toksik etkisinin olmadığı belirlenmiş ve SH-SY5Y hücre hattında yapılan çalışmalarda bu güvenli doz aralıkları kullanılmıştır.



Şekil 4.3. L929 hücrelerinde NAC uygulaması sonrası MTT testi sonuçları

L929 hücreleri ile yapılan bu MTT testi sonucunda sodyum selenit için denenen dozlarda ise yalnızca 25 mM dozu kontrolden anlamlı derecede farklı ($p<0,05$) çıkmıştır. Bu doz haricindeki diğer dozların hücreler için herhangi bir toksik etkisinin olmadığı belirlenmiş ve yüksek doz sodyum selenitin hücreler için toksik olabileceği tespit edilmiştir. SH-SY5Y hücre hattında yapılan çalışmalarda bu güvenli doz aralıkları kullanılmıştır.

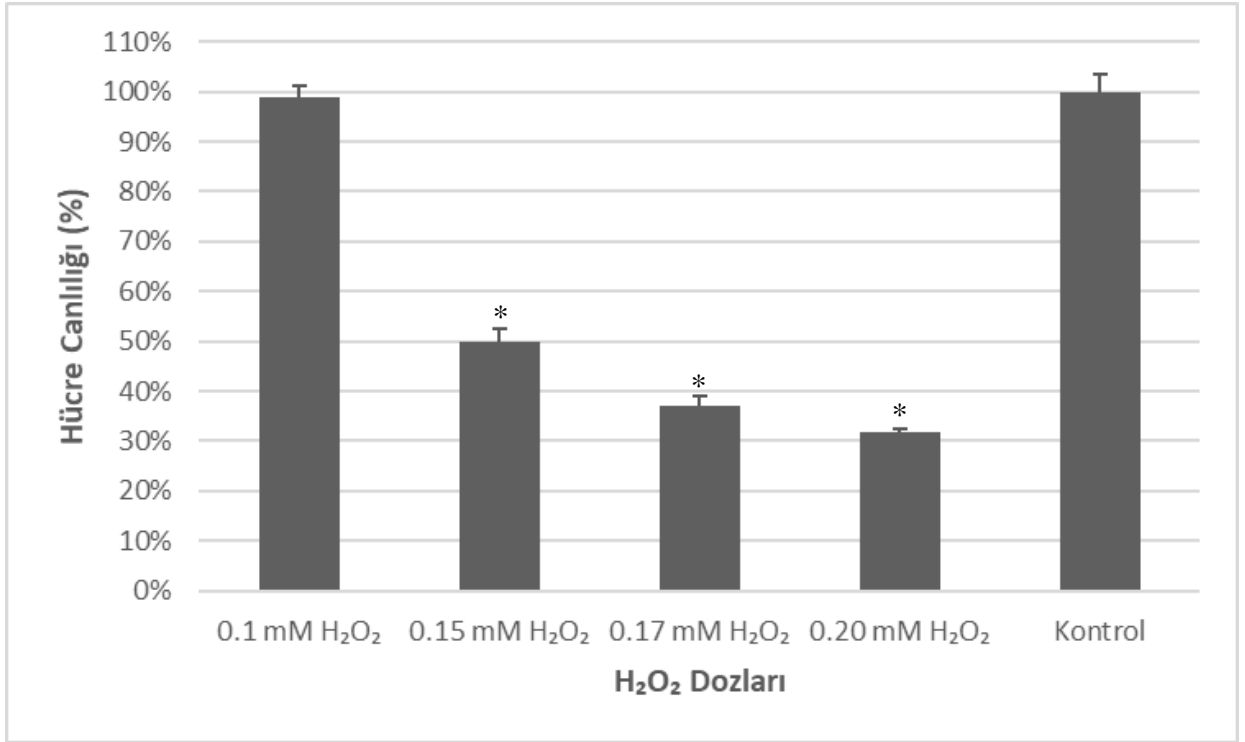


Şekil 4.4. L929 hücrelerinde sodyum selenit uygulaması sonrası MTT testi sonuçları

* Kontrol grubundan anlamlı derecede farklılık ($p<0,05$)

4.2. SH-SY5Y Hücre Hattında Hidrojen Peroksit İçin IC₅₀ Değeri Belirlenmesi

SH-SY5Y hücrelerinde oksidatif stres oluşturmak için kullanılan H₂O₂'nin IC₅₀ dozu, L929 hücrelerinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda belirlenmiştir. Yapılan MTT testi sonucu L929 hücrelerinde 0.1 mM H₂O₂'nin kontrolle benzer sonuç verdiği, 0.2 mM H₂O₂'nin ise hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. Bu nedenle 0.1 mM ile 0.2 mM arasında 0.15 mM, 0.17 mM ve 0.20 mM H₂O₂ dozları denenmiştir. Her üç doz da kontrolden anlamlı derecede farklı bulunmuştur (Şekil 4.4.). H₂O₂ için IC₅₀ değeri ise 0.15 mM olarak hesaplanmıştır. Bu aşamadan sonraki tüm deneysel çalışmalar için H₂O₂ dozu 0.15 mM olarak kullanılmıştır.

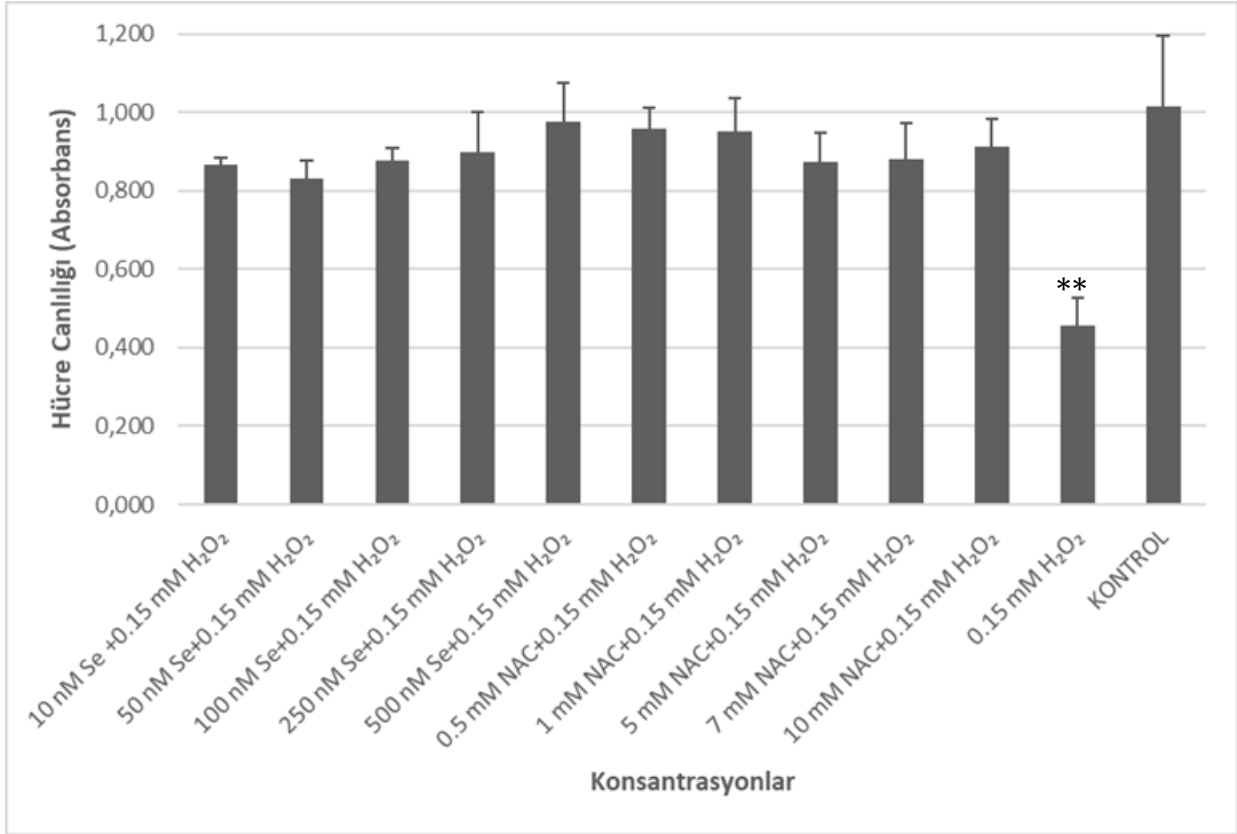


Şekil 4.5. SH-SY5Y hücrelerinde H₂O₂ uygulaması sonrası MTT testi sonuçları

* Kontrol grubundan anlamlı derecede farklılık (p<0.05)

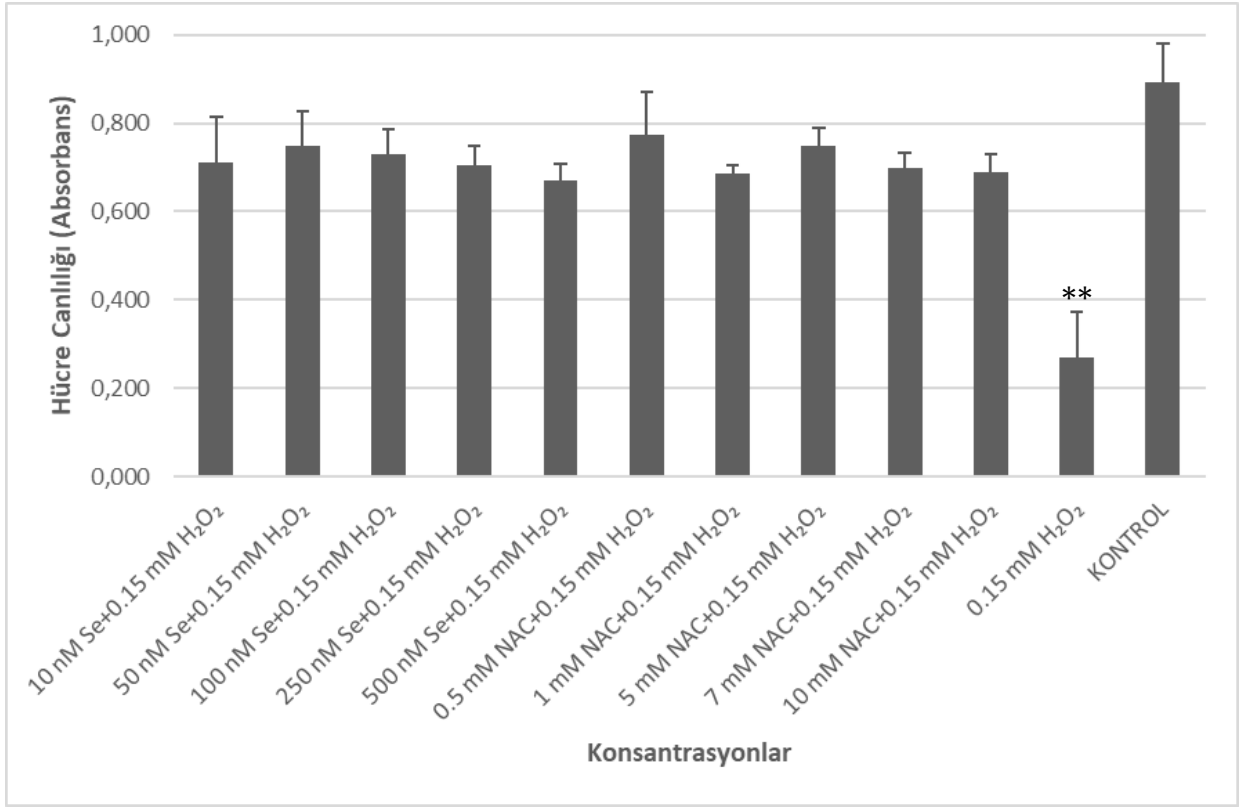
4.3. SH-SY5Y Hücrelerinde MTT Analizi Sonuçları

Yapılan MTT testinin sonuçlarına göre, inkübasyonun 24., 48. ve 72. saatlerinde H₂O₂ uygulanan grupta hücre canlılığının anlamlı derecede azaldığı (p<0.05) belirlenmiştir (Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7.). 'H₂O₂+antioksidan' uygulanan tüm gruplarda ise hücre canlılığı, H₂O₂ uygulanan gruba göre anlamlı derecede daha yüksek (p<0.05) bulunmuştur. 'H₂O₂+antioksidan' uygulanan grupların kendi içlerinde hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05). Bu durumda her iki antioksidanın da benzer etkilere sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Sonuçlara göre kullanılan tüm antioksidan dozları IC₅₀ dozundaki H₂O₂'ye karşı koruyucu etki göstermiş, böylece NAC ve sodyum selenit uygulamasının SH-SY5Y hücrelerini H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif hasara karşı koruyucu rolünün olduğu gösterilmiştir.



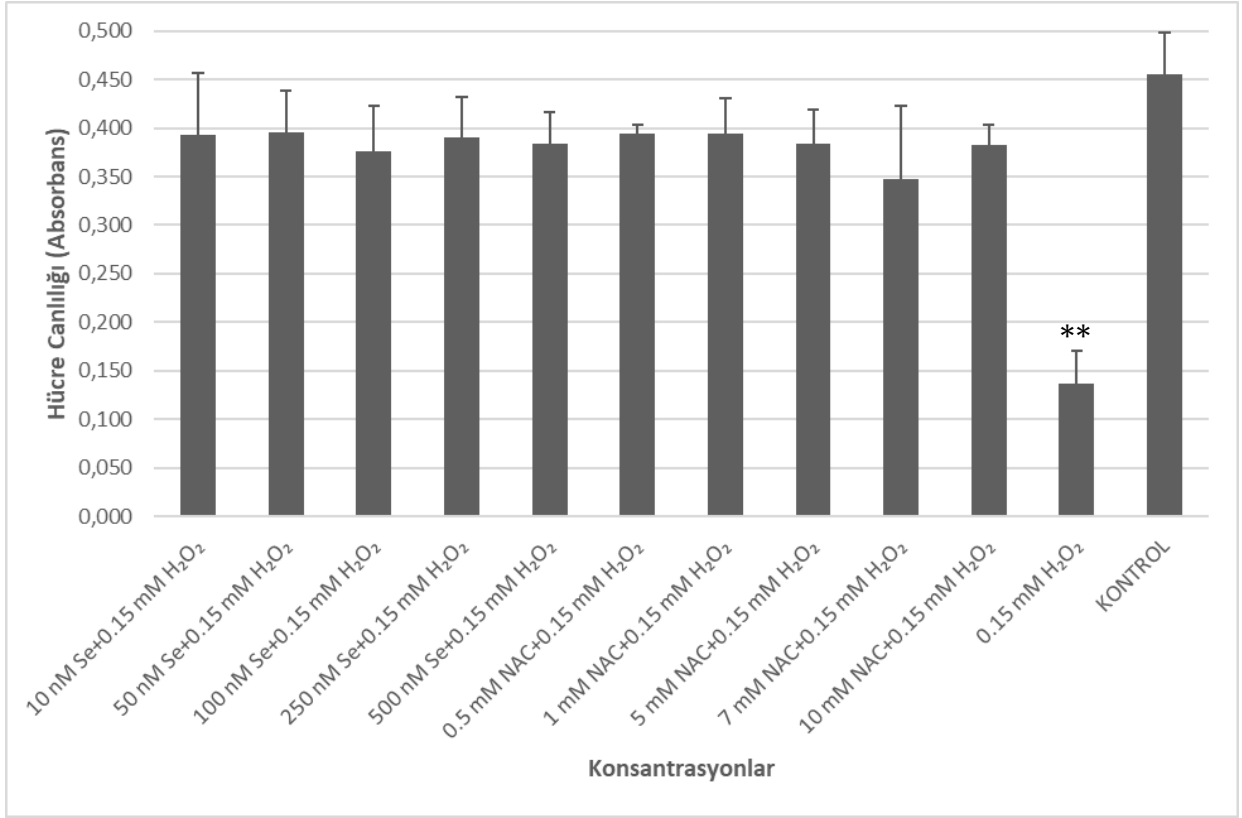
Şekil 4.6. SH-SY5Y hücrelerinde 24 saatlik MTT testi sonucu

** Diğer tüm gruplardan anlamlı derecede farklılık (p<0.05)



Şekil 4.7. SH-SY5Y hücrelerinde 48 saatlik MTT testi sonucu

** Diğer tüm gruplardan anlamlı derecede farklılık ($p < 0.05$)

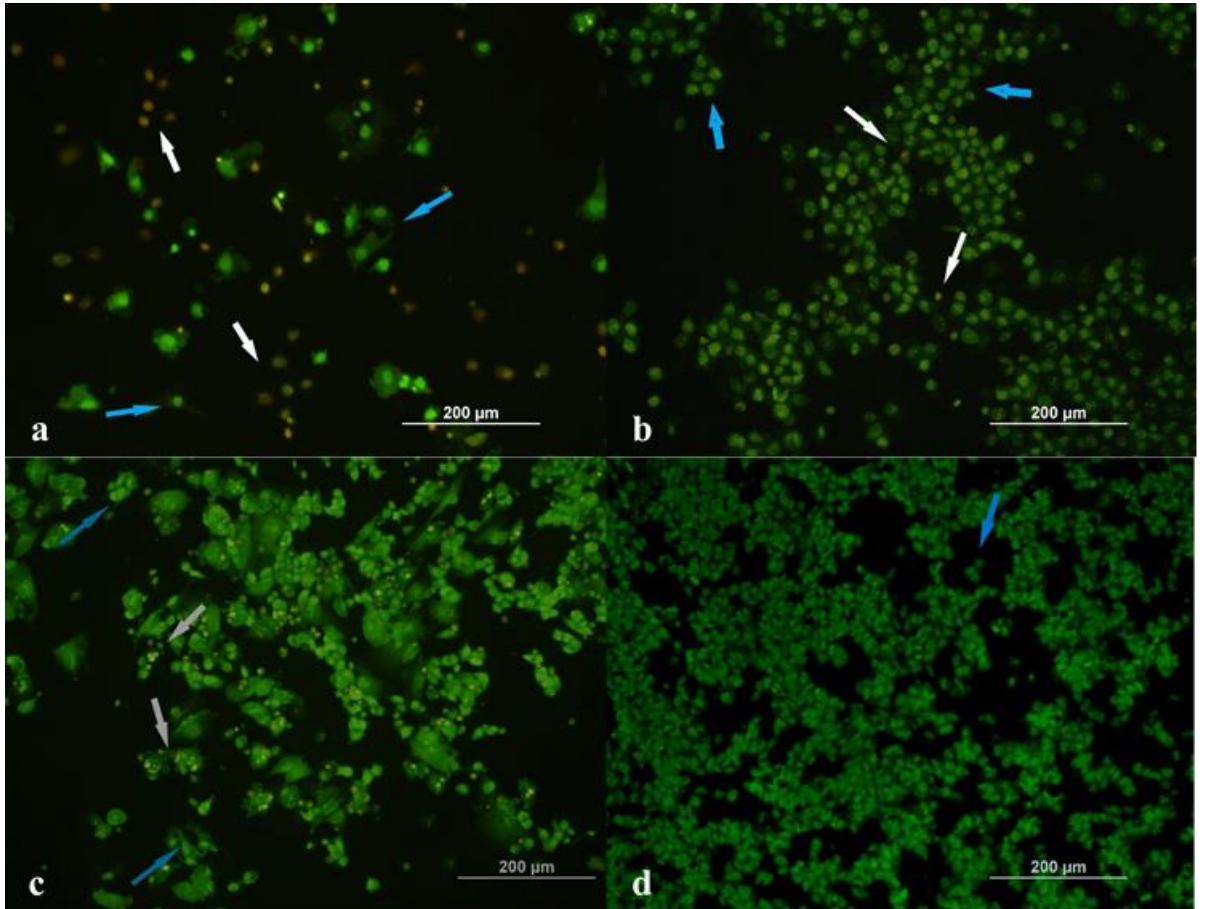


Şekil 4.8. SH-SY5Y hücrelerinde 72 saatlik MTT testi sonucu

** Diğer tüm gruplardan anlamlı derecede farklılık ($p < 0.05$)

4.4. Akridin Orange/Propidyum İyodür (AO/PI) Floresan Boyama Yöntemi ile Hücre Canlılığının İncelenmesi

Yapılan MTT analizi sonuçlarına göre, H₂O₂ eklenen sodyum selenit ve NAC konsantrasyonları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu nedenle AO/PI boyama ile % canlılık hesapları sırasında, sodyum selenit ve NAC için bulunan sonuçların ortalaması alınarak, NAC ve sodyum selenit için tek bir değer üzerinden çizelge hazırlanmıştır (Çizelge 4.1.). Bu hesaplamalar sırasında membran bütünlüğü bozulmamış, normal morfolojiye sahip yeşil renkli hücreler canlı; membran bütünlüğü bozularak normal morfolojiden uzaklaşmış turuncu renkli hücreler ise ölü hücre olarak sayıma dahil edilmiştir (Şekil 4.8.).



Şekil 4.9. SH-SY5Y hücrelerinde deney ve kontrol gruplarında AO/PI boyaması örneği. Mavi renkli oklarla gösterilen hücre tipi canlı, beyaz oklarla gösterilen hücre tipi ise ölü kabul edilerek hesaplamalar yapılmıştır (10X) H₂O₂ (a), NAC (b), Sodyum selenit (c), Kontrol (d)

Çizelge 4.1. 24, 48 ve 72. saatlerdeki AO/PI boyama sonucu hücre canlılığı sonuçları

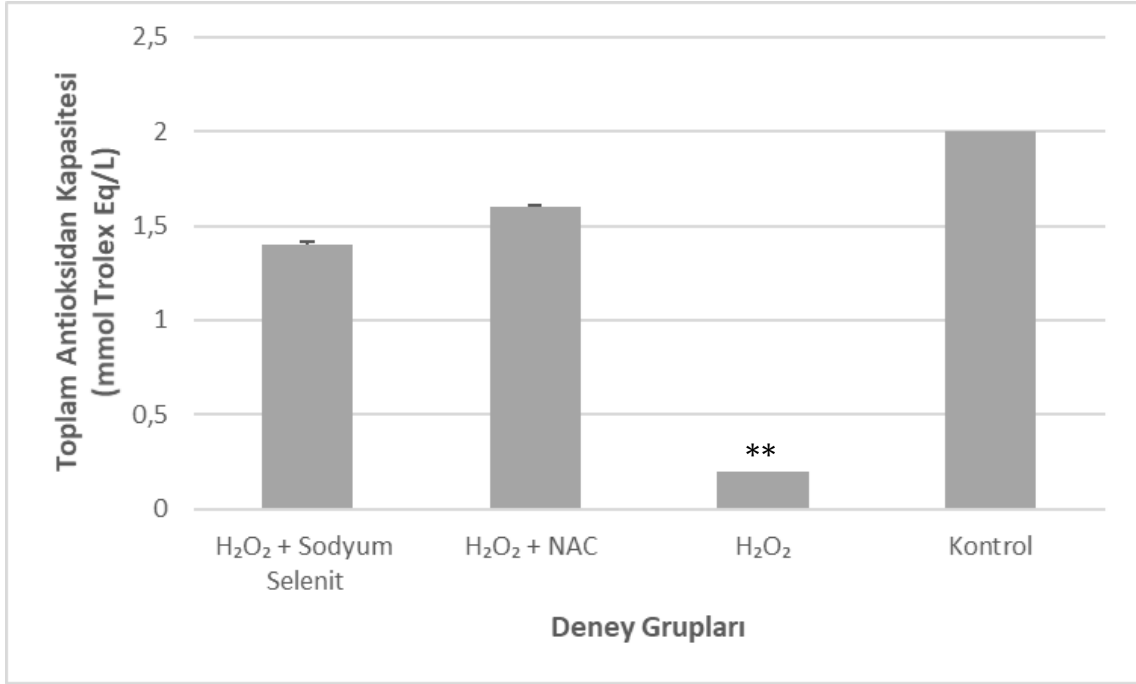
Gruplar	24. Saat	48. Saat	72. Saat
H₂O₂	Canlı Hücre: % 44.9 Ölü Hücre: % 55.1	Canlı Hücre: % 30 Ölü Hücre: % 70	Canlı Hücre: % 30.1 Ölü Hücre: % 69.9
Sodyum Selenit + H₂O₂ (Ort.)	Canlı Hücre: % 87.5 ±0.05 Ölü Hücre: % 12.5 ±0.05	Canlı Hücre: % 79.84 ±0.02 Ölü Hücre: % 20.16 ±0.02	Canlı Hücre: % 85.27 ±0.007 Ölü Hücre: % 14.73 ±0.007
NAC + H₂O₂ (Ort.)	Canlı Hücre: % 90.24 ±0.03 Ölü Hücre: % 9.76 ±0.03	Canlı Hücre: % 80.51 ±0.03 Ölü Hücre: % 19.49 ±0.03	Canlı Hücre: % 83.73 ±0.01 Ölü Hücre: % 16.27 ±0.01
Kontrol	Canlı Hücre: % 100 Ölü Hücre: % 0	Canlı Hücre: % 94 Ölü Hücre: % 6	Canlı Hücre: % 95 Ölü Hücre: % 5

4.5. Toplam Antioksidan Kapasitesi Sonuçları

Yapılan TAS tayini sonucunda, ‘‘H₂O₂ + sodyum selenit’’ ve ‘‘H₂O₂ + NAC’’ gruplarının antioksidan konsantrasyonları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamıştır. Bu sebeple bu grupların her dozu için ayrı ayrı değerler hesaplandıktan sonra, ortalama alınarak grafiklendirilmiştir. ‘‘H₂O₂’’, ‘‘H₂O₂ + NAC’’, ‘‘H₂O₂ + sodyum selenit’’ ve ‘‘kontrol grubu’’ ile TAS kitinde hesaplamalar için kullanılan su ve standartın iki ayrı absorbansı ölçülerek son absorbanstan ilk absorban çıkarılmış ve delta (Δ) değeri bulunmuştur. Bu delta değeri formülde (Çizelge 4.2.) yerine koyularak her grup için TAS düzeyi mmol Trolox Eq/L olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.9.). Hesaplamalar sonucu en yüksek TAS miktarının ‘‘H₂O₂ + NAC’’ grubunda, en düşük TAS miktarının ise ‘‘H₂O₂’’ grubunda olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Toplam antioksidan kapasitesinin hesaplanması için kullanılan formül [94]

$$TAS = \frac{\Delta Su - \Delta \text{Örnek}}{\Delta Su - \Delta \text{Standart}}$$



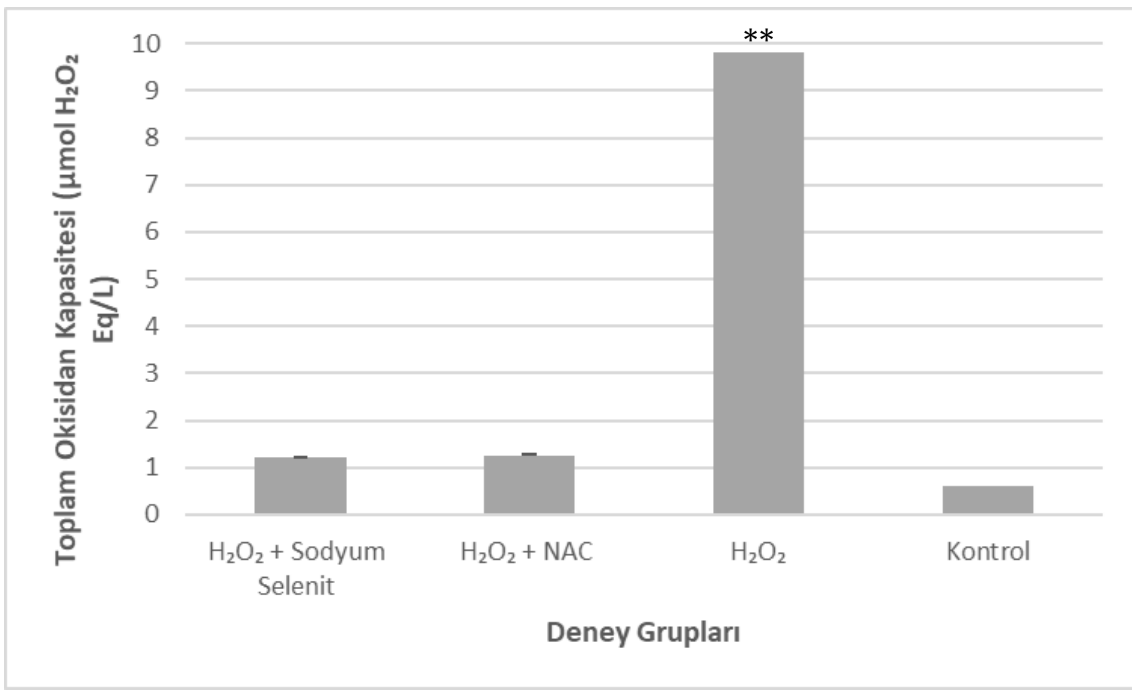
Şekil 4.10. Toplam antioksidan kapasitesi tayini ** En düşük TAS miktarı

4.6. Toplam Oksidan Kapasitesi Sonuçları

Yapılan TOS tayini sonucunda, H₂O₂ eklenen sodyum selenit ve NAC'ın kendi konsantrasyonları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamıştır. Bu sebeple bu grupların her dozu için ayrı ayrı değerler hesaplandıktan sonra, ortalama alınarak grafiklendirilmiştir. ‘H₂O₂’, ‘H₂O₂ + NAC’, ‘H₂O₂ + sodyum selenit’ ve ‘kontrol grubu’ ile TOS kitinde hesaplamalar için kullanılan standartın iki ayrı absorbansı ölçülerek son absorbanstan ilk absorban çıkarılmış ve delta (Δ) değeri bulunmuştur. Bu delta değeri formülde (Çizelge 4.3.) yerine koyularak her grup için TOS düzeyi μmol H₂O₂ Eq/L olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.10.). Hesaplamalar sonucu en yüksek TOS miktarının H₂O₂ grubunda olduğu, en düşük TOS miktarının ise H₂O₂ + NAC ve H₂O₂ + sodyum selenit gruplarında olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. Toplam oksidan kapasitesinin hesaplanması için kullanılan formül [95]

$$\text{TOS} = \frac{\Delta\text{Örnek}}{\Delta\text{Standart}} \times 10$$



Şekil 4.11. Toplam oksidan kapasitesi tayini ** En yüksek TOS miktarı

4.7. Oksidatif Stres İndeksi Sonuçları

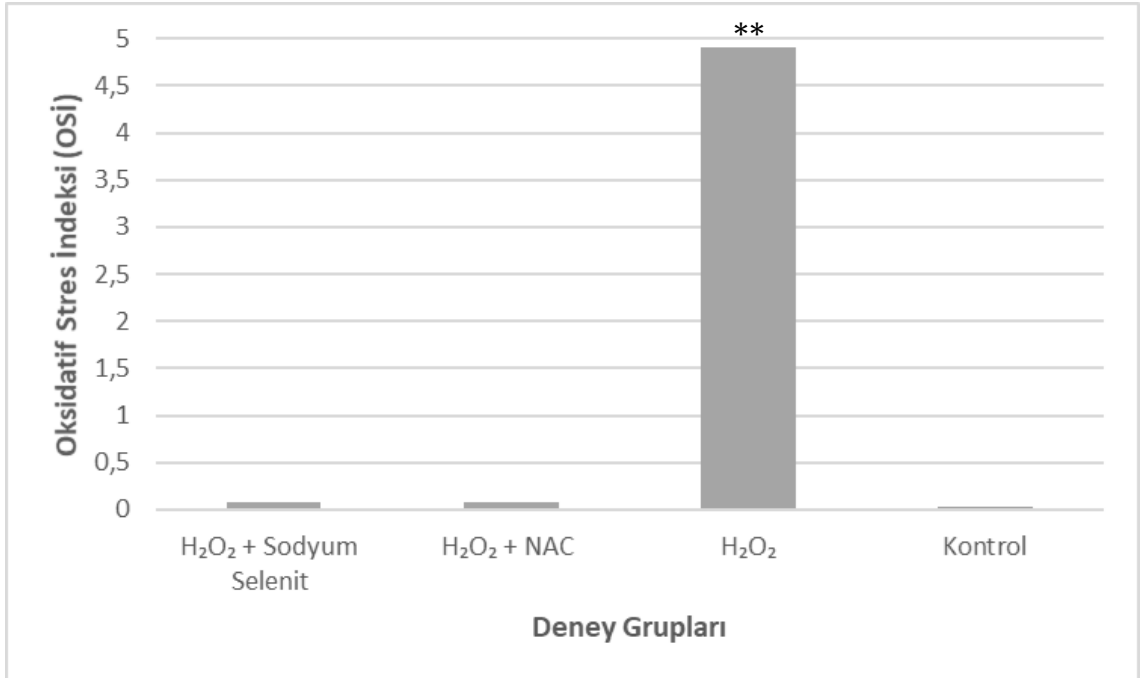
Oksidatif stres indeksinin hesaplanması için öncelikle mmol cinsindeki TAS verileri μmol cinsine çevrilmiştir. Sonrasında oksidatif stres indeksi için TAS ve TOS kitlerinde verilen formül (Çizelge 4.4.) kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır. En yüksek oksidatif stres indeksine sahip grup ise beklendiği şekilde H_2O_2 grubu olmuştur. (Şekil 4.11.)

Çizelge 4.4. Oksidatif stres indeksinin hesaplanması için kullanılan formüller [94,95]

$$\text{OSİ} = \frac{\text{TOS } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}}{\text{TAS } \mu\text{mol Trolox Eq/L}} \times 100$$

ya da

$$\text{OSİ} = \frac{\text{TOS } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}}{\text{TAS mmol Trolox Eq/L} \times 10}$$



Şekil 4.12. Oksidatif stres indeksi sonuçları ** En yüksek oksidatif stres indeksi

Bu tez çalışmasında L929 hücreleri ile yapmış olduğumuz ön denemelerde, 24 saatlik uygulamada hidrojen peroksitin artan dozlarda hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı ($p < 0.05$); ancak bununla birlikte kritik doz olarak belirlediğimiz 0.1 mM hidrojen peroksit konsantrasyonunda hücre canlılığının, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık olmadığı gösterilmiştir ($p > 0.05$). Hatta Burdo ve Rice-Evans tarafından 1989 yılında yapılan bir çalışmada düşük dozlardaki hidrojen peroksitin fibroblast hücrelerinde hücre proliferasyonu arttırdığı bildirilmiştir [86].

Literatürde hidrojen peroksitin dozu ve etki süresine dair farklı hücreler üzerinde çok farklı uygulamalar mevcuttur. Tsai ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada L929 hücrelerinde oksidatif stres modeli oluşturmak için 0.25 mM hidrojen peroksit ile üç saat uygulama yapılırken [87], 2002 yılında Takeyama ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada ise 0.5 mM hidrojen peroksit 90 dakika süreyle uygulanmıştır [88]. Wang ve arkadaşları 2015 yılında yapmış oldukları çalışmalarında, SH-SY5Y hücrelerinde oksidatif stres oluşturmak için 0.2 mM hidrojen peroksitle 24 saatlik uygulama yaparken [89], 2004 yılında Kang ve arkadaşları ise 0.3 mM hidrojen peroksit ile 24 saatlik uygulama yapmışlardır [90].

Literatüdeki bu farklı uygulamalar ışığında, L929 hücrelerinde farklı dozlar ve farklı uygulama süreleri denenerek, çalışmaya en uygun yöntem belirlenmiştir. Çalışmalar sırasında öncelikle besiyeri içerisinde hazırlanan hidrojen peroksit stok olarak hazırlanıp +4 °C’de saklanmıştır. Ancak, bu stoğun hücreler üzerinde etkisinin giderek azaldığı, 24 saatlik 1 mM uygulamalarda bile hücre canlılığında herhangi bir değişim olmadığı belirlenmiştir. Buradan yola çıkarak, hidrojen peroksit dozları her uygulama öncesi taze hazırlanmış ve hemen akabinde uygulanmıştır. Bu şekilde L929 hücrelerinden elde edilen sonuçlar, SH-SY5Y hücrelerinde yapılan çalışmalar için belirleyici olmuştur.

Sodyum selenit ve n-asetil sisteinin dozlarının belirlenmesine yönelik olarak L929 hücreleri ile yapmış olduğumuz ön çalışmalarda, 24 saatlik uygulamada belirlenen dozlarda (NAC için 0.5 mM, 1 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mM; sodyum selenit için 10 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM) herhangi bir toksik etki olmadığı görülmüştür. Literatürde yapılan birçok çalışmada bu antioksidanların aynı zamanda pozitif kontrol olarak da benzer doz aralıklarında kullanıldığı görülmüştür. Ancak, 2010 yılında Willcox ve arkadaşlarının yayımladığı bir çalışmada, antioksidan moleküllerin yüksek dozlarda pro-oksidan olarak hareket edip, hücrelere zarar verebileceği bildirilmiştir [52]. Bu tez çalışmasında da paralel şekilde sodyum selenitin, belirlenen dozların çok üzerindeki 25

mM'lık uygulama dozunun, hücre canlılığında önemli ölçüde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir ($p<0.05$). Bunun sonucunda, SH-SY5Y hücre hattında yaptığımız çalışmalar, L929 hücrelerinden elde edilen güvenli doz aralıklarına göre şekillendirilmiştir.

SH-SY5Y hücrelerine 24 saatlik 0.15 mM hidrojen peroksit uygulamasının hücre canlılığını %50 oranında azalttığı belirlenmiş ve bu doz IC_{50} dozu olarak kabul edilmiştir. Hidrojen peroksit, kendisi bir serbest radikal olmasa da geçiş metallerinin varlığında, fenton reaksiyonu sonucu organizma için son derece reaktif olan hidroksil radikalini oluşturmaktadır [18]. Geçiş metallerinin yoğunlukla bulunduğu beyinde, hidrojen peroksitin, nöronal hücrelerde özellikle fenton reaksiyonu yoluyla *in vitro* oksidatif stres oluşturucu iyi bir ajan olduğu düşünülmektedir [15].

Bhattacharya 2015 yılında yayımladığı çalışmada oksidatif strese giren hücrelerde, oksidatif hasar oluşumunun özellikle hücre membranındaki lipid ve proteinlerin yapısal bütünlüğünün bozulmasıyla gerçekleştiğini göstermiştir [36]. Çalışmamızda hücre membran bütünlüğünün bozulmasının bir analiz parametresi olarak kullanıldığı akridin orange/propidyum iyodür boyaması ile yapılan morfolojik analizlerde, yalnızca hidrojen peroksit uygulanan gruptaki hücrelerin, normal morfolojiden çok uzaklaşarak, membran bütünlüğünün bozularak, apoptoz benzeri bir morfoloji sergileyerek öldükleri gösterilmiştir. Bu sonuç, canlı ve ölü hücre %'leri hesaplanarak doğrulanmıştır.

Hidrojen peroksit ile yapmış olduğumuz standardizasyon çalışmalarının ardından, antioksidan moleküllerin uygulamasına geçilmiştir. SH-SY5Y hücrelerinin sodyum selenit ve n-asetil sistein ile 24 saatlik inkübasyonunun ardından yapılan hidrojen peroksit muamelesi sonrasında, hücre canlılığının tüm gruplarda, yalnızca hidrojen peroksit uygulanan gruba göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Hidrojen peroksit uygulaması öncesi 24 saat yalnızca antioksidan muamelesinin yapıldığı gruplarda ise hücreler üzerinde herhangi bir toksik etkinin olmadığı görülmüştür. Buradan hareketle, n-asetil sistein ve sodyum selenit için kullanılan beş farklı dozun da 0.15 mM'lık hidrojen peroksit uygulamasına karşı koruyucu etkisi olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, her iki antioksidanın kendi dozları arasında hücre canlılığı bakımından anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). MTT analizi sonucu elde edilen bu bilgi doğrultusunda, n-asetil sistein ve sodyum selenitin kendi içindeki dozlarından elde edilen sonuçların ortalaması alınarak, tek bir değer üzerinden diğer analizler yapılmıştır. Bu bağlamda yapılan AO/PI florasan boyama ve TAS-TOS

analizleri için, sonuçlar bu ortalama değerler üzerinden yorumlanmıştır. Sonuçta, kullanmış olduğumuz iki antioksidan olan sodyum selenit ve n-asetil sisteinin, hidrojen peroksite oluşturduğu oksidatif hasara karşı SH-SY5Y hücreleri üzerinde koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda antioksidan olarak sodyum selenitin tercih edilme sebeplerinden biri, bu antioksidanın kan-beyin bariyerinden geçebildiğinin bilinmesidir. Solovyev ve arkadaşlarının 2021 yılında yayımladığı çalışmada, selenyum ve düşük moleküler ağırlıklı selenyum türevlerinin lipoprotein reseptörü ile ilişkili protein 8'e (LRP8) bağımlı bir yol ile kan beyin bariyerinden geçtiği bildirilmiştir [91]. Gilgun-Sherki ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptığı bir çalışmada ise antioksidanların beyindeki oksidatif stres üzerinde koruyucu olabilmesi için, kan-beyin bariyerini geçmesinin gerekli olduğu vurgulanmıştır [72].

Sodyum selenitin tercih edilmesinin bir diğer nedeni ise selenyumun vücutta doğal olarak bulunan ve bizim de oksidatif stres oluşturucu ajan olarak kullandığımız hidrojen peroksiti suya indirgeyen glutatyon peroksidaz antioksidan enziminin kofaktörü olmasıdır [4]. Özellikle beyinde, diğer organlara kıyasla antioksidan enzimlerin oranının oldukça düşük olduğu [70] göz önüne alındığında, çalışmamızda sodyum selenitin, hidrojen peroksitle oluşturulmuş oksidatif stres modelindeki etkisinin nöronal hücreler üzerinde araştırılmasının çok daha anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda diğer bir antioksidan olarak n-asetil sisteinin tercih edilme sebeplerinden biri, bu antioksidanın farklı doz ve uygulama yollarıyla kan-beyin bariyerinden geçtiğinin bilinmesidir. Sheffner ve arkadaşlarının 1966 yılında yaptığı çalışmada sıçanlara oral yoldan n-asetil sistein verilip, iki saat sonra beyin dokusu incelenmiş ve beyinde n-asetil sisteine rastlanmıştır [92]. 1995 yılında McLellan ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada ise sıçanlara intravenöz ve intrakarotis yoluyla verilen n-asetil sisteinin yine kan beyin bariyerinden geçebildiği bildirilmiştir [93]. N-asetil sisteinin bu özelliği, kan-beyin bariyerinden geçebilen antioksidanların beyin dokusunda oluşan oksidatif stres üzerinde daha etkili olacağı sonucuna varmamızı sağlamıştır.

N-asetil sisteinin antioksidan bir molekül olarak kullanılmasının bir diğer nedeni de bu molekülün glutatyon sisteminde indirgeyici ajan olarak kullanılan redükte glutatyonun öncülü olmasıdır. Redükte glutatyon, hem kendisi bir antioksidan olup, hem de glutatyon peroksidaz enzimi tarafından indirgeyici ajan olarak kullanılmaktadır. Bu noktada, n-

asetil sistein glutasyon rezervlerinin yenilenmesini sağlayarak, glutasyon peroksidaz enzim aktivitesini arttırmaktadır [54]. Bunun yanında, n-asetil sistein kendi başına bir reaktif süpürücü ve disülfit kırıcı etkiler göstererek de reaktif molekülleri daha kararlı hale getirebilmektedir [55].

Çalışmamızda SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan *in vitro* oksidatif stres modelinde, sodyum selenit ve n-asetil sisteinin koruyucu etkileri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). 24, 48 ve 72. saatlerde yapılan MTT analizi, AO/PI floresan boyama ve 72. saatte yapılan TAS-TOS tayininde her iki antioksidan için de birbirine çok yakın sonuçlar elde edilmiş ve bunun da istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Bunun nedeninin, iki antioksidanın da etki mekanizmasını glutasyon sistemi üzerinden gerçekleştirmesi olduğu düşünülmektedir.

Çalışmalarımız sırasında dikkat çeken bir diğer konu da n-asetil sistein uygulanan gruplarda yapılan MTT analizi sırasında ortaya çıkmıştır. Testin çalışma prensibinde sarı renkli olan tetrazolyum tuzu, canlı hücrede bulunan mitokondriyel enzimler tarafından koyu mor renkli formazen kristallerine dönüştürülmektedir. Ancak, n-asetil sistein uygulanan gruplarda MTT boyası eklenir eklenmez mor renk oluşumu gözlenmiştir. Bu durum, absorbans değerinin ölçülmesi prensibine dayanan MTT testinin güvenilirliğini azalttığı için, n-asetil uygulanan gruplara MTT boyası koyulmadan önce iki kez serumsuz besiyeri MEM-ALPHA ile yıkama yapılmıştır. Yıkama sonrası MTT boyasında hemen renk değişimi gözlenmemiş, testin güvenilir bir şekilde ilerlemesi sağlanmıştır. Literatürde bu duruma özgü bir açıklama yer almasa da MTT boyası ile n-asetil sistein içindeki sülfür grubunun bir etkileşiminin olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında n-asetil sistein ve sodyum selenitin, SH-SY5Y nöronal hücrelerinde hidrojen peroksitle oluşturulmuş oksidatif hasara karşı koruyucu etki gösterdikleri ve olası etki mekanizmalarının glutasyon sistemi üzerinden gerçekleştiği sonucuna varılmıştır. Elde ettiğimiz bu sonuçların yapılacak olan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla desteklenerek, nörodejenerasyonun oksidatif stres parametresi üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

5. KAYNAKLAR

- [1] A. Phaniendra, D.B. Jestadi, L. Periyasamy, Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases, *Indian journal of clinical biochemistry* 30(1) (2015) 11-26.
- [2] H. Sies, Oxidative stress: Concept and some practical aspects, *Antioxidants* 9(9) (2020) 852.
- [3] T. Florence, The role of free radicals in disease, *Australian and New Zealand journal of ophthalmology* 23(1) (1995) 3-7.
- [4] V.I. Lushchak, Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification, *Chemico-biological interactions* 224 (2014) 164-175.
- [5] P.D. Ray, B.-W. Huang, Y. Tsuji, Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling, *Cellular signalling* 24(5) (2012) 981-990.
- [6] I. Belhadj Slimen, T. Najar, A. Ghram, H. Dabbebi, M. Ben Mrad, M. Abdrabbah, Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review, *International journal of hyperthermia* 30(7) (2014) 513-523.
- [7] A. Ciesielka, Singlet oxygen discovery, (2021).
- [8] O.E. Ifeanyi, A review on free radicals and antioxidants, *Int. J. Curr. Res. Med. Sci* 4(2) (2018) 123-133.
- [9] F. De Lazzari, L. Bubacco, A.J. Whitworth, M. Bisaglia, Superoxide radical dismutation as new therapeutic strategy in Parkinson's disease, *Aging and disease* 9(4) (2018) 716.
- [10] H.P. Indo, H.-C. Yen, I. Nakanishi, K.-i. Matsumoto, M. Tamura, Y. Nagano, H. Matsui, O. Gusev, R. Cornette, T. Okuda, A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging, *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 56(1) (2015) 1-7.
- [11] K.A. Wojtunik-Kulesza, A. Oniszczyk, T. Oniszczyk, M. Waksmundzka-Hajnos, The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease, *Biomedicine & pharmacotherapy* 78 (2016) 39-49.
- [12] S. Di Meo, P. Venditti, Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants, *Oxidative medicine and cellular longevity* 2020 (2020).
- [13] C. WinterbournChristine, Biological production, detection, and fate of hydrogen peroxide, *Antioxidants & redox signaling* (2018).
- [14] R.Z. Hopkins, Hydrogen peroxide in biology and medicine: an overview, *Reactive Oxygen Species* 3(7) (2017) 26-37.

- [15] T.K. Das, M.R. Wati, K. Fatima-Shad, Oxidative stress gated by Fenton and Haber Weiss reactions and its association with Alzheimer's disease, *Archives of Neuroscience* 2(2) (2015).
- [16] B. Lipinski, Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease, *Oxidative medicine and cellular longevity* 2011 (2011).
- [17] B. Halliwell, A. Adhikary, M. Dingfelder, M. Dizdaroglu, Hydroxyl radical is a significant player in oxidative DNA damage in vivo, *Chemical Society Reviews* (2021).
- [18] R.V. Lloyd, P.M. Hanna, R.P. Mason, The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction, *Free radical biology and medicine* 22(5) (1997) 885-888.
- [19] A.A. Alfadda, R.M. Sallam, Reactive oxygen species in health and disease, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012 (2012).
- [20] X. Chen, C. Guo, J. Kong, Oxidative stress in neurodegenerative diseases, *Neural regeneration research* 7(5) (2012) 376.
- [21] J.C. Ozougwu, The role of reactive oxygen species and antioxidants in oxidative stress, *International Journal of Research* 1(8) (2016).
- [22] P. Møller, P.H. Danielsen, D.G. Karottki, K. Jantzen, M. Roursgaard, H. Klingberg, D.M. Jensen, D.V. Christophersen, J.G. Hemmingsen, Y. Cao, Oxidative stress and inflammation generated DNA damage by exposure to air pollution particles, *Mutation research/Reviews in mutation research* 762 (2014) 133-166.
- [23] A.D. Sarma, A.R. Mallick, A. Ghosh, Free radicals and their role in different clinical conditions: an overview, *International Journal of Pharma Sciences and Research* 1(3) (2010) 185-192.
- [24] P. Schröder, J. Krutmann, Environmental oxidative stress—Environmental sources of ROS, *Reactions, Processes* (2005) 19-31.
- [25] T. Finkel, N.J. Holbrook, Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing, *nature* 408(6809) (2000) 239-247.
- [26] D.B. Zorov, M. Juhaszova, S.J. Sollott, Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release, *Physiological reviews* 94(3) (2014) 909-950.
- [27] A.J. Kowaltowski, N.C. de Souza-Pinto, R.F. Castilho, A.E. Vercesi, Mitochondria and reactive oxygen species, *Free Radical Biology and Medicine* 47(4) (2009) 333-343.
- [28] R.P. Brandes, N. Weissmann, K. Schröder, Nox family NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation, *Free Radical Biology and Medicine* 76 (2014) 208-226.
- [29] S. Di Meo, T.T. Reed, P. Venditti, V.M. Victor, Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions, *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016 (2016).
- [30] M.A. Qazi, K.I. Molvi, Free radicals and their management, *American Journal of Pharmacy and Health Research* 6(4) (2018) 1-10.

- [31] L. Covarrubias, D. Hernández-García, D. Schnabel, E. Salas-Vidal, S. Castro-Obregón, Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active?, *Developmental biology* 320(1) (2008) 1-11.
- [32] Y. Son, Y.-K. Cheong, N.-H. Kim, H.-T. Chung, D.G. Kang, H.-O. Pae, Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species: how can ROS activate MAPK pathways?, *Journal of signal transduction* 2011 (2011).
- [33] B.M. Babior, R.S. Kipnes, J.T. Curnutte, Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent, *The Journal of clinical investigation* 52(3) (1973) 741-744.
- [34] D. Heffetz, Y. Zick, H₂O₂ potentiates phosphorylation of novel putative substrates for the insulin receptor kinase in intact Fao cells, *Journal of Biological Chemistry* 264(17) (1989) 10126-10132.
- [35] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The international journal of biochemistry & cell biology* 39(1) (2007) 44-84.
- [36] S. Bhattacharya, Reactive oxygen species and cellular defense system, *Free radicals in human health and disease*, Springer 2015, pp. 17-29.
- [37] H.S. El-Beltagi, H.I. Mohamed, Reactive oxygen species, lipid peroxidation and antioxidative defense mechanism, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 41(1) (2013) 44-57.
- [38] G.D. Ouédraogo, R.W. Redmond, Secondary Reactive Oxygen Species Extend the Range of Photosensitization Effects in Cells: DNA Damage Produced Via Initial Membrane Photosensitization¶, *Photochemistry and photobiology* 77(2) (2003) 192-203.
- [39] E.E. Farmer, M.J. Mueller, ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling, *Annual review of plant biology* 64 (2013) 429-450.
- [40] N. Wadhwa, B.B. Mathew, S. Jatawa, A. Tiwari, Lipid peroxidation: mechanism, models and significance, *Int J Curr Sci* 3 (2012) 29-38.
- [41] E. Niki, Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1840(2) (2014) 809-817.
- [42] M.T. Mohammed, S.M. Kadhim, A.N. Jassimand, S. Abbas, Free radicals and human health, *International Journal of Innovation Sciences and Research* 4(6) (2015) 218-223.
- [43] S. Noori, An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system, *Open access scientific reports* 1(8) (2012) 1-9.
- [44] C.A. Juan, J.M. Pérez de la Lastra, F.J. Plou, E. Pérez-Lebeña, The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies, *International Journal of Molecular Sciences* 22(9) (2021) 4642.

- [45] H. Karabulut, M.Ş. Gülay, Serbest radikaller, Mehmet Akif Ersoy University Journal of Health Sciences Institute 4(1) (2016).
- [46] R. Morelli, S. Russo-Volpe, N. Bruno, R. Lo Scalzo, Fenton-dependent damage to carbohydrates: free radical scavenging activity of some simple sugars, Journal of Agricultural and Food Chemistry 51(25) (2003) 7418-7425.
- [47] A.A. Adwas, A. Elsayed, A. Azab, F. Quwaydir, Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body, J. Appl. Biotechnol. Bioeng 6(1) (2019) 43-47.
- [48] A. Santo, H. Zhu, Y.R. Li, Free radicals: From health to disease, React. Oxyg. Species 2 (2016) 245-263.
- [49] I. Mirończuk-Chodakowska, A.M. Witkowska, M.E. Zujko, Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body, Advances in medical sciences 63(1) (2018) 68-78.
- [50] L.A. Pham-Huy, H. He, C. Pham-Huy, Free radicals, antioxidants in disease and health, International journal of biomedical science: IJBS 4(2) (2008) 89.
- [51] S.B. Nimse, D. Pal, Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms, RSC advances 5(35) (2015) 27986-28006.
- [52] J.K. Willcox, S.L. Ash, G.L. Catignani, Antioxidants and prevention of chronic disease, Critical reviews in food science and nutrition 44(4) (2004) 275-295.
- [53] Y. Jiao, S. Ma, J. Li, L. Shan, Y. Yang, M. Li, J. Chen, The influences of N-acetyl cysteine (NAC) on the cytotoxicity and mechanical properties of poly-methylmethacrylate (PMMA)-based dental resin, PeerJ 3 (2015) e868.
- [54] Y. Hara, N. McKeehan, P. Dacks, H. Fillit, Evaluation of the neuroprotective potential of N-acetylcysteine for prevention and treatment of cognitive aging and dementia, Evaluation 4(3) (2017) 201-206.
- [55] G. Aldini, A. Altomare, G. Baron, G. Vistoli, M. Carini, L. Borsani, F. Sergio, N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why, Free radical research 52(7) (2018) 751-762.
- [56] A. Augustyniak, G. Bartosz, A. Čipak, G. Duburs, L.U. Horáková, W. Łuczaj, M. Majekova, A.D. Odysseos, L. Rackova, E. Skrzydlewska, Natural and synthetic antioxidants: an updated overview, Free radical research 44(10) (2010) 1216-1262.
- [57] J. Pokorný, Are natural antioxidants better—and safer—than synthetic antioxidants?, European journal of lipid science and technology 109(6) (2007) 629-642.
- [58] D. Fusco, G. Colloca, M.R.L. Monaco, M. Cesari, Effects of antioxidant supplementation on the aging process, Clinical interventions in aging 2(3) (2007) 377.
- [59] H. Sies, Strategies of antioxidant defense, European journal of biochemistry 215(2) (1993) 213-219.
- [60] H. Sies, C. Berndt, D.P. Jones, Oxidative stress, Annual review of biochemistry 86 (2017) 715-748.

- [61] T. Yoshikawa, Y. Naito, What is oxidative stress?, *Japan medical association journal* 45(7) (2002) 271-276.
- [62] J.E. Klaunig, L.M. Kamendulis, B.A. Hocevar, Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis, *Toxicologic pathology* 38(1) (2010) 96-109.
- [63] K. Maiese, Z.Z. Chong, J. Hou, Y.C. Shang, Oxidative stress: Biomarkers and novel therapeutic pathways, *Experimental gerontology* 45(3) (2010) 217-234.
- [64] I. Dalle-Donne, R. Rossi, R. Colombo, D. Giustarini, A. Milzani, Biomarkers of oxidative damage in human disease, *Clinical chemistry* 52(4) (2006) 601-623.
- [65] P. Théron, D. Bonnefont-Rousselot, A. Davit-Spraul, M. Conti, A. Legrand, Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach, *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 3(5) (2000) 373-384.
- [66] M. Kao, D. Ang, A.a. Pall, A. Struthers, Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options, *Journal of human hypertension* 24(1) (2010) 1-8.
- [67] I. Liguori, G. Russo, F. Curcio, G. Bulli, L. Aran, D. Della-Morte, G. Gargiulo, G. Testa, F. Cacciatore, D. Bonaduce, Oxidative stress, aging, and diseases, *Clinical interventions in aging* 13 (2018) 757.
- [68] J.N. Copley, M.L. Fiorello, D.M. Bailey, 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress, *Redox biology* 15 (2018) 490-503.
- [69] X. Wang, E.K. Michaelis, Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain, *Frontiers in aging neuroscience* 2 (2010) 12.
- [70] A. Rao, B. Balachandran, Role of oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative diseases, *Nutritional neuroscience* 5(5) (2002) 291-309.
- [71] K. Song, Y. Li, H. Zhang, N. An, Y. Wei, L. Wang, C. Tian, M. Yuan, Y. Sun, Y. Xing, Oxidative stress-mediated blood-brain barrier (BBB) disruption in neurological diseases, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2020 (2020).
- [72] Y. Gilgun-Sherki, E. Melamed, D. Offen, Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier, *Neuropharmacology* 40(8) (2001) 959-975.
- [73] S. Urano, Y. Sato, T. Otonari, S. Makabe, S. Suzuki, M. Ogata, T. Endo, Aging and oxidative stress in neurodegeneration, *Biofactors* 7(1-2) (1998) 103-112.
- [74] K. Jomova, D. Vondrakova, M. Lawson, M. Valko, Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders, *Molecular and cellular biochemistry* 345(1) (2010) 91-104.
- [75] M. Pappolla, Y. Chyan, R. Omar, K. Hsiao, G. Perry, M. Smith, P. Bozner, Evidence of oxidative stress and in vivo neurotoxicity of beta-amyloid in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a chronic oxidative paradigm for testing antioxidant therapies in vivo, *The American journal of pathology* 152(4) (1998) 871.

- [76] S.N. ASLAN, B. KARAHALİL, OKSİDATİF STRES VE PARKİNSON HASTALIĞI, Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University 43(1) (2019) 94-116.
- [77] B. Moosmann, C. Behl, Antioxidants as treatment for neurodegenerative disorders, Expert opinion on investigational drugs 11(10) (2002) 1407-1435.
- [78] A. Verma, M. Verma, A. Singh, Animal tissue culture principles and applications, Animal Biotechnology, Elsevier 2020, pp. 269-293.
- [79] J. Gordon, S. Amini, General overview of neuronal cell culture, neuronal cell culture (2021) 1-8.
- [80] G. Shui, Development of In Vitro Neural Models for Drug Discovery and Toxicity Screening, (2011).
- [81] H. Xicoy, B. Wieringa, G.J. Martens, The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review, Molecular neurodegeneration 12(1) (2017) 1-11.
- [82] P.S. Cohen, J.J. Letterio, C. Gaetano, J. Chan, K. Matsumoto, M.B. Sporn, C.J. Thiele, Induction of Transforming Growth Factor/31 and Its Receptors during all-f/Yms-Retinoic Acid (RA) Treatment of RA-responsive Human Neuroblastoma Cell Lines, Cancer Research 2380.
- [83] S. Acosta, C. Lavarino, R. Paris, I. Garcia, C. de Torres, E. Rodríguez, H. Beleta, J. Mora, Comprehensive characterization of neuroblastoma cell line subtypes reveals bilineage potential similar to neural crest stem cells, BMC developmental biology 9(1) (2009) 1-14.
- [84] J. Kovalevich, D. Langford, Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology, Neuronal Cell Culture, Springer 2013, pp. 9-21.
- [85] S. Amoroso, A. Gioielli, M. Cataldi, G. Di Renzo, L. Annunziato, In the neuronal cell line SH-SY5Y, oxidative stress-induced free radical overproduction causes cell death without any participation of intracellular Ca²⁺ increase, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research 1452(2) (1999) 151-160.
- [86] R.H. Burdo, C. Rice-Evans, Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation, Free radical research communications 6(6) (1989) 345-358.
- [87] W.-C. Tsai, W.-C. Li, H.-Y. Yin, M.-C. Yu, H.-W. Wen, Constructing liposomal nanovesicles of ginseng extract against hydrogen peroxide-induced oxidative damage to L929 cells, Food chemistry 132(2) (2012) 744-751.
- [88] N. Takeyama, S. Miki, A. Hirakawa, T. Tanaka, Role of the mitochondrial permeability transition and cytochrome C release in hydrogen peroxide-induced apoptosis, Experimental cell research 274(1) (2002) 16-24.
- [89] J. Wang, Y. Zhao, B. Zhang, C. Guo, Protective effect of total phenolic compounds from Inula helenium on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in SH-SY5Y cells, Indian journal of pharmaceutical sciences 77(2) (2015) 163.

- [90] S.S. Kang, J.Y. Lee, Y.K. Choi, G.S. Kim, B.H. Han, Neuroprotective effects of flavones on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14(9) (2004) 2261-2264.
- [91] Solovyev, Nikolay, et al. Selenium at the neural barriers: a review *Frontiers in Neuroscience* (2021) 88.
- [92] Sheffner, A. L., et al. Metabolic studies with acetylcysteine. *Biochemical pharmacology* 15.10 (1966) 1523-1535.
- [93] McLellan, Lesley I., et al. Uptake and distribution of N-acetylcysteine in mice: tissue-specific effects on glutathione concentrations. *Carcinogenesis* 16.9 (1995) 2099-2106.
- [94] Erel, Ozcan. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry* 37.4 (2004) 277-285.
- [95] Erel, Ozcan. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry* 38.12 (2005) 1103-1111.