

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**SODYUM NİTROPRUSSİD İLE İNDÜKLENMİŞ NİTRİK OKSİT
SİNYAL YOLAĞINDA KARNOZİNİN FARMAKOLOJİK
DOZLARININ VİVO ETKİLERİ**
Proje No: TSA-09-926

Normal Araştırma Projesi (NAP)

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Yrd. Doç. Dr. Mükerrerem Betül Aycan
Eczacılık / Farmakoloji

Araştırmacılar:
Prof. Dr. Sami Aydoğan
Tıp/Fizyoloji

Doç. Dr. Nefise Nalan İmamoğlu Şirvanlı
Eczacılık /Temel Bilimler (Tıbbi Biyoloji)

Eylül 2012

KAYSERİ

ÖZET

L-karnozin (β -Alanil-L-Histidin) 20. yüzyılın başlarında Gulewtisch ve arkadaşları tarafından ilk kez kalp kasından izole edilmiştir. Antioksidan etkileri ve reaktif oksijen radikallerini yakalayabilme özelliği de bir çok çalışmada gösterilmiştir.

Nitrik oksit (NO) ise arginin aminoasitinden nitrik oksit sentaz enzimi (NOS) aracılığı ile sentezlenen ve etkisini çözünebilir guanilat siklaza bağlanması ve cGMP'nin aktive olmasıyla gösteren haberci bir moleküldür. Düşük dozlarda birçok fizyolojik olayın düzenlenmesinde görev alan NO yüksek miktarlarda üretildiğinde hücreler için zararlı olmaktadır.

Bu çalışmada sodyum nitroprussit ile indüklenmiş NO sinyal yolağında karnozinin farmakolojik dozlarının mitokondriyal in vivo etkileri, beyin dokusunda NO yolağı üzerine etkileri ve plazma oksidan/antioksidan sistem üzerine etkileri araştırıldı. Kendi aralarında biri kontrol olmak üzere 3 gruba ayrılan genç ve yaşlı sıçanların diğer iki grubuna 2 hafta süreyle intraperitoneal olarak SNP (20 μ g/kg) , SNP + L-karnozin (10mg/kg) uygulandı. Sıçanların beyin dokularından izole edilen mitokondrilerde sitokrom c oksidaz, nitrik oksit sentaz ve total nitrit-nitrat düzeyleri ölçüldü. Plazma NOS ve NO düzeyleri ile, eritrositlerde MDA, GSH-Px, SOD aktiviteleri de değerlendirildi. Ayrıca beyin homojenatlarında western blot yöntemi ile cGMP ve guanilat siklaz protein ekspresyonlarına bakıldı. Sitokrom c oksidaz enzim aktivitesi her iki yaş grubunda SNP uygulaması ile artarken L-karnozin uygulaması sonucu gençlerde ($p<0,05$) ve yaşlılarda ($p<0,001$) anlamlı bir şekilde azalmıştır. SNP uygulaması total nitrit-nitrat (NO) düzeylerini her iki yaş grubunda da istatistiksel ($p<0,05$) olarak artırmıştır. L-karnozin uygulaması ise bu düzeyleri önemli derecede ($p<0,05$) azaltmıştır. Beyin mitokondrilerinde SNP uygulaması ile hem genç hem de yaşlı grupta NOS aktivitesi kontrollerine göre istatistiksel olarak değişmezken L-karnozin uygulaması ile NOS aktivitesi gençlerde anlamlı bir ($p<0,05$) şekilde artmış ve yaşlılardaki artış anlamlı bulunmamıştır.

Bu sonuçlar L-karnozinin NO düzeylerinde ve buna bağlı olarak NOS aktivitesinde belirleyici bir molekül olabileceğini göstermektedir. Ayrıca L-Karnozinin mitokondrial fonksiyon açısından da önemli olabileceği bu çalışma ile gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: L-Karnozin, Nitrik oksit, Nitrik oksit sentaz, elektron transport zinciri, Sitokrom C oksidaz, oksidan/antioksidan

ABSTRACT

L-Carnosine has been isolated from the heart muscle for the first time at beginning of the 20th century by Gulewtisch and friends. It has been illustrated in many studies that its antioxidant effect and the feature of capturing reactive oxygen radicals.

NO is a messenger molecule who is synthesized by means of NOS from arginine and demonstrates its influence by linking to soluble guanylate cyclase and with the activation of cGMP. NO who takes part in the regulation of a number of physiological events in low quantity becomes harmful when it is produced in high quantity.

In this study, it is investigated that the mitochondrial in vivo effects of pharmacological doses of L-carnosine in NO signal pathway induced by SNP and its effects on oxidant/antioxidant defense system. SNP (20µg/kg) , SNP + L-carnosine (10mg/kg) were applied, for two weeks, as intraperitoneal to the other two groups of the young and old rats which was divided into three groups, one of them is control group. Cytochrome c oxidase, NOS, total nitrite-nitrate levels were measured in mitochondria isolated from rats brain tissue. Plasma NOS and NO levels and, MDA, GSH-Px, SOD in erythrocytes were analyzed. Furthermore cGMP and guanylate cyclase protein expressions were examined by western blot. Cytochrome c oxidase activity increased in both age groups with SNP application and as a result of L-carnosine application, it significantly decreased in young rats ($p<0.05$) and old rats ($p<0.001$). SNP application statistically increased total nitrite-nitrate levels in both age groups ($p<0.05$). On the other hand, L-carnosine application remarkably went down these levels ($p<0.05$). While NOS activity statistically unchanged according to controls in brain mitochondria in both age groups with SNP application. NOS activity increased mostly in young rats with the L-carnosine application and the increase in old group wasn't noticeable.

These results show that L-carnosine could be a marker molecule in NO levels and in this context NOS activity. Additionally, it is demonstrated in this study that L-carnosine might be significant in terms of mitochondrial function.

Key words: L-carnosine, Nitric oxide, Nitric oxide synthase, Electron Transport Chain, Cytochrome c oxidase, oxidant/antioxidant

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET

ABSTRACT

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1.L-KARNOZİN.....	2
2.1.1.L-Karnozin'in Antioksidan Etkisi.....	3
2.2.NİTRİK OKSİT.....	4
2.2.1.Nitrik Oksit'in Etki Mekanizması.....	7
2.3.MİTOKONDİRİ VE ELEKTRON TRANSPORT ZİNCİRİ.....	8
2.3.1.Mitokondriyal Oksidatif Hasar Mekanizmaları.....	14
2.3.2. Nitrik Oksit'in Mitokondriyal Elektron Transport Zinciri Üzerine Etkisi..14	
2.3.3. Mitokondriyal Antioksidan Savunma Mekanizmaları....	16
3-GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
4-BULGULAR.....	21
4.1.Mitokondriyal Sitokrom c Oksidaz Aktivitesi.....	21
4.2.Total Nitrit-Nitrat Düzeyleri.....	22
4.3. Nitrik Oksit Sentaz Aktivitesi.....	22
5-TARTIŞMA VE SONUÇ.....	24
6-KAYNAKLAR.....	26

KISALTMALAR

ADP	: Adenozin difosfat
ATP	: Adenozin trifosfat
BH4	: Tetrahidrobiyopterin
CCS1	: Bakır şaperon
CCP1	: Sitokrom c peroksidaz
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
cNOS	: Yapısal nitrik oksit sentaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
eNOS	: Endotelial nitrik oksit sentaz
ETFP	: Elektron transfer eden flavoprotein
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
FADH ₂	: Redükte flavin adenin dinükleotid
FMN	: Flavin mononükleotid
GİS	: Gastrointestinal sistem
G K	: Genç deney hayvanı kontrol grubu
G SNP	: Sodyum nitroprussit uygulanan genç deney hayvanları grubu
G SNP-C	: Sodyum nitroprussit ve L-karnozin uygulanan genç deney hayvanları grubu
GRX1	: Glutaredoksin 1
GRX2	: Glutaredoksin 2
GRX3	: Glutaredoksin 3
GRX4	: Glutaredoksin 4
GRX5	: Glutaredoksin 5
H ⁺	: Proton
HCl	: Hidroklorik asit
H ₂ O	: Su
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit

iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
KCl	: Potasyum klorür
NADH	: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
NMDA	: N- Metil D- Aspartik asit
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	: Nitrik oksit
NO•	: Nitrik oksit radikali
NO ²⁻	: Nitrit
NO ³⁻	: Nitrat
NOS	: Nitrik oksit sentaz
O ₂	: Oksijen
O ₂ ⁻	: Süperoksit
OH ⁻	: Hidroksil radikali
OONO ⁻	: Peroksinitrit
PMNL	: Polimorfonükleer lökosit
SNP	: Sodyum nitroprussit
SOD1	: Cu/Zn Süperoksit dismutaz
SOD2	: Mn Süperoksit dismutaz
STE	: Sükroz, Tris, EGTA
TNF	: Tümör nekrozis faktör
tRNA	: Taşıyıcı ribonükleik asit
TRR2	: Tiyoredoksin 2
TRX3	: Tiyoredoksin 3
UQ	: Okside ubikinon
UQH ₂	: Redükte ubikinon
Y K	: Yaşlı deney hayvanı kontrol grubu
Y SNP	: Sodyum nitroprussit uygulanan yaşlı deney hayvanları grubu
Y SNP-C	: Sodyum nitroprussit ve L-karnozin uygulanan yaşlı deney hayvanları grubu

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Şekil.2.1.1.Karnozin

Şekil.2.2.1. Nitrik oksit aktivasyonu ve inaktivasyonu

Şekil.2.2.2. Nitrik oksit biyosentezi

Tablo.2.2.1. Nitrik oksit sentezleyen enzimler

Şekil.2.3.1Mitokondri

Şekil.2.3.2. Kompleks I, II ve Ubikinon

Şekil.2.3.3. Kompleks III ve sitokrom c

Şekil.2.3.4. Kompleks IV

Şekil.2.3.5. Elektron Transport Zinciri

Şekil.2.3.6. ATP Sentaz

Şekil.2.3.2.1. Nitrik Oksit'in Mitokondriyal Elektron Transport Zinciri Üzerine Etkisi

Şekil.2.3.2.2. Peroksinitrit ve Hücre Ölümü

Şekil.3.1. Deney Grupları

Şekil.4.1.1.Yaşlı ve genç gruplarda mitokondriyal sitokrom c oksidaz aktivitesi

Şekil.4.2.1. Yaşlı ve genç gruplara ait beyin mitokondrilerinde NOS aktivitesi

Şekil. 4.3.1 Beyin dokusunda cGMP protein ekspresyonları

Şekil. 4.3.2 Beyin dokusunda guanilat siklaz protein ekspresyonları

Şekil 4.4.1. Yaşlı ve genç gruplarda Total nitrit/nitrat (NO) düzeyleri

Şekil.4.4.2. Yaşlı ve genç gruplarda plazma NOS aktivitesi

Şekil 4.5.1. Eritrositlerde MDA düzeyleri

Şekil 4.5.2. Eritrositlerde GSH-Px aktivitesi

Şekil 4.5.3. Eritrositlerde SOD aktivitesi

Şekil 4.5.4. Eritrositlerde uzama indeksi

Şekil 4.5.5.1. Plazma TNF-alfa düzeyleri

Şekil 4.5.5.1. Plazma IL-1beta düzeyleri

Şekil 4.5.5.1. Plazma IL-6 düzeyleri

1.GİRİŞ VE AMAÇ

L-karnozin 20. yüzyılın başlarında keşfedilmiş olan bir dipeptittir. Günümüze kadar nitrik oksit ve çeşitli serbest radikallerle oluşturulmuş oksidatif hasar mekanizmalarında koruyucu rolleri olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmalar esnasında yapılan in vitro deneyler nitrik oksitin (NO) nitrosatif stres oluşturucu etkilerinin yanı sıra vasküler tonusun dengesinin sağlanmasında oldukça önemli olan nitrik oksit sentez yolağı üzerine de etkili olabileceğı düşünölmüştür.

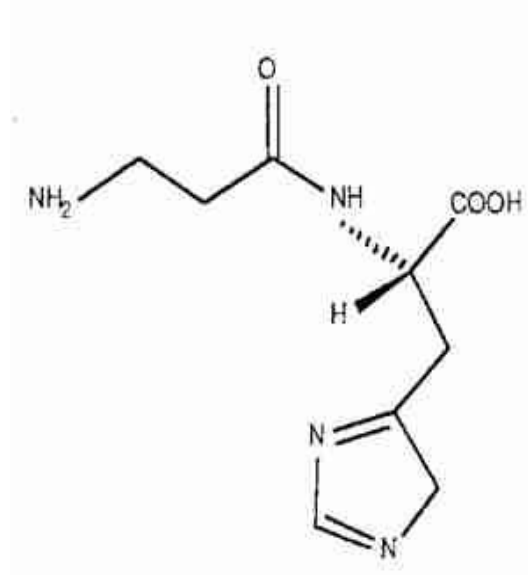
Bu amaçla in vitro çalışmalar bulunsa da karnozinin nitrik oksit yolağı üzerine etkilerini in vivo olarak gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu nedenle çalışmamızda nitrik oksit donörü olan sodyum nitroprussid ile tetiklenmiş olan nitrik oksit sentezi esnasında karnozinin farmakolojik dozlarının nitrik oksit sinyal mekanizmaları üzerine etkileri incelenmesi ve herhangi bir oksidatif hasar mekanizması gelişip gelişmediğı, gelişiyorsa karnozinin bu dozlarının antioksidan olarak etkinliğinin de değeriendirilmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.L-KARNOZİN

L-karnozin ilk defa 20.yy başlarında Rus bilim adamları tarafından kalp kasından izole edilmiştir. İnsan vücudunda ,özellikle kas ve beyin dokusunda, L-karnozin sentaz enzimi vasıtasıyla β -alanin ve l-histidin amino asitlerinden sentezlenen doğal bir dipeptittir(1).



Şekil.2.1.1.Karnozin

L-karnozin non-toksik bir dipeptittir. Kanda ve diğer dokularda karnozinaz ve peptidazlar tarafından hızlı bir şekilde parçalanır. Bu yüzden terapötik etki için yüksek dozda alınması gerekir(2).

L-karnozinin temel diyet kaynağı ettir. Vejetaryenlerde karnozin az miktarda bulunur. Gıdalardaki karnozinin emilimi %30 ile %70 arasında değişir. Saf L-karnozinin emilimi ise %70'den daha fazladır. Absorbsiyonu büyük oranda küçük barsaklarda gerçekleşir. Dolaşıma geçen L-karnozin kaslara, beyine ve diğer dokulara taşınır. Plazmada ölçülebilir düzeyde L-karnozin bulunmaz(3).

Yaşla birlikte doku L-karnozin seviyelerinin azaldığı gözlenmiştir(4).

2.1.1. L-karnozinin Antioksidan Etkisi

L-karnozin serbest radikal yakalayıcısıdır. Reaktif oksijen türleri ve özellikle serbest radikal olan aldehit kalıntılarını yakalayarak nükleik asit, lipid, proteinleri oksidatif hasara karşı korur (5).

L-karnozinin protein karbonilasyonunu, malondialdehit ve metilglioksal gibi reaktif aldehitleri ve indirgenmiş şekerin proteinlere çapraz bağlanmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (6).

L-karnozinin insan fibroblast kültüründe yaşlanmayı baskıladığı ve hatta hücreleri gençleştirdiği gösterilmiştir (7,8). L-karnozin metaller (Cu, Co, Zn, Fe, Mg) ile şelasyon yaparak bu metallerin zararlı etkilerini önler (9).

Kan glikoz seviyesinin uzun süre yüksek olması durumunda ortamdaki glikoz non-enzimatik olarak proteinlere bağlanarak protein glikozilasyona neden olur. Glikasyona uğramış proteinler moleküler oksijene bir elektron vererek serbest oksijen radikali oluşumuna neden olur (10).

L-karnozin serbest radikal yakalayıcı etkisiyle glikolize proteinlerin etkisini nötralize eder (11). L-karnozinin diğer önemli bir özelliği de intrasellüler pH'nın pH tamponlama özelliği ile aynı kalmasını sağlamasıdır (12).

Suda çözünebilen endojen bir dipeptit olan L- karnozin son yıllarda antioksidan ve antiglikasyonik özellikleriyle dikkat çekmiş olmasının yanı sıra, yara iyileşmesi, immünostimülasyon, antienflamatuvar, antikarsinojenik etkilere sahiptir (13-15).

2.2.NİTRİK OKSİT

Atmosferde kirliliğe neden olan, suda ve yağda kolaylıkla çözünebilen gaz olan nitrik oksit ilk defa 1980 yılında Furchgott ve Zawadski tarafından endotel kaynaklı gevşeme faktörü olarak bildirilmiştir.1987 yılında ise Palmer ve arkadaşları endotel kaynaklı gevşeme faktörünün NO olduğunu bulmuştur. NO'nin fizyolojik ve patolojik olaylardaki rolü hakkında daha fazla bilgi elde edilmesinden sonra 1992 yılında ‘‘Science’’ dergisi tarafından yılın molekülü seçilmiştir (16-19).

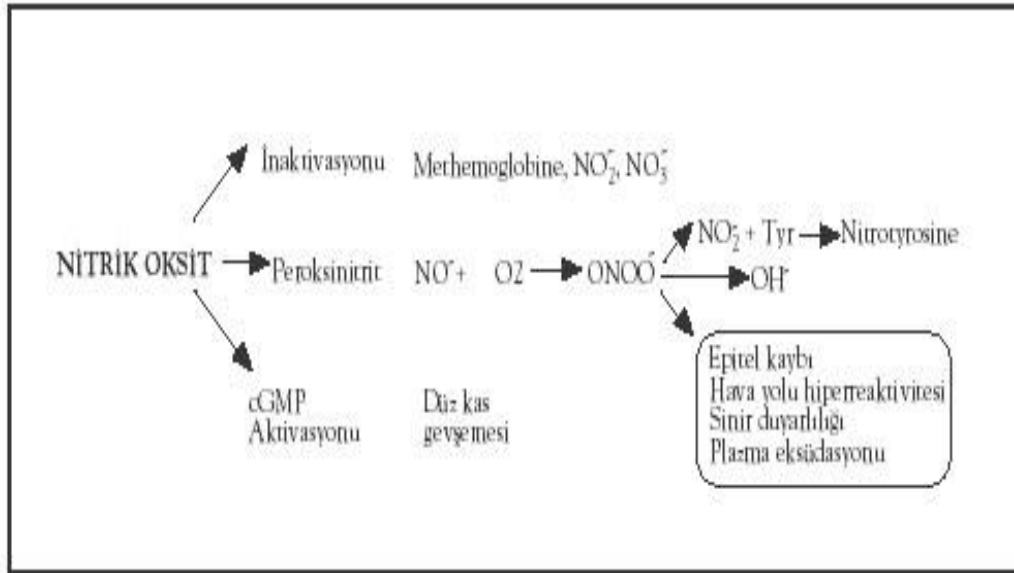
Renksiz ve son derece toksik bir gaz olan NO• serbest radikal yapısında olmasından dolayı yarı ömrü çok kısadır. NO• lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda oldukça stabildir ve suda erir (20,21). Diğer serbest radikaller her konsantrasyonda hücreler için zararlı iken NO düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlerde rol almaktadır.Ancak aşırı ve kontrolsüz sentezlenmesi hücreler için zararlıdır(22).

Oksijen varlığında hızlı bir biçimde nitrit ve nitrata (NO₂- ve NO₃-) dönüşerek inaktive olur. Suda ve plazmada nitrite okside olan nitrik oksit birkaç saat bu şekilde kararlı kalır. Kandaki nitrit nitrata dönüşür, bu yüzden kanda bazal nitrat konsantrasyonu nitrit konsantrasyonundan fazladır. Oluşan NO metabolitleri böbrekler yoluyla vücuttan uzaklaştırılır.Nitrik oksitin hemoglobine afinitesi oksijeninkinden 3000 kat daha fazladır, bu da fizyolojik ortamda ömrünün çok kısa olmasının nedenlerinden biridir (23).

Hücre zarlarından kolaylıkla geçebilen bir serbest radikal olan nitrik oksitin hedef molekülleri oksijen, diğer radikaller, tiol grupları ve metallerdir. Örneğin, nitrik oksit guanilat siklazı, bu enzimin hem (heme) grubuna bağlanarak aktive eder. Aktive olan guanilat siklaz vasküler düz kasta gevşeme ile vasodilatasyonu, merkezi sinir sisteminde ise sinir iletisini sağlar (24).

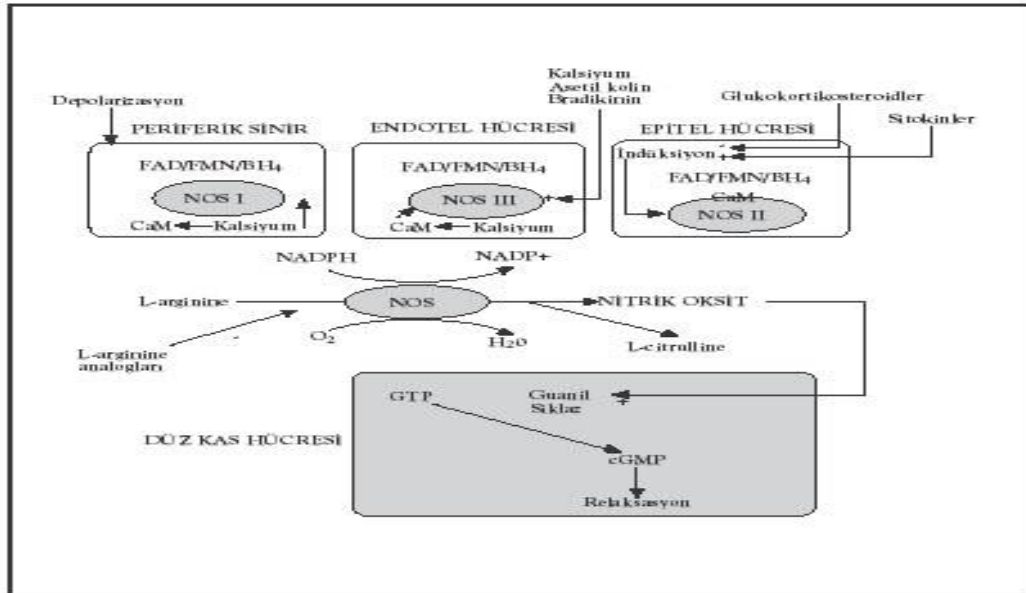
NO, serbest tiol grupları ile birleşerek ‘‘S-nitrosothioller’’ oluşturur, böylelikle daha stabil hale geldiğinden yarı ömrü uzar ve plazminojen aktivatörü gibi bazı katalitik enzimlerin fonksiyonlarını artırabilir (25).

Nitrik oksit, süperoksit anyon radikali (O₂⁻) ile reaksiyona girerek sitotoksik bir molekül olan peroksinitrite (OONO⁻) dönüşür. Peroksinitrit, hücre membranlarında lipid peroksidasyonunu artırırken, aynı zamanda DNA hasarına yol açar ve proteinlerle de etkileşir(25).



Şekil.2.2.1. Nitrik oksit aktivasyonu ve inaktivasyonu

Biyosentezi: NO, nitrik oksit sentaz denilen bir enzim ailesi tarafından L-arjinin aminoasitinden sentezlenir. NO sentezlenirken NOS dışında moleküler oksijen ve dört tane kofaktöre ihtiyaç duyar. Bunlar Hem, FAD(flavin adenin dinükleotid), FMN(flavin mono nükleotid) ile BH₄ (tetrahidrobiyopterin)'dir. Bu reaksiyon sonucunda NO yanında L-sitrulin de oluşur(26).



Şekil.2.2.2. Nitrik oksit biyosentezi

Günümüzde bilinen üç NOS izoformu vardır. eNOS endotel hücrelerinden nNOS nöronlardan izole edilmiştir. Bir de sentezi sitokinlerle uyarılabilen iNOS (induced NOS) bulunmaktadır .

Bu enzimlerin genleri üç ayrı kromozom üzerinde kodlanmıştır(eNOS 7. kromozomda, nNOS 12. kromozomda ve iNOS 17. kromozomda) (27).

Bu enzimler başlıca iki gruba ayrılırlar:

1- Yapısal (Constitutive) NOS (cNOS): Yapısal NOS'un nNOS(nöronal) ve eNOS(endotelial) olarak adlandırılan iki izoformu vardır. Çeşitli reseptörlerin uyarılmasına (asetilkolin, bradikinin gibi) veya damar duvarındaki gerilmelere (shear stress) cevap olarak picomol-nanomol miktarlarda aralıklı olarak nitrik oksit sentezi yaparlar (28).

Diğer izoformdan ayırıcı özellikleri aktivitelerinin Ca^{2+} 'a (ikincil haberci olarak) bağımlı olmalarıdır. Hücre içi iyonize kalsiyumu artıran her türlü etkileşimde, kalsiyumun kalmoduline bağlanmasıyla oluşan kompleks ya Ca^{2+} ya da kalmodulin cNOS'un aktifleşmesini sağlar ve NO sentezlenir. Ancak kalsiyumu artıran uyarı kesildiğinde hücre içi kalsiyum miktarı azalmaya başlar ve enzim aktivitesi azalarak NO sentezi durur. Sonuç olarak cNOS ilgili hücrelerde daima mevcuttur fakat Ca^{2+} düzeyi yükselinceye kadar aktif değildir(26,29).

cNOS izoenzimlerinin başlıca bulundukları yerler ve etkileri farklıdır. nNOS kaynaklı NO santral sinir sisteminde nöromodülatör olarak görev yapar. Bilinen en düşük molekül ağırlıklı organik nörotransmitterdir. Sinapsların şekillenmesine yardımcı olur (30-32). Koku alma (31), ağrıyı algılama (32), görme (33), ve hafıza oluşması (31) gibi işlevlerde rol oynar. Periferik sinir sisteminde nonadrenerjik nonkolinerjik sistemde nörotransmitterdir(30-34).Solunum fonksiyonlarında (34), penil ereksiyonunda (35), GİS (gastrointestinal sistem) motilitesinde (36), mesane sfinkter işlevinde (37) ve tüm dokuların kan basınçlarının ve akış hızının düzenlenmesinde rol alır.

eNOS kaynaklı NO düz kasların gevşemesini sağlayarak kan basıncını, kan akış hızını ve dolayısıyla kalp kasılmasını düzenler (38). Trombositlerin adezyon ve agregasyonunu inhibe eder(39,40). Endotel hücresi ve vasküler düz kas hücrelerinde antiproliferatif etkiye sahiptir(41).

2-Uyarılabilir (inductible) NOS (iNOS) : iNOS başta makrofajlar olmak üzere PMNL (polimorfonükleer lökosit)' ler, hepatositler, damar düz kasları, damar endoteli tarafından salınır ve endotoksin, TNF (tümör nekrozis faktör), gama interferon gibi uyarıcılar tarafından uyarılır.

Enzim indüklendiği zaman NO üretimi, yapısal formdaki gibi kısa sürmez, saatlerce hatta günlerce devam edebilir(26,29). Özellikle non spesifik immünitede önemli rol oynar. Bakteri, mantar, virüs ve tümör hücrelerinde sitotoksik ya da sitostatik etki oluşturur(42-44).

Tablo.2.2.1. Nitrik oksit sentezleyen enzimler

NOS İzofom	Diğer Adı	Salınım	Kaynak	Regülasyon	NO Miktarı	Kromozom
Tip I	nNOS	Devamlı	Sinir hücreleri	Kalsiyuma bağımlı	Düşük (picomol)	12
Tip II	iNOS	İndüklendiğinde	Makrofaj, damar düz kısı, damar endoteli, miyokard, endokard, hepatosit, immün hücreler, hava yolu epiteli	Sitokinler, endotoksin ve oksidanlar tarafından indüklenme	Yüksek (nanomol)	17
Tip III	eNOS	Devamlı	Vasküler endotel hücreleri, plateletler, miyokard ve endokard, mast hücreleri, nötrofiller	Kalsiyuma bağımlı	Düşük (picomol)	7
NO: nitrik oksit, NOS: nitrik oksit sentezleyen enzim, nNOS: nöral NOS, iNOS: indüklenebilen NOS, eNOS: endotel kökenli NOS.						

2.2.1.Nitrik Oksit'in Etki Mekanizması

Nitrik oksitin biyolojik etkisi guanilat siklaz enzimi tarafından yürütülür. Hücre içinde sentezlenen veya dışında sentezlenip de komşu hücrelerden difüzyonla geçen NO, guanilat siklazın hem grubuna bağlandığında siklik guanozin monofosfatın (cGMP) artışına, bu da cGMP'ye bağımlı protein kinazların aktivasyonuna neden olur. Sonuçta, hücre içi kalsiyum azalır ve kalsiyum ile aktive olan potasyum kanalları açılır. Potasyum hücre dışına çıktığında hiperpolarizasyon olur ve düz kas gevşemesi meydana gelir(45).

Endojen nitrovazodilatör sistemin etkileri dışarıdan verilen sodyum nitroprussid ve nitratlar tarafından taklit edilir. Bu maddeler NO'e çevrildikten sonra etkilerini gösterirler (23).

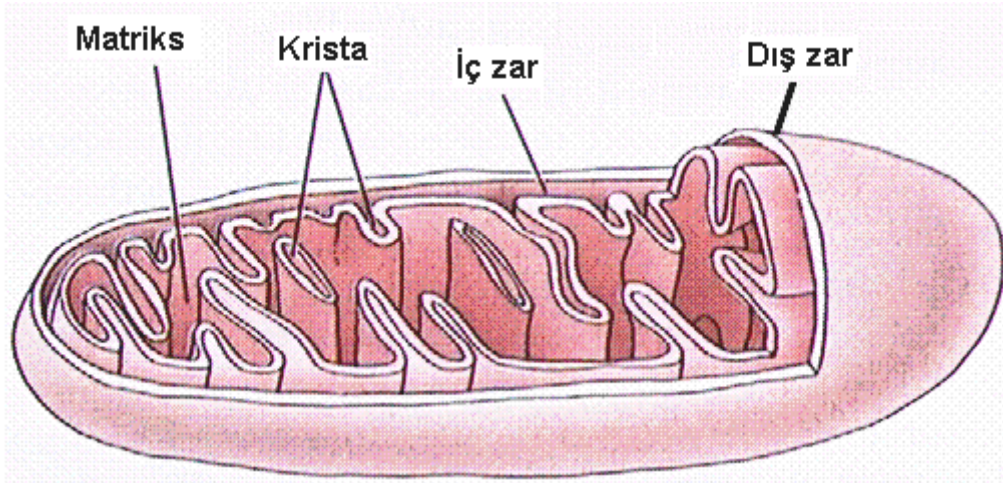
Nitrik oksit, cGMP'a bağılı olarak aynı mekanizma ile vasküler olmayan düz kasta gevşemeye, trombositlerde adezyon ve agregasyonun, nötrofillerde de kemotaksisin inhibisyonuna neden olmaktadır (46).

NO sinir sisteminde de cGMP üzerinden sinir iletisini sağlamaktadır. Burada uyarıcı bir nörotransmitter olan glutamat, NMDA reseptörlerine bağlandığında kalsiyum kanalları açılır bu da NOS enzimini aktive eder ve cGMP artar. Bu mekanizmanın nöron hasarından sorumlu olduğu düşünülmektedir (47).

n NOS'ın hem bir nörotransmitter olarak ve hem de beyinde metabolizma ile kan akımı arasındaki dengeyi sağlayan bir faktör olarak fizyolojik rolleri de vardır (48).

2.3.MİTOKONDİRİ VE ELEKTRON TRANSPORT ZİNCİRİ

Mitokondriler ökaryotik hürelerin enerji üretimi görevini üstlenen ve kendi DNA'sına sahip hüre içi organelldir. 1-7 mikrometre uzunluğunda, çubuk seklinde veya 2-3 mikrometre çapında küresel yapılardır. Dış membran, iç membran, krista, matriks ve membranlar arası boşluktan oluşmaktadır (49-50).



Şekil.2.3.1. Mitokondri

Dış zar ile iç zar arasındaki aralık 40-80 Å olup birbirinden farklıdır. Dış zarın kalınlığı 70 Å kadardır. Hücre zarına benzer yapıda olup porin olarak adlandırılan ve geniş kanalları oluşturan bir transport proteinine sahiptir. Porinlerin oluşturduğu bu kanallar sayesinde mitokondri dış zarından moleköl ağırlığı 10.000 dalton ve daha küçük moleküller geçer. İç

membran kalınlığı 50-60 Å kadardır (50). Krista adı verilen katlanmalar ile yüzeyini artırır. İç membranın selektif geçirgen olması nedeniyle protein ve metabolitlerin matrikse taşınması için spesifik mekanizmalar mevcuttur ve enerji gerektirir (51).

İç membranın lipid içeriğinde bir fosfolipid olan kardiolipin yoğun olarak bulunur (52). İç zarda 3 tip protein bulunur: i) Elektron transport zincirinin oksidasyon reaksiyonlarını gerçekleştiren proteinler (enzimler, sitokromlar vb.) ii) Matrikste ATP yapımını gerçekleştiren ATP sentetaz iii) Metabolitlerin matrikse giriş çıkışını düzenleyen permeaz adı verilen transport proteinleri (50).

Mitokondri matriksi orta yoğunlukta olup, bol miktarda protein molekülü, sitrik asit siklusu ile yağ asitleri ve prüvatların oksidasyonu için gerekli yüzlerce enzim taşır. Ayrıca matrikste mitokondrial DNA, özel ribozomlar, tRNA ve mitokondrial genlerin görev yapmasında ve çoğalmasında görevli enzimler vardır (50).

Mitokondriler hücrelerin enerji üretim merkezleridir. Oksidatif fosforilasyon, yağ asidi β-oksidasyonu, Kreps döngüsü (Trikarboksilik asit döngüsü) gibi temel metabolik olaylar mitokondrilerde gerçekleşir (53).

Üre siklusunda, aminoasit, kolesterol, yağ, steroid ve nükleotidlerin metabolizmasında da görev alırlar. Sitozolde gerçekleşen glikoliz olayı sırasında NADH ve sonunda pirüvat oluşmaktadır. Pirüvattan, yağ asitlerinin ve amino asitlerin karbon iskeletinin yıkılmasıyla oluşan asetil-CoA'nın mitokondri matriksinde sitrik asit döngüsüne girer ve böylece NADH ve FADH₂ oluşur. Oluşan NADH ve FADH₂'ler, iç mitokondriyal membranda bulunan elektron transport zincirine (solunum zinciri) aktarılırlar (53).

Hücre için gerekli olan enerji miktarının % 98'i oksidatif fosforilasyon (elektron transport zincirinde) sayesinde üretilmektedir. "Hücre solunum" olarak da isimlendirilen oksidatif fosforilasyon mitokondrinin iç membranında, krista bölgelerinde meydana gelmektedir (53).

Mitokondri iç membranındaki elektron transport zincirinde 5 kompleks bulunur. İlk dördü elektron taşıyıcı olarak görev yaparken kompleks 5 ATP sentezinden sorumludur.

Kompleks I (NADH dehidrojenaz kompleksi)

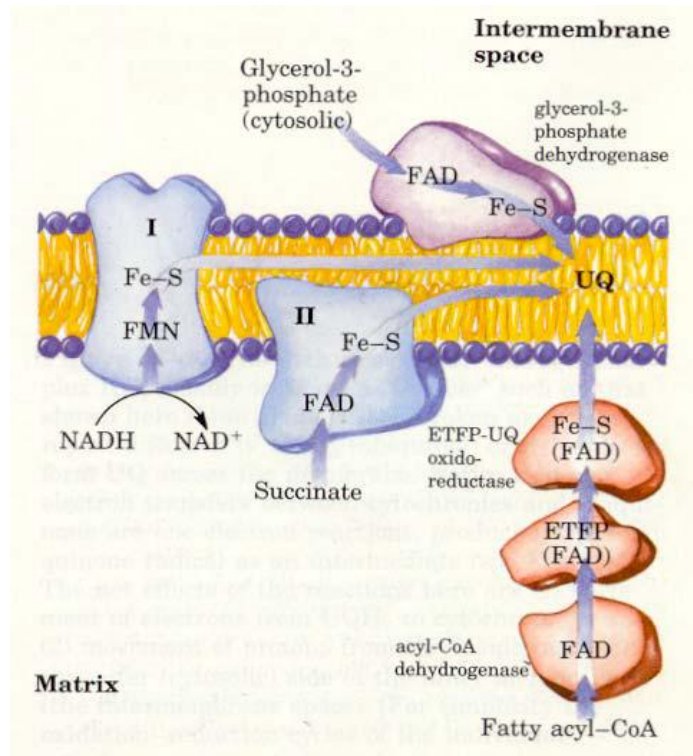
Kompleks I (NADH dehidrojenaz kompleksi), iç mitokondriyal membrana gömülmüştür; NADH bağlayan yeri matriks tarafındadır ki burası, matrikste oluşan NADH ile etkileşebilir. Kompleks I, elektronların NADH'den ubikinona (UQ) transferini katalize eder (54).

Ubikinon (koenzim Q), solunum zincirinde tek lipid yapılı moleküldür; hareketli elektron taşıyıcılarından birisidir.

Ubikinonun tamamen indirgenmiş formu olan UQH_2 , membranda kompleks I'den kompleks III'e diffüze olur; kompleks III'te de UQH_2 , okside form olan UQ formuna oksitlenecektir. Elektronların kompleks I yoluyla kompleks III'e akışı, protonların mitokondriyal matriksten membranlar arası boşluğa hareketiyle eşleşmiştir ki böylece bir proton gradienti oluşur; bu proton gradienti de mitokondriyal ATP sentezi için önemlidir (54).

Kompleks II (süksinat dehidrojenaz kompleksi)

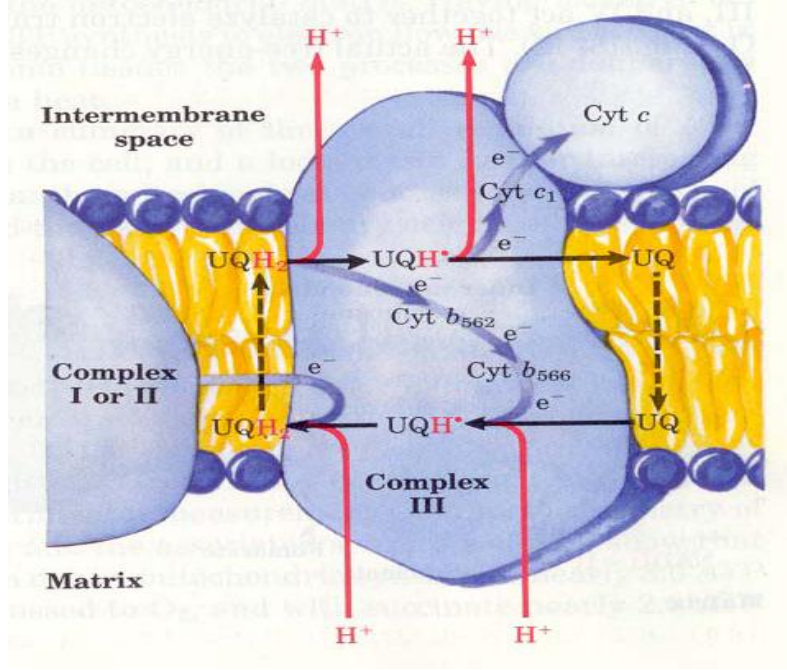
Kompleks II (süksinat dehidrojenaz kompleksi), sitrik asit döngüsünde membrana bağlı enzimdir; elektronların süksinattan ubikinona (UQ) transferini katalize eder. $FADH_2$ yapısındaki elektronlar, kompleks II tarafından ubikinona aktarılır. Ancak, yağ açıl-CoA ve sitozolik gliserol-3-fosfattan elektronların ubikinona transferi kompleks II yoluyla olmaz. Yağ açıl-CoA için **açıl-CoA dehidrojenaz**, **elektron-transfer eden flavoprotein (ETFP)** ve **ETFP-UQ oksidoredüktaz** görev görür; gliserol-3-fosfat için **gliserol-3-fosfat dehidrojenaz** görev görür (54).



Şekil.2.3.2. Kompleks I, II ve Ubikinon

Kompleks III (sitokrom bc_1 kompleksi, ubikinon-sitokrom c oksidoredüktaz)

Kompleks III (sitokrom bc_1 kompleksi, ubikinon-sitokrom c oksidoredüktaz), elektronları ubikinondan sitokrom c'ye transfer eder ki kompleks III içinden geçen elektronların yolu, “Q siklüsü” denilen bir döngü oluşturur (54).



Şekil.2.3.3. Kompleks III ve sitokrom c

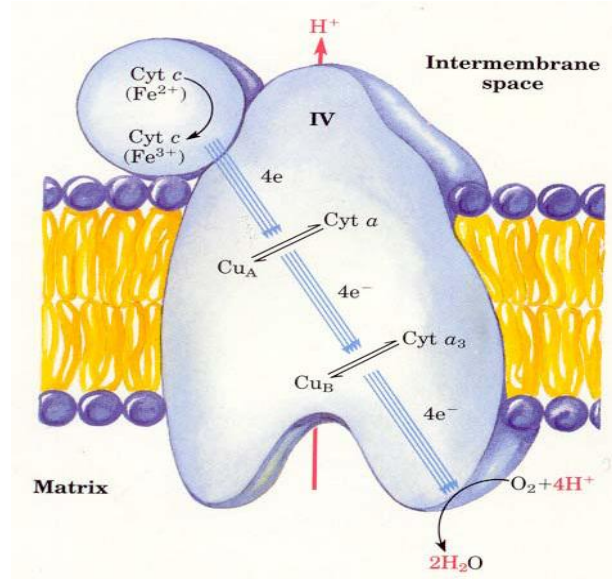
Kompleks III yapısında bulunan sitokrom b, elektronları sitokrom c yapısına aktarmaktadır.

Kompleks III, bir proton pompası olarak fonksiyon görür; kompleksin asimetrik oryantasyonunun bir sonucu olarak, UQH_2 'nin UQ 'a okside olmasıyla serbestleşen protonlar, membranlar arası boşluğa salınırlar ve böylece bir proton gradienti oluşur ki bu proton gradienti, mitokondriyal ATP sentezi için önemlidir (54).

Sitokrom c, elektronları kompleks IV (sitokrom oksidaz) yapısına taşır.

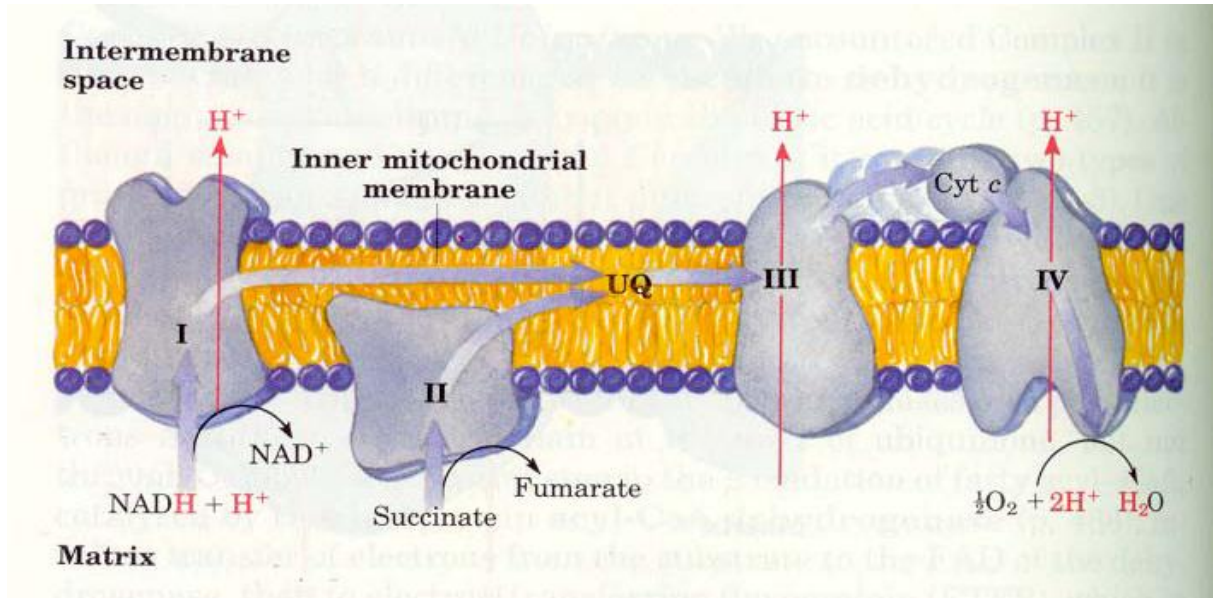
Kompleks IV (sitokrom oksidaz)

Kompleks IV (sitokrom oksidaz), elektronların sitokrom c'den O_2 'ne transferini ve böylece O_2 'in suya indirgenmesini katalize eder (54).



Şekil.2.3.4. Kompleks IV

Kompleks IV yapısında sitokrom a ve sitokrom a₃ bulunur. Kompleks IV vasıtasıyla sitokrom c'den O₂'e elektronların akışı da matriksten membranlar arası boşluğa net proton hareketine neden olur; kompleks IV de bir proton pompası olarak fonksiyon görür. Solunum zincirinin dört kompleksi içinden elektronların ve protonların akışı şu şekilde özetlenebilir (54):



Şekil.2.3.5. Elektron Transport Zinciri

Elektronların aktarılması sırasında elde edilen ve membran boyunca proton gradienti şeklinde depolanan enerji, ATP sentezinde kullanılır. Bir NADH molekülü 3 ATP oluşumunu sağlar; bir FADH_2 molekülü ise 2 ATP oluşumunu sağlar (54).

ATP sentaz

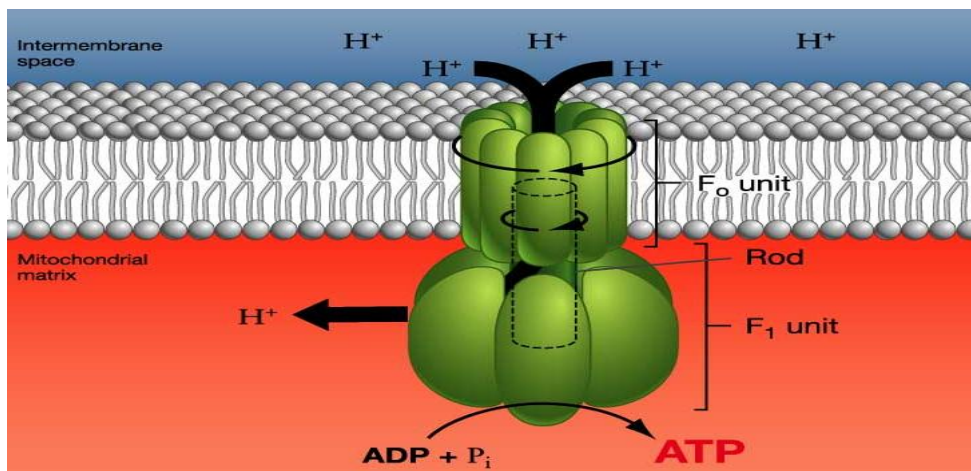
ATP sentaz, iç mitokondriyal membranın ATP sentezleyen enzim kompleksidir; elektron transportu ile ATP oluşumunu eşleyen **kompleks V** olarak da bilinir. **ATP sentaz**, F_o (integral protein) ve F_1 (periferik protein) olmak üzere başlıca iki alt birime sahiptir (54).

Solunum zincirinde elektronların kompleks I, III ve IV üzerinden aktarılması sırasında protonlar matriksten membranlar arası boşluğa pompalanırlar. Protonların matriksten membranlar arası boşluğa pompalanması sonucunda iç membranda bir **proton gradienti** oluşur (54).

Protonlar yüklü partiküller oldukları için proton gradientinin elektriksel özellikleri bulunmaktadır; matriks negatif membranlar arası boşluk pozitif yüklü olduğu için voltaj farkı meydana gelir. Oluşan **elektrokimyasal gradient (pH gradienti ve elektriksel gradient)**, protonların matrikse geri dönmeleri için proton hareket ettirici güç ortaya çıkarır (54).

Bu güç etkisiyle protonlar matrikse geri dönerler ve elektrokimyasal gradientteki enerji, protonların matrikse geri dönmeleri sırasında ATP oluşumunda kullanılır. Oksidatif fosforilasyon olarak bilinen bu olay, **ATP sentaz (kompleks V)** tarafından katalizlenir (54).

Protonların membranlar arası boşluktan matrikse dönüşünde ATP sentazın F_o alt birimi görev alır; ATP sentazın F_1 alt birimi ise ADP ve P_i kullanılarak ATP sentezini gerçekleştirmektedir (54).



Şekil.2.3.6. ATP Sentaz

2.3.1. Mitokondriyal Oksidatif Hasar Mekanizmaları

Serbest radikaller, moleküler yada atomik yörüngesinde çiftleşmemiş elektron bulunduran kimyasal ürünlerdir. Pozitif yüklü, negatif yüklü yada nötral olabilirler. Lipit peroksidasyonu, hücre zarı geçirgenliğini ve hücre zarı protein oksidasyonunu arttırarak hücre zarı işlevini büyük oranda bozarlar . Ateroskleroz, hipertansiyon, iskemi-reperfüzyon hasarı, inflamasyon, kanser, tip II diabetes ile Parkinson ve Alzheimer Hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların patojenezindeki ortak sorun oksidatif hasardır. Ayrıca yaşlanma sürecinde de oksidatif hasarın önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Biyolojik sistemlerde elektron transferi ile oluşurlar (55,56).

Mitokondri solunum zinciri başlıca hücre içi serbest radikal üretim kaynağıdır. Mitokondriler tarafından en fazla üretilen reaktif oksijen radikali süperoksit radikali ve normal solunum zinciri olayları sırasında sürekli olarak süperoksit radikali oluşur (57).

Elektron transport zincirinde kompleksler arası elektron taşınması sırasında kompleks I ve kompleks III dikkate değer biçimde elektron sızdırmaktadır (58). Kompleks I'in elektron sızdıran kısmı matriks içerisinde bulunan NADH dehidrogenaz kısmıdır. Bu kısımdan sızan elektronlar mitokondriyal matriks içerisinde moleküler oksijen ile birleşerek süperoksit (O_2^-) anyonunu oluşturmaktadır (59).

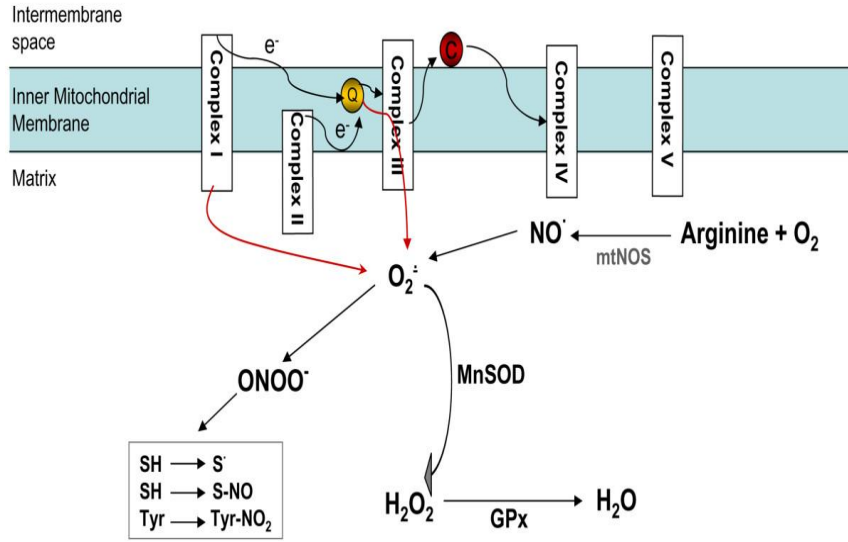
Kompleks I'den sızan elektronların matrikste oluşturduğu süperoksit radikalleri hızla antioksidan enzimler tarafından hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürülmektedir. Hidrojen peroksit bir radikal değildir. Bir çok fizyolojik olayda (düz kasların gevşemesi, hücreler arası sinyal mekanizmaları) görev almaktadır. Fakat, hidrojen peroksit komplekslerin yapılarında bulunan metaller ile etkileşime girdiği zaman (Fenton reaksiyonları), çok reaktif hidroksil radikalini (HO^-) oluşturmaktadır (60).

Kompleks III'ün elektron sızdırdığı düşünülen kısmı ise membranlar arası boşluk kısmında bulunmaktadır ve bu kısma sızan elektronlar mitokondrinin dış membran yapılarına zarar vermekte, sitozole yayılmakta ve hücrenin apoptozunu sağlayan sinyallerin salınmasına neden olmaktadır (61).

2.3.2. Nitrik Oksit'in Mitokondriyal Elektron Transport Zinciri Üzerine Etkisi

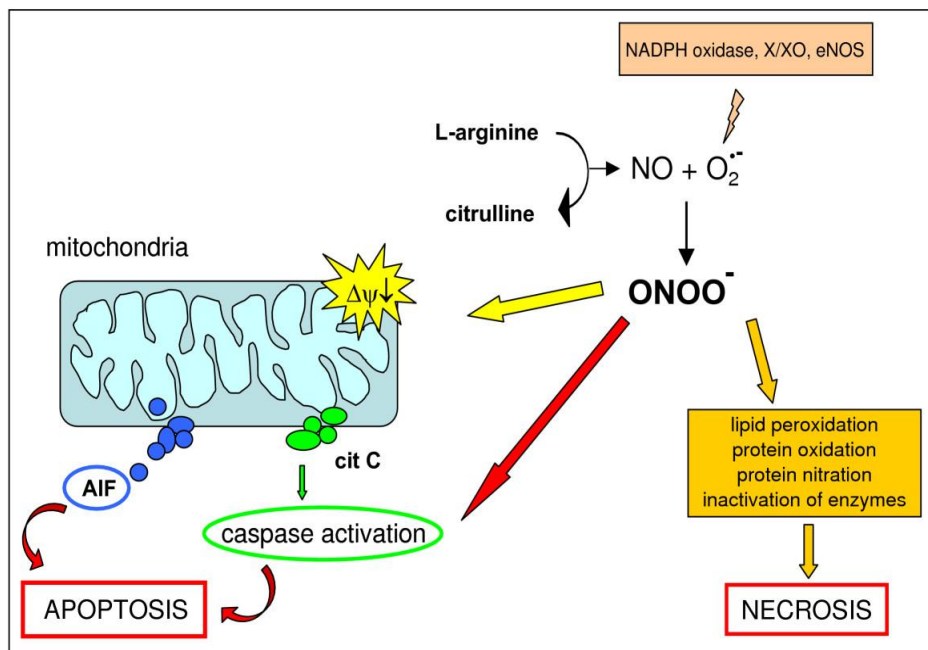
Kompleks I ve III'ten sızdığı düşünülen elektronların oluşturduğu süperoksit ayrıca mitokondride nitrik oksit sentaz tarafından üretilen nitrik oksit (NO) ile birleşerek peroksinitritlerin ($OONO^-$) oluşmasını sağlamaktadır. Peroksinitrit özellikle DNA ve protein yapılarına bağlanarak bu biyolojik yapılarda nitrasyon modifikasyonlarına neden olmakta ve bu modifikasyon proteinlerin

konformasyonel olarak değişimlerine yol açmaktadır ve bu da hücre nekrozunu tetiklemektedir (62).



Şekil.2.3.2.1. Nitrik Oksit'in Mitokondriyal Elektron Transport Zinciri Üzerine Etkisi

NO , çözünür guanil siklazı aktive ettiği konsantrasyonlarda sitokrom c oksidaz enzimini de geri dönüşümlü ve O_2 ile yarışmalı bir şekilde inhibe eder. Bunun nedeni Sitokrom c oksidaz'ın Hem grubu taşıması ve NO 'in Hem grubuna yüksek afinite göstermesidir (63).



Şekil.2.3.2.2. Peroksinitrit ve Hücre Ölümü

Bu enzim sitokrom c-Fe(2+)'yi sitokrom c-Fe(3+)'a oksitlerken moleküler oksijeni suya redükler. Bu sırada mitokondriyal matriksten membranlar arası boşluğa H⁺ transfer edilir. Bu iyonların tekrar matrikse transferi ATP sentezi ile kenetlidir. NO sitokrom c oksidazı inhibe ederek metabolik hipoksi oluşturur. Nitrik oksit tarafından hücre solunumu inhibe edildiğinde mitokondriden bir Ca(2+) çıkışı meydana gelir ve buda Ca(2+) bağımlı proteazların aktive olmasına neden olur (63).

Serbest radikaller sitokrom c'nin sitozole salınmasına neden olur. Kaspaz aktivasyonu başlatılır ve apoptozis uyarılır (64).

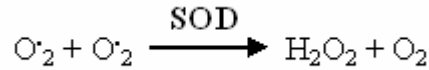
2.3.3. Mitokondriyal Antioksidan Savunma Mekanizmaları

Normal solunum olayları sırasında mitokondrilerde oluşan serbest radikaller antioksidan savunma sistemine ait enzimler tarafından elimine edilirler. Bu enzimler:

Süperoksit Dismutaz (SOD1 ve SOD2)

Ökaryotik hücrelerin farklı fraksiyonlarında farklı tiplerde süperoksit dismutaz vardır. Cu, Zn süperoksit dismutaz (SOD1) mitokondri membranlar arası boşlukta ve Mn süperoksit dismutaz (SOD2) mitokondri matriksinde bulunur. SOD1 aynı zamanda sitozolde de bulunur.

Süperoksit dismutaz'ın major etkisi süperoksit iyonlarını daha az toksik formu olan peroksit iyonuna indirgemesidir.



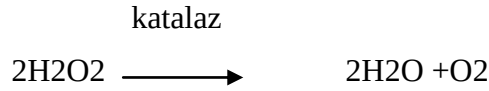
Son zamanlarda yapılan çalışmalarda SOD aktivasyonu için özel proteinlerin gerektiğini gösterilmiştir. Bakır şaperon (CCS1) ve sitokrom c peroksidaz (CCP1) bu proteinlerin örneğidir (65).

Bakır şaperon (CCS1) SOD1'e sitozolik bakırı bağlayan metalloşaperondur. (CCS1) mitokondriyal membranlar arası boşluktaki SOD1'in aktivasyonu için gerekli proteindir (66).

Sitokrom c peroksidaz (CCP1) mitokondriyal antioksidan savunma mekanizmasında bir diğer önemli proteindir. Fonksiyonu H₂O₂'i suya çevirmektir. Hem mitokondriyal membranlar arası boşlukta hemde matrikste bulunur (67).

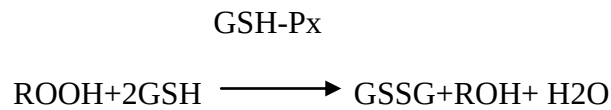
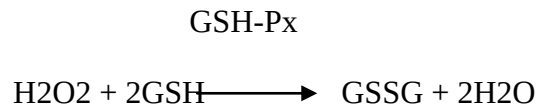
Katalaz

Katalaz yapısında dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Sitozolde ve daha çok peroksizomlarda lokalizedir. H₂O₂'nin O₂ ve H₂O dönüşümünü katalizler (55).



Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Hücrelerde oluşan hidroperoksitlerin detoksifikasyonundan sorumlu bir enzimdir. Tetramerik yapıda olup 4 selenyum atomu içerir. Sitozolik bir enzim olan GSH-Px aşağıdaki reaksiyonları katalizler (55) :



Mitokondriyal Tioredoksin Sistem (TRR2 ve TRX3)

Tioredoksin redüktaz tiyole bağlı hücrel redüklenme olaylarında antioksidan enzim olarak görev alır. Enzim oksidasyon reaksiyonlarında redüktör olarak görev yapan redüklenmiş tioredoksin oluşturur. Ayrıca direkt olarak lipid hidroperoksitlerini redükleme özelliği vardır (68).

Mitokondriyal Glutaredoksin (GRX2 ve GRX5)

Glutaredoksin tiyol disülfid oksidoredüktaz olarak bilinir. İki grup glutaredoksin vardır. Birinci grup glutaredoksinler GRX1, GRX2'dir ve aktif bölgelerinde bir çift sistein vardır. İkinci grup glutaredoksinler GRX3, GRX4, GRX5'tir ve aktif bölgelerinde tek sistein vardır. Bunlardan GRX2 ve GRX5 mitokondride bulunur. GRX2 hem hedef proteinlerin redoks durumundan korunmasında glutasyon-bağımlı disülfid oksidoredüktaz aktivitesine hem de glutasyon peroksidaz aktivitesine sahiptir (69). GRX5 hidroperoksit ve süperoksit radikallerine karşı glutasyon bağımlı oksidoredüktazdır ve solunum komplekslerinin demir-sülfür merkezlerinin sentez ve montajına katılır (70).

3-GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalında gerçekleştirildi. Deneylerde multifonksiyonel mikropate okuyucu (Biotek synergy HT), hassas terazi (Adventurer, OHAUS), vorteks (Labart), santrifüj (Nüve NF 1200R, Nüve NF 800), inkübitör (Biosan) kullanıldı.

Kullanılan cam malzemelerin tümü deiyonize su ile yıkanıp bir gün %20 HNO₃ çözeltisinde bekletildikten sonra, üç kez deiyonize sudan geçirilerek demineralize edildi. Deneylerde kullanılan çözelti ve tamponlar deiyonize su ile hazırlandı.

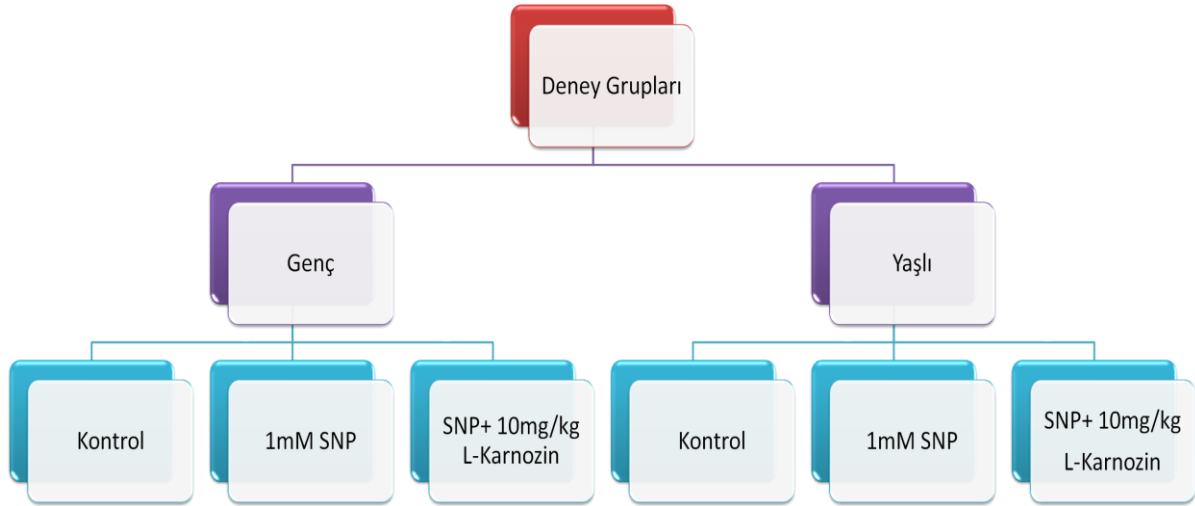
Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler gerekli ortam sıcaklıklarında saklandı.

Deney Grupları

Çalışma Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinden sağlanan 42 adet sıçan üzerinde gerçekleştirildi. Deney hayvanları önce yaşlarına göre (8-10 aylık (genç) ve 18-20 aylık (yaşlı) olmak üzere) iki farklı gruba ayrıldı. Daha sonra bu gruplar kendi aralarında 7'şer adet sıçandan oluşmak üzere 3'e ayrıldı. Gruplar aşağıdaki gibidir;

1. Grup (Genç): Kontrol grubu
2. Grup (Genç): SNP (20 µg/kg) uygulanan grup

3. Grup (Genç): SNP+L-Karnozin (10mg/kg) uygulanan grup
4. Grup (Yaşlı): Kontrol grubu
5. Grup (Yaşlı): SNP uygulanan grup
6. Grup (Yaşlı): SNP+L-Karnozin uygulanan grup



Şekil.3.1. Deney Grupları

Farmakolojik etkileri için sıçanlara i.p. olarak iki hafta süreyle belirtilen dozlar uygulandı. Bu iki hafta uygulama süresinin sonunda sıçanlar ketamin anestezisi ile anestezi edildi. 6-7 ml kan örneği abdominal aorttan alındıktan sonra intrakardiyak KCL enjeksiyonu ile hayatlarına son verildi. Daha sonra kalp ve beyin dokuları izole edilerek homojenize edildikten sonra ultrasonikatör ile parçalandı. Dokular ölçümlere kadar -80°C de saklandı. Kan örnekleri, 5°C 'de 2000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen plazma örnekleri, çalışma gününe kadar, -20°C 'de dondurularak saklandı.

Mitokondri İzolasyonu

6 ml/g beyin dokusu ve kalp dokusu izolasyon mediumu olarak hazırlanan STE (sükroz, Tris ve EGTA solüsyonu; pH :7,4 4°C ; 250 mM sükroz, 5 mM Tris, 2 mM EGTA) solüsyonu içinde ayrı ayrı homojenize edildi. Homojenizatör yaklaşık 10 kez sabit zaman aralıkları ile hareket ettirilerek hazırlanan homojenat, 2000 g'de 8 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar alındı ve 12000 g'de 10 dk tekrar santrifüj edildikten sonra pellet daha sonra yapılacak deneyin

amacına göre resüspanسیون solüsyonu(pH :7.4 ; 4°C ; 140 mM KCL, 20 mM Tris HCL) içinde resüspande edilerek ölçümlere kadar -80°C de saklandı (71-73).

Sitokrom c oksidaz Aktivitesi Tayini

İzole edilen mitokondrilerde sitokrom c oksidaz aktivitesi ölçüldü. Ölçümler sitokrom c oksidaz tarafından ferrositokrom c'nin oksitlenmesi ve ferrositokrom c'nin 550 nm'de absorbandsındaki azalmanın ölçülmesi esasına dayanan sitokrom c oksidaz (SIGMA) kit prosedürüne uygun şekilde yapıldı.

Nitrik Oksit Sentaz Aktivitesi Tayini

Hayvanlara ait plazmalardaki eNOS aktivitesi; eNOS'a ait spesifik monoklonal antikor ile kaplanmış mikropate içeren ticari eNOS (R&D systems) kiti aracılığıyla eNOS bağlanma miktarınca gelişen renk şiddeti 450 nm'de multifonksiyonel mikropate okuyucuda spektrofotometrik olarak tayin edildi.

Total Nitrit-Nitrat Düzeylerinin Tayini

Griess yöntemi (74) ile multifonksiyonel mikropate okuyucuda spektrofotometrik olarak ölçümler yapıldı.

GSH-Px aktivitesi

Alınan plazma örneklerinde ticari kit (Cayman GSH-Px) prosedürüne göre gerçekleştirildi.

SOD aktivitesi

Alınan plazma örneklerinde ticari kit (Cayman SOD) prosedürüne göre gerçekleştirildi.

Lipid Peroksidasyonu (Lipid hidroperoksit tayini)

Alınan plazma örneklerinde lipid hidroperoksit ticari kit (Cayman-Lipid hydroperoxide) prosedürüne göre gerçekleştirildi.

TNF-alfa, IL1beta ve IL-6 düzeylerinin ölçümü

Alınan plazma örneklerinden ticari kit prosedürüne göre gerçekleştirildi.

cGMP ve Guanilat Siklaz Western Blot Protein Tayini

cGMP ve Guanilat siklaz proteinlerinin ekspresyonları Western Blotlama yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

İstatistiksel Analiz

Çalışma gruplarından elde edilen örneklerden ölçülen parametreler Mann-Whitney-U testi ve Student-T testi kullanılarak elde edildi. Anlamlılık düzeyi $p < 0,005$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Hipertansif kriz esnasında kullanılan NO donörü olan SNP ile indüklenmiş nitrozatif hasarda L-karnozinin beyin dokusunda mitokondriyal sitokrom c oksidaz enzim aktivitesi, total nitrit-nitrat düzeyleri ve nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı.

Ayrıca cGMP ve Guanilat Siklaz Aktivitesi aktiviteleri üzerinden L-Karnozinin SNP ile indüklenmiş nitrozatif stresteki ikincil haberci sistemleri üzerinden etki mekanizması aydınlatıldı.

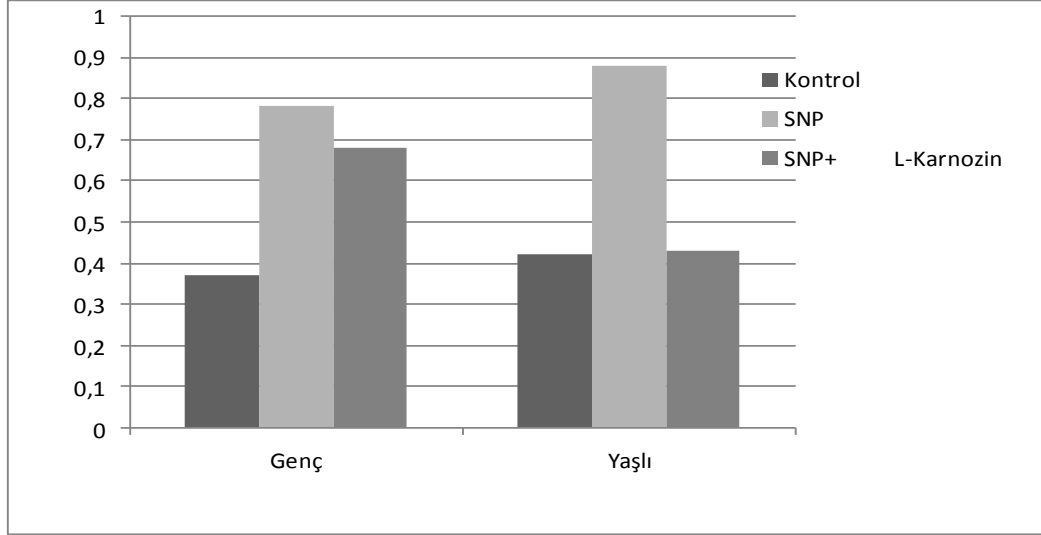
Bunun yanı sıra plazma nitrik oksit sentaz aktivitesi ve plazmada total nitrit nitrat düzeyleri değerlendirildi.

Diğer taraftan plazmada nitrozatif stersin yansıması olarak eritrositlerde lipid peroksidasyonu, GSH-Px ve SOD antioksidan enzim aktiviteleri ve nitrozatif hasarın doku perfüzyonuna yansımasını değerlendirmek üzere eritrositlerin deformabilite özellikleri ölçüldü.

Son olarak ise SNP'nin nitrik oksit üzerinden oluşturduğu nitrozatif hasarın immun sistem ile ilişkisini aydınlatmak üzere ise plazmada TNF-alfa, IL-1beta ve IL-6 düzeyleri ölçüldü ve bütün bu parametreler ışığında hipertansif kriz esnasında sıkça kullanılan sodyum nitroprussidin oluşturduğu nitrozatif hasarın moleküler mekanizması ve beyin dokusu ve kanda oluşturduğu negatif etkilerin L-Karnozin ile giderilip giderilemeyeceği hususu ilk kez bu çalışma ile aydınlatılmaya çalışıldı.

4.1. Beyin dokusunda Mitokondriyal Sitokrom c Oksidaz Aktivitesi

Mitokondriyal sitokrom c oksidaz aktivitesi SNP uygulanan gruplarda artarken L-karnozin uygulaması ile gençlerde ($p<0,05$) ve özellikle yaşlılarda ($p<0,001$) daha anlamlı bir şekilde azalmıştır.

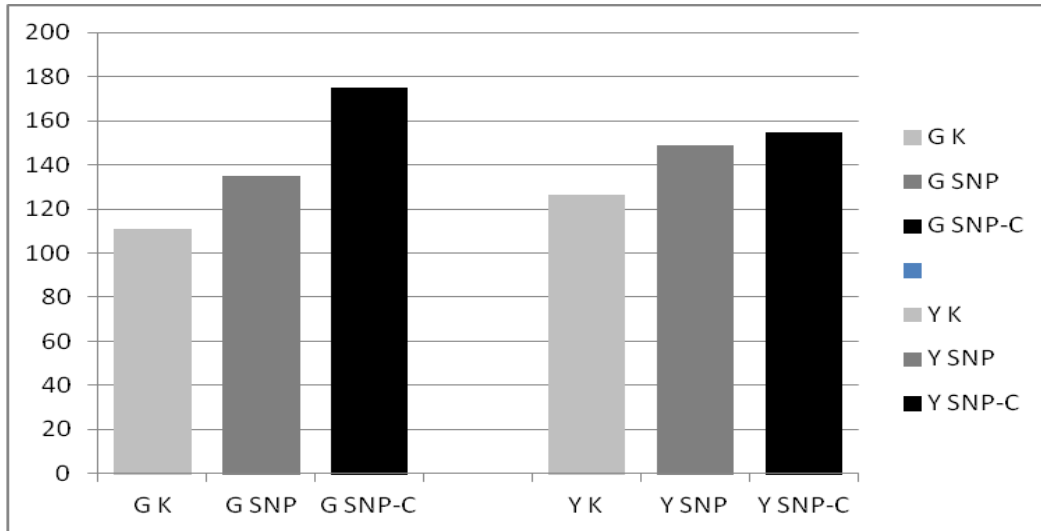


Şekil.4.1.1. Yaşlı ve genç gruplarda mitokondriyal sitokrom c oksidaz aktivitesi

4.2. Beyin dokusunda Nitrik Oksit Sentaz Aktivitesi

Deney hayvanlarına ait beyin mitokondrilerinde ve plazmada nitrik oksit sentaz aktivitesi ölçüldü.

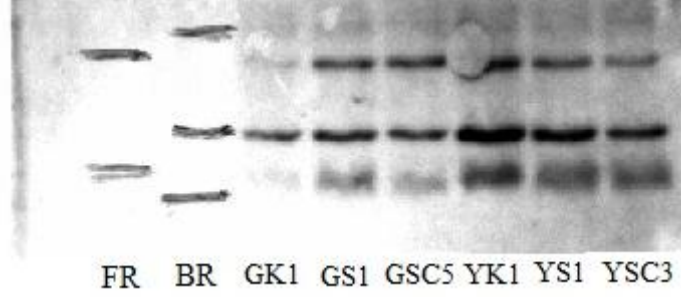
Beyin mitokondrilerinde sodyum nitroprussit uygulaması ile hem genç hem de yaşlı grupta nitrik oksit sentaz aktivitesi kontrollerine göre istatistiksel olarak değişmedi. L-karnozin uygulaması ile NOS aktivitesi gençlerde anlamlı bir şekilde artarken yaşlılardaki artış anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.3.2).



Şekil.4.2.1. Yaşlı ve genç gruplara ait beyin mitokondrilerinde NOS aktivitesi

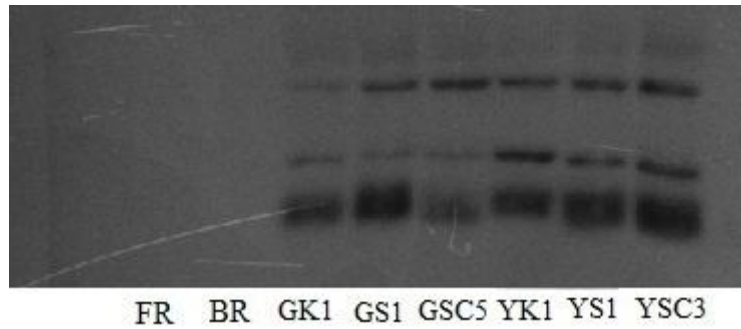
4.3. Beyin Dokusunda cGMP ve Guanilat Siklaz Ekspresyonu

Genç grupta beyin dokusunda cGMP düzeylerinin SNP uygulanan grupta kontrol grubuna göre arttığı ve L-Karnozin uygulaması ile anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Yaşlı grupta ise SNP uygulaması ve L-Karnozin uygulamasının kontrol grubuna göre cGMP düzeylerinin daha az olduğu bulunmuştur.



Şekil. 4.3.1 Beyin dokusunda cGMP protein ekspresyonları

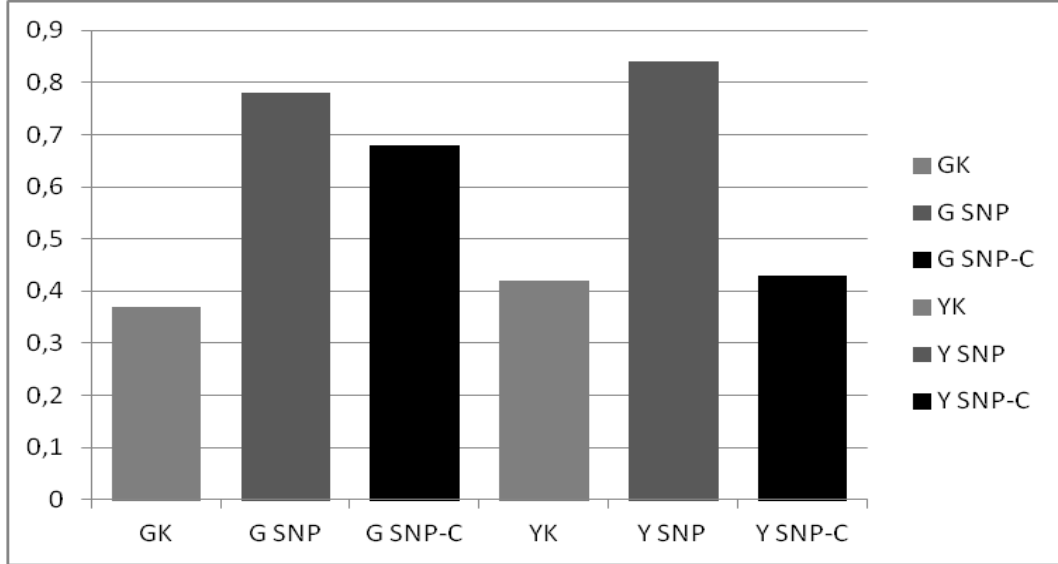
Beyin dokusunda guanilat siklaz ekspresyon düzeyleri incelendiğinde ise genç grupta SNP uygulaması ile guanilat siklaz düzeylerinin arttığı ve L-Karnozin uygulamasının NOS sonuçlarına paralel bir şekilde biraqz daha artış gösterdiği bulunmuştur. Yaşlı grupta ise guanilat siklaz sonuçları cGMP sonuçları ile paralel çıkmıştır.



Şekil. 4.3.2 Beyin dokusunda guanilat siklaz protein ekspresyonları

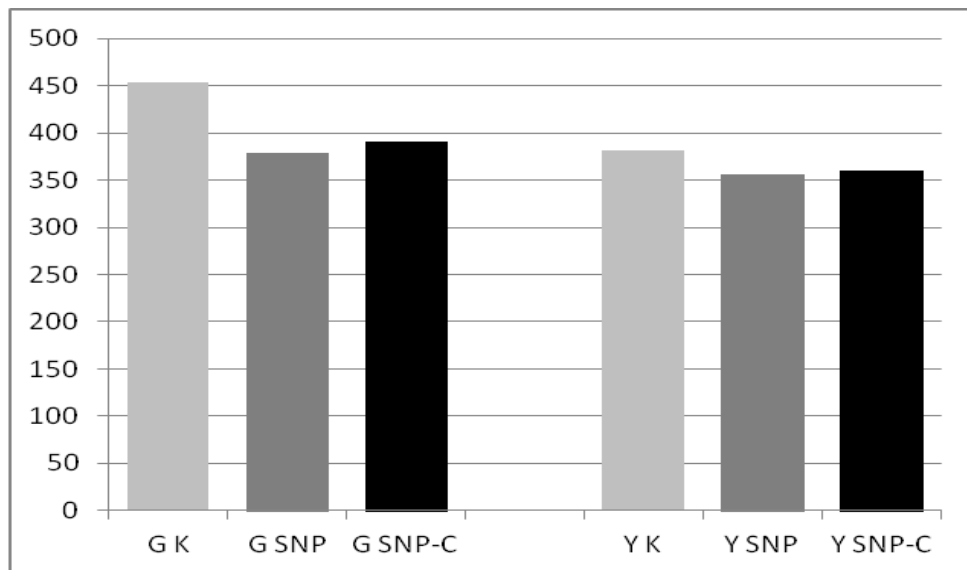
4.4. Plazmada Total Nitrit-Nitrat Düzeyleri, NOS Aktivitesi

Sodyum nitroprussit uygulaması total nitrit-nitrat (NO) düzeylerini her iki yaş grubunda da istatistiksel ($p<0.05$) olarak artırmıştır. L-karnozin uygulaması ise bu düzeyleri önemli derecede ($p<0.05$) azaltmıştır.



Şekil 4.4.1. Yaşlı ve genç gruplarda Total nitrit/nitrat (NO) düzeyleri *: $p<0.05$ #: $p<0.05$

Plazma nitrik oksit sentaz aktivitesinde sodyum nitroprussit ve karnozin uygulaması ile kontrol gruplarına göre anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.3.3).

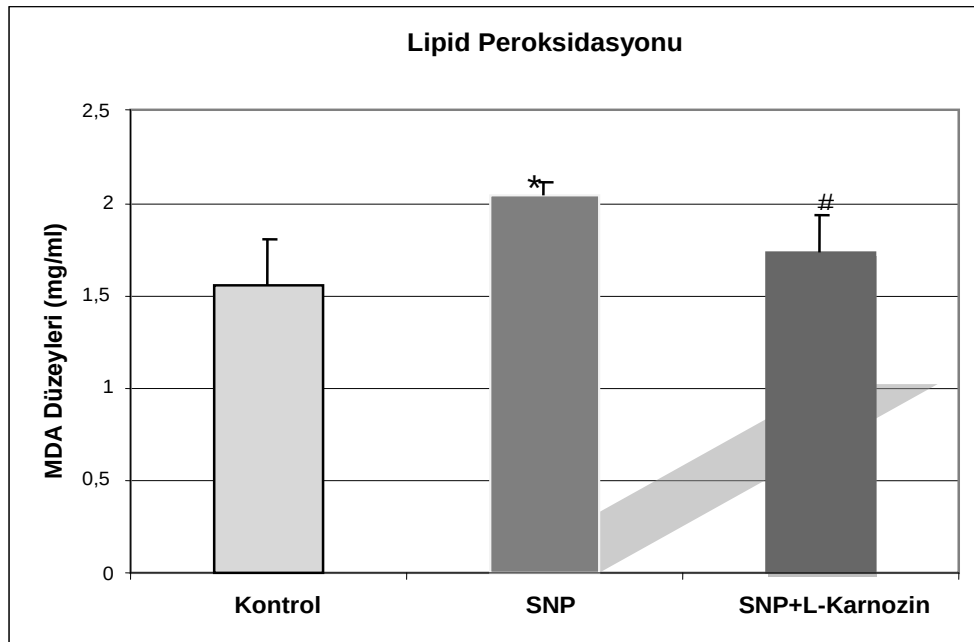


Şekil.4.4.2. Yaşlı ve genç gruplarda plazma NOS aktivitesi

4.5. Eritrositlerde Oksidatif /Antioksidatif Mekanizmalar ile ilgili Bulgular

4.5.1. Eritrositlerde Lipid Peroksidasyonu

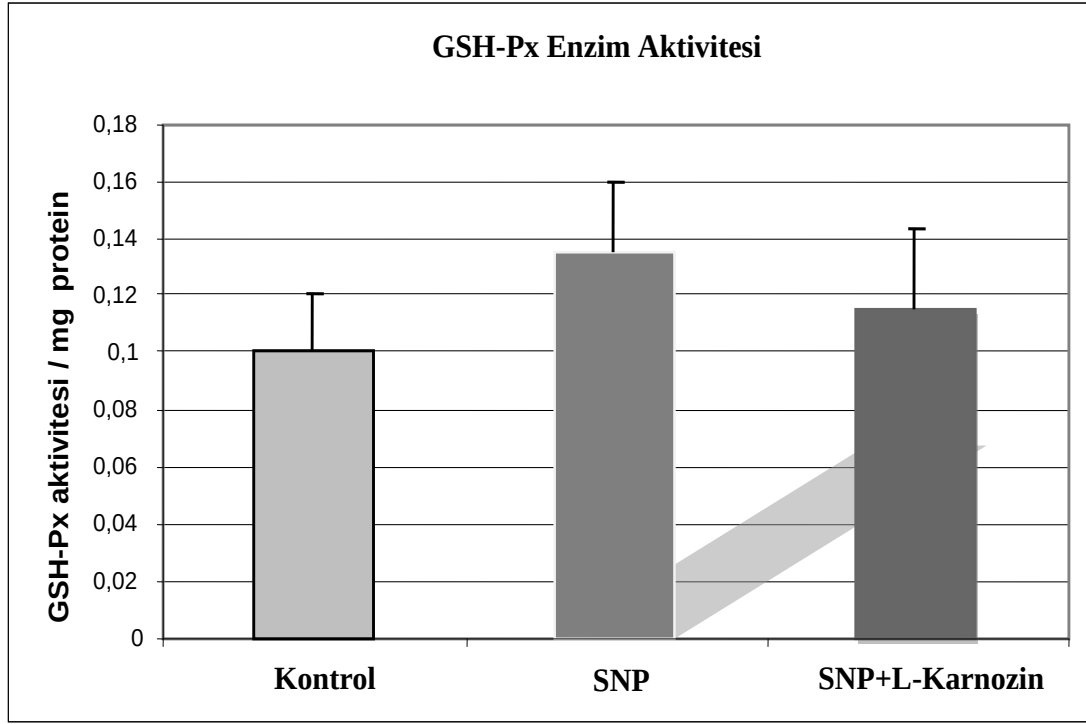
SNP uygulaması oksidatif hasarın bir göstergesi olan MDA düzeyini anlamlı derecede artırırken ($p<0.05$), L-Karnozin uygulaması bu düzeyleri önemli derecede ($p<0.05$) azaltmıştır. SOD ve GSH-Px aktiviteleri de SNP uygulaması ile anlamlı derecede artarken, L-Karnozin uygulaması ile azalarak MDA ile paralel sonuçlar vermiştir ($p<0.05$). Eritrositlerin deformabilite özelliklerinde ise SNP ile hafif bir düşüş gözlenmiş ancak L-Karnozin uygulaması eritrositlerin uzama indekslerini anlamlı derecede artırmıştır ($p<0.05$).



Şekil 4.5.1. Eritrositlerde MDA düzeyleri *: Kontrol grubuna göre $p<0.05$,
#: SNP grubuna göre $p<0.05$

4.5.2. Eritrositlerde GSH-Px Aktivitesi

Eritrositlerde GSH-Px aktivitesi SNP uygulaması ile artmış ($p<0.05$), SNP uygulamasına ilaveten L-Karnozin uygulanan gruba ise SNP uygulanan gruba göre anlamlı derecede azaldığı ($p<0.05$) gösterilmiştir.

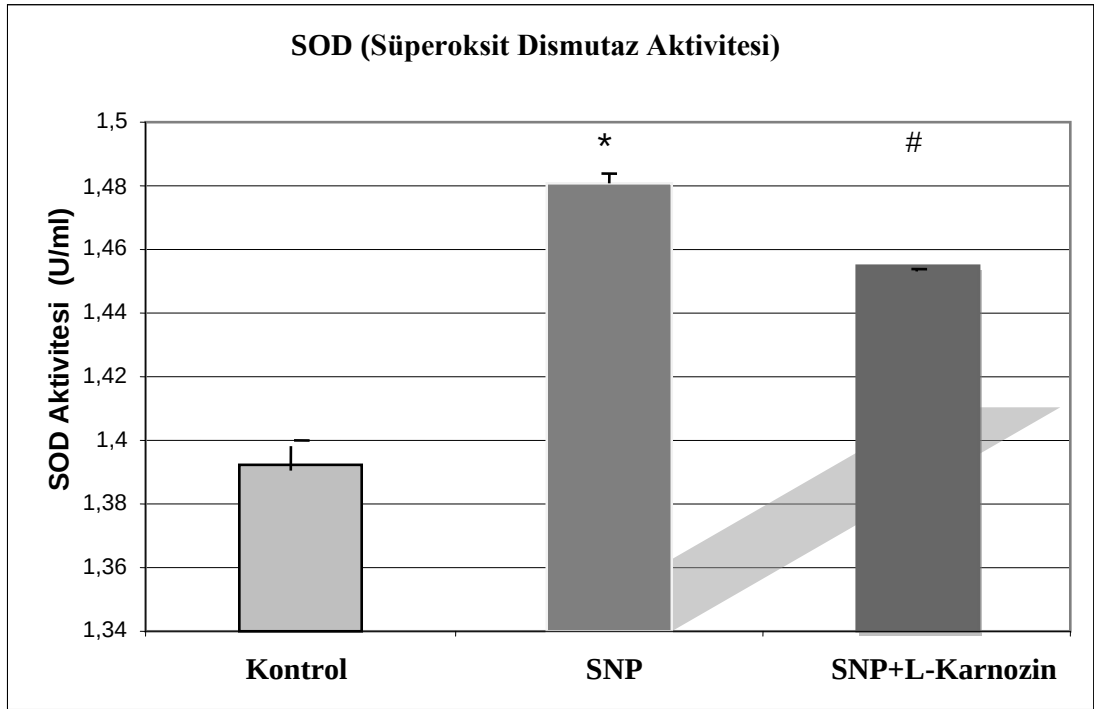


Şekil 4.5.2. Eritrositlerde GSH-Px aktivitesi *: Kontrol grubuna göre $p<0.05$,

#: SNP grubuna göre $p<0.05$

4.5.3. Eritrositlerde SOD Aktivitesi

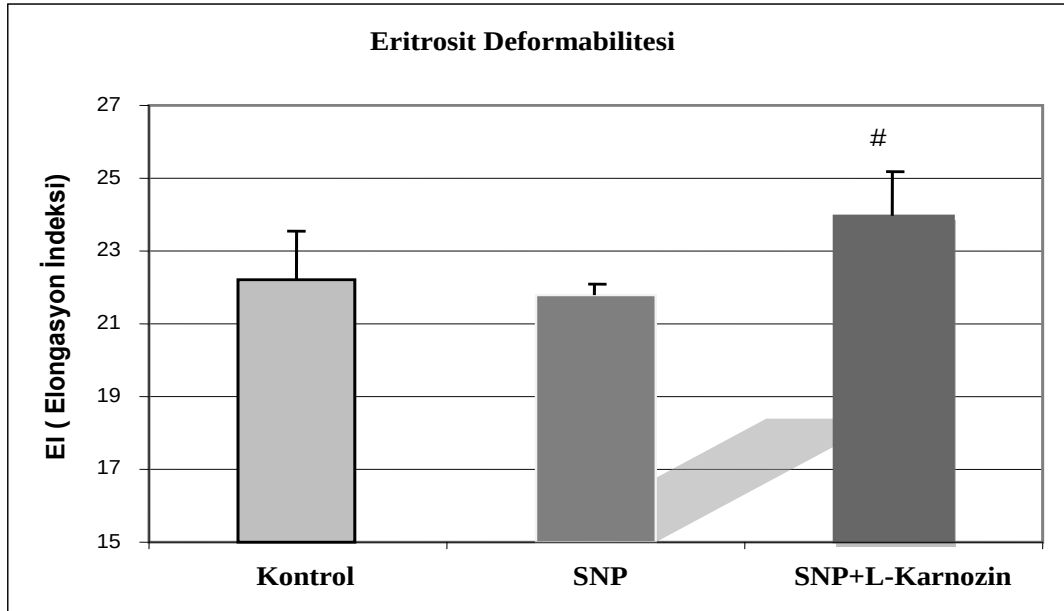
Eritrositlerde GSH-Px aktivitesi SNP uygulaması ile artmış ($p<0.05$), SNP uygulamasına ilaveten L-Karnozin uygulanan grupta ise SNP uygulanan gruba göre anlamlı derecede azaldığı ($p<0.05$) gösterilmiştir.



Şekil 4.5.3. Eritrositlerde SOD aktivitesi *: Kontrol grubuna göre $p<0.05$,
#: SNP grubuna göre $p<0.05$

4.5.4. Eritrositlerin Deformabilite Özellikleri

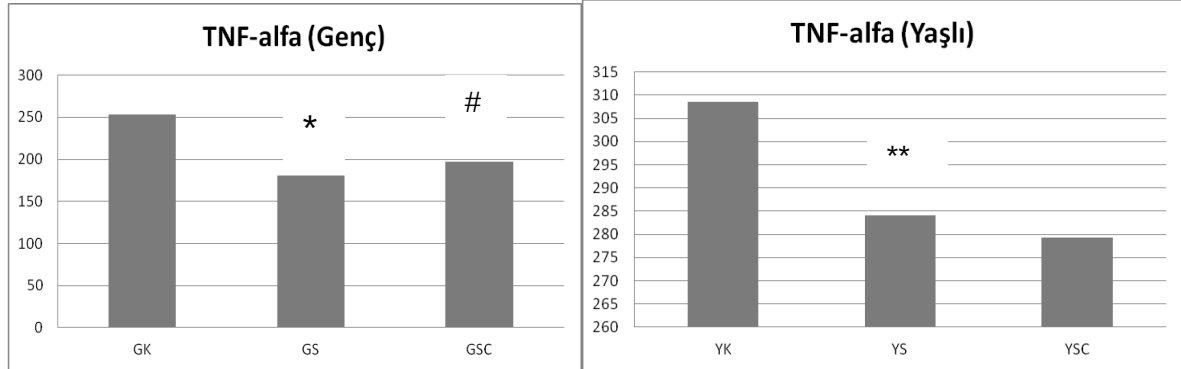
Eritrositlerin deformabilite özelliklerinin bir göstergesi olarak ölçülen uzama indeksi (elongation index :EI) bütün gruplarda SNP uygulaması ile azalmış, L-Karnozin uygulaması ile anlamlı dercede ($p<0.05$) artış göstermiştir.



Şekil 4.5.4. Eritrositlerde uzama indeksi #: SNP grubuna göre $p<0.05$)

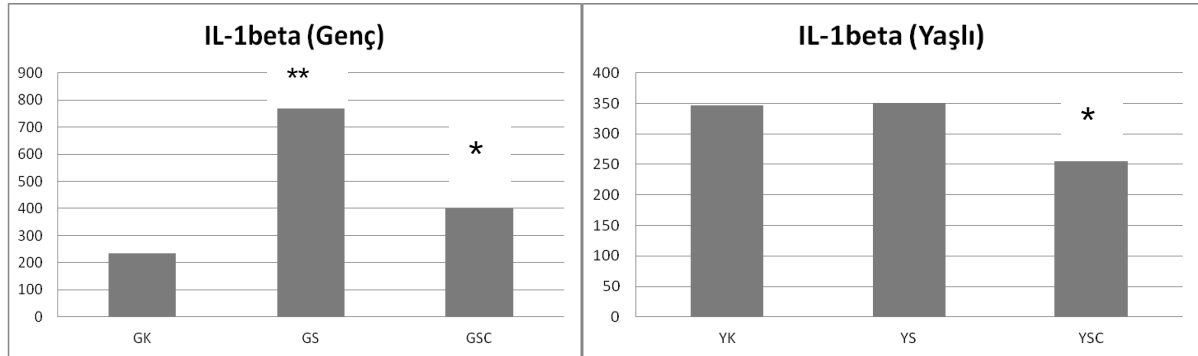
4.5.5. Plazma TNF-alfa, IL-1beta ve IL-6 düzeyleri üzerine L-Karnozinin etkileri

Plazma TNF- alfa düzeyleri hem genç ($p<0.05$) hem de yaşı grupta daha belirgin olmak üzere ($p<0.001$) SNP uygulaması ile azalmıştır. L-Karnozin uygulanması ise TNF-alfa düzeylerini genç grupta artırırken, yaşı grupta SNP grubuna göre anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.



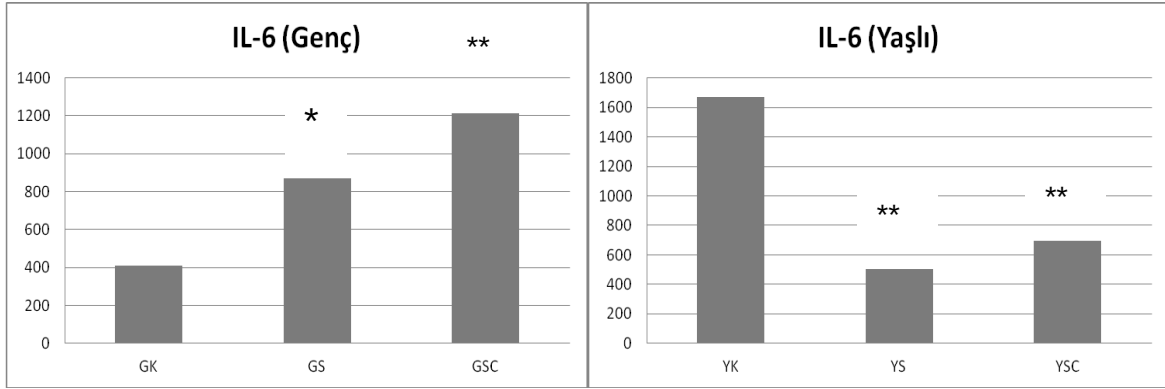
Şekil 4.5.5.1. Plazma TNF-alfa düzeyleri *: Kontrole göre $p<0.05$,
**: Kontrole göre $p<0.001$, #SNP grubuna göre $p<0.05$

Plazma IL-1beta düzeyleri ise genç grupta SNP uygulaması ile anlamlı derecede tetiklenirken ($p<0.001$), L-Karnozin uygulaması ile bu artış önemli derecede ($p<0.05$) önlenebilmiştir. Yaşı grupta ise IL1-beta düzeyleri SNP uygulaması ile değişmezken, L-Karnozin uygulaması bu düzeyleri yine azaltmıştır ($p<0.05$).



Şekil 4.5.5.2. Plazma IL-1beta düzeyleri *: Kontrole göre $p<0.05$,
**: Kontrole göre $p<0.001$

Plazma IL-6 düzeyleri genç grupta SNP uygulaması ile artarken ($p<0.05$) L-Karnozin uygulaması ile daha da yüksek değerlere ulaşmıştır ($p<0.001$). Yaşlılarda ise SNP uygulaması ile anlamlı derecede azalan ($p<0.001$) IL-6 düzeyleri L-Karnozin uygulaması ile az bir artış göstermiştir ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 4.5.5.3. Plazma IL-6 düzeyleri *: Kontrole göre $p<0.05$,
**: Kontrole göre $p<0.001$

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

L-karnozin keşfedilmesinden bu yana antioksidan özellikleri üzerine birçok çalışma yapılmış ve bu özelliği gösterilmiştir. Bu çalışmayla L-karnozinin sodyum nitroprussid ile tetiklenen NO kaynaklı oksidatif strese koruyucu rolü olup olmadığı ilk kez değerlendirildi (5).

Hipertansif kriz esnasında kullanılan NO donörü olan SNP ile indüklenmiş nitrozatif hasarda L-karnozinin beyin dokusunda mitokondriyal sitokrom c oksidaz enzim aktivitesi, total nitrit-nitrat düzeyleri ve nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı.

Ayrıca cGMP ve Guanilat Siklaz Aktivitesi aktiviteleri üzerinden L-Karnozinin SNP ile indüklenmiş nitrozatif streste ikinci haberci sistemleri üzerinden etki mekanizması aydınlatıldı.

Bunun yanı sıra plazma nitrik oksit sentaz aktivitesi ve plazmada total nitrit nitrat düzeyleri değerlendirildi.

Diğer taraftan plazmada nitrozatif stersin yansıması olarak eritrositlerde lipid peroksidasyonu, GSH-Px ve SOD antioksidan enzim aktiviteleri ve nitrozatif hasarın doku perfüzyonuna yansımasını değerlendirmek üzere eritrositlerin deformabilite özellikleri ölçüldü.

Son olarak ise SNP'nin nitrik oksit üzerinden oluşturduğu nitrozatif hasarın immun sistem ile ilişkisini aydınlatmak üzere ise plazmada TNF-alfa, IL-1beta ve IL-6 düzeyleri ölçüldü ve bütün bu parametreler ışığında hipertansif kriz esnasında sıkça kullanılan sodyum

nitroprussidin oluşturduğu nitrozatif hasarın moleküler mekanizması ve beyin dokusu ve kanda oluşturduğu negatif etkilerin L-Karnozin ile giderilip giderilemeyeceği hususu ilk kez bu çalışma ile aydınlatılmaya çalışıldı.

Nitrik oksit (NO), arginin aminoasitinden nitrik oksit sentaz enzimi (NOS) aracılığı ile sentezlenen ve etkisini çözünebilir guanilat siklaza bağlanması ve cGMP'nin aktive olmasıyla gösteren haberci bir moleküldür (45).

Daha önce yapılan in vitro çalışmalarda çözünebilir guanilat siklaz aktivitesi 100µM SNP ile artmış ve indüklenen bu aktivite 1 mM karnozin ile 3 kat, 5mM karnozin ile 5 kat azalmıştır. Önce SNP sonra karnozin uygulandığında inhibisyonun %51, önce karnozin sonra SNP uygulandığında ise inhibisyonun %74 oranında gerçekleştiği görölmüştür (75).

Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre sodyum nitroprussit uygulaması total nitrit-nitrat (NO) düzeylerini her iki yaş grubunda da istatistiksel ($p<0.05$) olarak artırmıştır. L-karnozin uygulaması ise bu düzeyleri önemli derecede ($p<0.05$) azaltmıştır. SNP'in ortama NO salması nedeniyle total nitrit – nitrat düzeyleri artmıştır. L-karnozin uygulaması ile bu düzeylerin azalmasının nedeni L-karnozin'in NO'ı yakalaması olabilir. L-Karnozin'in bu yolak üzerinde cGMP ve guanilat siklaz düzeylerini nasıl etkilediği incelendiğinde ise;

Genç grupta beyin dokusunda cGMP düzeylerinin SNP uygulanan grupta kontrol grubuna göre arttığı ve L-Karnozin uygulaması ile anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Yaşlı grupta ise SNP uygulaması ve L-Karnozin uygulamasının kontrol grubuna göre cGMP düzeylerinin daha az olduğu bulunmuştur.

Beyin dokusunda guanilat siklaz ekspresyon düzeyleri incelendiğinde ise genç grupta SNP uygulaması ile guanilat siklaz düzeylerinin arttığı ve L-Karnozin uygulamasının NOS sonuçlarına paralel bir şekilde biraz daha artış gösterdiği bulunmuştur. Yaşlı grupta ise guanilat siklaz sonuçları cGMP sonuçları ile paralel çıkmıştır.

Mitokondriyal sitokrom c oksidaz aktivitesi SNP uygulanan gruplarda artarken L-karnozin uygulaması ile gençlerde ($p<0,05$) ve özellikle yaşlılarda ($p<0,001$) daha anlamlı bir şekilde azalmıştır. SNP'in ortama saldığı NO nedeniyle sitokrom c oksidaz aktive olmuş olabilir ve L-karnozin'in fazla nitrik oksiti yakalamasıyla sitokrom c oksidaz aktivitesi azalmış olabilir.

NO kendisi (yeni sentezlenen yada dışardan verilen) negatif geri besleme etkisi sonucu NOS'a ait Hem molekülü ile birleşerek NO sentezini inhibe eder. nNOS ve eNOS, iNOS'dan daha çok bu geri besleme mekanizmasından etkilenmektedir (76,77).

Beyin mitokondrilerinde sodyum nitroprussit uygulaması ile hem genç hem de yaşlı grupta nitrik oksit sentaz aktivitesi kontrollerine göre istatistiksel olarak değişmedi. L-karnozin

uygulaması ile NOS aktivitesi gençlerde anlamlı bir şekilde artarken yaşlılardaki artış anlamlı bulunmamıştı. Beyinde is SNP'nin ortama NO salması ve L-karnozin'in bu NO'ı azalmış olması beyin dokusunda NOS aktivitesini tetiklemiş olabilir.

Plazma nitrik oksit sentaz aktivitesinde sodyum nitroprussit ve karnozin uygulaması ile kontrol gruplarına göre anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir

Sonuç olarak L-karnozin özellikle NO düzeylerine ve buna bağlı olarak NOS aktivitesinde optimum şartlarda belirleyici olabilecek modülatör olabilir. NO sinyal yolağını kullanan sepsis, septik şok, migren gibi çeşitli hastalıklarda karnozinin etkilerinin aydınlatılmış olması yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır (78).

Çalışmada L-Karnozin'in sitokinler üzerindeki etkileri de L-Karnozin'in iNOS ile bağlantılı etkilerinin olabileceğini de düşündürmektedir. Bu amaçla iNOS'un tetiklendiği deneysel çalışmalarla bu çalışmalar desteklenebilirse ancak L-Karnozin'in bu açıdan faydaları da daha netlik kazanacaktır.

L-karnozin ile NO sinyal yolağı arasındaki fizyolojik ilişkiyi anlamak için daha fazla çalışma yapılması gerekir.

Ayrıca bu çalışmada ilk kez in vivo olarak L-Karnozin uygulamasının, eritrositlerin deformabilite özelliklerini düzeltici yönde etkilediği gösterilmiştir. L-Karnozin'in SNP ile indüklenen oksidatif hasarda eritrosit membranındaki lipid peroksidasyonunu önemli derecede azaltması ve oksidatif hasarın bu gruplarda azaldığının bir diğer göstergesi olarak antioksidan enzim aktivitelerinin de düşmesi L-Karnozin'in eritrosit membranındaki oksidatif hasarı önlemek suretiyle eritrositlerin deformabilite özelliklerini olumlu yönde etkilediğinin bir göstergesi olabileceğini düşündürmektedir.

Hipertansif krizde sıklıkla kullanılan bir ilaç olan SNP'nin oksidatif etkilerini azaltmak amacı ile L-Karnozin tedaviye yardımcı olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Projede, proje önerisinde belirtilen bütün parametreleri kapsayacak şekilde tamamlanmıştır ve amaçlanan hedefe ulaşabilecek bütün değerlendirmeler yapılmış ve çalışmadan bir adet uluslararası yayın ve biri sozlu olmak üzere uluslararası iki adet bildiri yayınlanmıştır. Ayrıca bildirilerden bir tanesi uluslararası en iyi genç araştırmacı ödülüne layık görülmüş diğeri ise en iyi poster ikinciliği ödülüne layık görülmüştür.

6.KAYNAKLAR

- 1.Gulewitch W, Amiradgibi S.Ber. Dtsch Chem. Ges. 1900;33;1902-1903
2. Hipkiss, A.R., Brownson, C., Carrier, M.J., 2001. Carnosine, the antiageing, anti-oxidant dipeptide, may react with protein carbonyl groups. Mech. Ageing Dev. 122, 1431–1445.
3. Ferraris R. P., Diamond J., Kwan W. W. Dietary regulation of intestinal transport of the dipeptide carnosine. Am. J. Physiol. 1988;255:G143-G150.
4. Johnson, P., Hammer, J.L., 1992. Histidine dipeptide levels in aging and hypertensive rat skeletal and cardiac muscles. Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol. 103, 981–984.
5. Boldyrev AA, Gallant SC, Suhkich GT. Carnosine, the protective, anti-aging peptide. Biosci Rep, 1999, 19 (6), 581-7.
6. Hipkiss AR, Brownson C. Carnosine reacts with protein carbonyl groups: another possible role for the anti-ageing peptide? Biogerontology. 2000 b;1(3):217-23.
7. McFarland GA, Holliday R. Retardation of the senescence of cultured human diploid fibroblasts by carnosine. Exp Cell Res, 1994, 212(2): 167-75.
- 8.McFarlandGA ,Holliday R. Further evidence for the rejuvenating effects of the dipeptide I L--carnosine on cultured human diploid fibroblast. Exp Gerontol 1999 34(1):35-45.

9. Miller DJ, O'Dowd A. Vascular smooth muscle actions of carnosine as its zinc complex are mediated by histamine H(1) and H(2) receptors. *Biochemistry (Mosc)*. 2000 Jul;65(7):798-806.
10. Atlan N, Dinçel A, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Türk Biyokimya Dergisi* 2006; 31 (2); 51-56.
11. Argirova M, Argirov O. Related Articles,Links Inhibition of ascorbic acid-induced modifications in lens proteins by peptides. *J Pept Sci*. 2003 Mar;9(3):170-6.
12. Abe H. Role of Histidine-Related Compounds as Intracellular Proton Buffering Constituents in Vertebrate Muscle. *Biochemistry (Mosc)* 2000;65:7
13. Garibella SE, Sinclair AJ. Carnosine: physiological properties and therapeutic potential, *Age Ageing* 2000, 29: 207-210.
14. Nagai K, Suda T. Immuno-enhancing actions of carnosine and homocarnosine. *Nippon Seirigaku Zasshi*, 1986a, 48 (11):735-40.
15. Nagai K, Suda T. [Antineoplastic effects of carnosine and beta-alanine--physiological considerations of its antineoplastic effects] *Nippon Seirigaku Zasshi*. 1986;48(11):741-7. Japanese.
16. Edwards AD. The pharmacology of inhaled Nitric oxide. *Arch Dis Child* 1995; 72:F127-130
17. Furchgott RF, Zawadzki JV. The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-6.
18. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric Oxide Release Accounts for the Biological Activity of Endothelium-Derived Relaxing Factor. *Nature* 1987; 327:524-6.
19. Palmer RM, Ashton DS, Moncada J. Vascular Endothelial Cells Synthesize Nitric Oxide from L-Arginin. *Nature* 1988;333:664-6.
20. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginin: A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem pharmacol* 1989; 38:1709-15.
21. Palmer RMJ, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; 158: 348-52.

22. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994; 120: 227-37.
23. Moncada S. The L-Arginine nitric oxide pathway. *NEJ Medicine* 1993 ;329; 2002-12
24. Billiar T. Nitric Oxide , Novel biology with Clinical Relevance. *Ann Surgery* 1995: 221 ; 339-349
25. Keaney J.F., Simon D.I., Stamler S.S. et al. NO forms an adduct with serum albumin that has endothelium-derived relaxing factor like properties. *J Clin Invest* 1993 : 91; 1582-1589
26. Richard K. Nitric oxide synthases. *The Biochemist* Nov.1994; 16(5): 3-6
27. Carbett J.A., Tilton R.G., Chang K. et al. Aminoguanidine a novel inhibitor of NO formation, prevents diabetic vascular dysfunction. *Diabetes* 1992 : 4 ; 552-556
28. Yoshifumi I., Bode B.P., Beck D.J. et al. Arginine transport and effects of NOS inhibitors. *Ann Surgery* 1993 : 218 ; 350-363
29. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *The J. Biol. Chem.* 1993; 268 (17): 12231-4.
30. Hua Wan, Yu Amy. Nitric oxide synthase in motor neurons after axotomy. *The J Histochem and cytochem* 1994; 42(4): 451-7.
31. Katayama Y. Nitric oxide: Mysterious messenger. *Dojindo News Letter* 1995; 1:1-20.
32. Durate ID, Lorenzetti BB, Ferreira SH. Peripheral analgesia and activation of NO-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol* 1991; 206: 163-4.
33. Haeflinger IO, Flammer J, Luscher TF. Nitric oxide and endothelium are important regulators of human ophthalmic artery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33(7):2340-8.
34. Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, Slama K. Inhaled nitric oxide for adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1993; 328: 399-402.
35. Burnett AL, Lowenstein CJ, Brecht DS. Nitric oxide a physiologic mediator of penile erection. *Science* 1992; 257: 401- 3.
36. Stark ME, Szurszewski JH. Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function disease. *Gastroenterology* 1992; 103: 1928-49.

37. Bachmann S, Mundel P. Nitric oxide in the kidney: Synthesis, localisation and function. *Am. J Kidn Dis.* 1994; 24 (1): 112-29.
38. Bossenge E. Coronary vasomotor responses: role of endothelium and nitrovasodilators. *Cardiovasc Drug Ther (USA)* 1994; 8(4): 601-10.
39. Muuruganandam A, Mutus B. Isolation of nitric oxide synthase from human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;165: 802-9.
40. Radomski MW. Endogenous nitric oxide inhibits platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1988; 11: 1057-8.
41. Usmar VD, Radomski M. Free radicals in the vasculature: The good, the bad and the ugly. *The Biochemist* 1994; 16(5): 15-22.
42. Dunlop NE, Benjamin HW and Briles ED. The intracellular nature of salmonella infection. *Macrophage* 1994; 18: 303-12.
43. Croen KD. Evidence for an antiviral effect of NO. *J Clin Invest* 1993; 91: 2446-52.
44. Kwon NS, Stuehr DS, Nathan CF. Inhibition of tumor cells ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 179: 442-8.
45. Arbaş D. Nitrik oksit: Fizyolojik önemi ve çeşitli hastalıklardaki Rolü. *Klinik Gelişim* 1998 :11; 376-80
46. Mizutani T., Layon J.A. Clinical applications of nitric oxide. *Chest* 1996;110; 506-524
47. Lowenstein C.J., Snyder S.H. Nitric Oxide a novel biologic messenger. *Cell* 1992 : 70 ; 705-707
48. Southan G.J., Szabo C. Selective Pharmacological Inhibition of Distinct NOS Isoforms. *Biochem Pharma* 1996; 51; 383 -394
49. Junqueira LC, Carneiro J, Kelly RO. Mitochondria. In: Junqueira LC, Carneiro J, Kelly RO eds. *Basic Histology*. Chapter 2. 8th edition. Appleton and Lange. Connecticut. 199;27-29.
50. Palade GE. An electron microscope study of mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem* 1953;1:188-211.
51. Başaran A, Tıbbi Biyoloji, 7. Baskı, Güneş&Nobel Tıp Kitapevleri 2005; ss 89-91

52. Herrmann JM, Neupert W. Protein transport into mitochondria. *Curr Opin Microbiol* 2000;3:210-214.
53. Mayes PA. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. In: Murray RK, Granner DK., Mayes PA., Rodwell VW eds. *Harper's biochemistry*. 24th edition. Section II. Appleton and Lange. Connecticut. 1996;123-134.
54. Altınışık M, Hücre enerji metabolizması. Erişim: [http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-20.pdf], Erişim tarihi: 2 Kasım 2009
55. Akkuş İ. Serbest radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Baskı, Mimoza Yayınları , Konya 1995
56. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(1):44-84.
57. Atlan N, Dinçel A, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Türk Biyokimya Dergisi* 2006; 31 (2); 51-56.
58. Brand, M. D., Affourtit, C., Esteves, T. C., Green, K., Lambert, A. J., Miwa, S., ve ark. (2004). Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med.*, 15;37(6), 755-67.
59. Grivennikova, V. G. ve Vinogradov, A. D. (2006). Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochim Biophys Acta*, 1757(5-6), 553-61.
60. Cadenas, E. ve Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med.* 29(3-4), 222-30.
61. Nohl, H., Gille, L., Kozlov, A. ve Staniek, K. (2003). Are mitochondria a spontaneous and permanent source of reactive oxygen species? *Redox Rep.*, 8(3), 135-41.
62. Radi, R., Cassina, A., Hodara, R., Quijano, C. ve Castro, L. (2002). Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med.*, 33(11), 1451-64.
63. Büyükaşar K, Nitrik Oksitin Fizyolojik ve Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü, Farmakoloji Eğitim Sempozyumları Programı *Nitrik oksitin Farmakolojisi* , Mersin 27 Mayıs 2005, ss 8.
64. Rodriguez, J., Lazebnik, Y., (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* 13, 3179-3184.

65. Sturtz, L.A., Diekert, K., L.T. Jensen, L.T., Lill, R., Culotta, V.C., 2001. "A Fraction of Yeast Cu,Zn-Superoxide Dismutase and Its Metallochaperone, CCS, Localize to the Intermembrane Space of Mitochondria", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276, No.41, p. 38084–38089.
66. Schmidt, P.J., Gomez, MR., Culotta, V.C, 1999. "A Gain of Superoxide Dismutase (SOD) Activity Obtained with CCS, the Copper Metallochaperone for SOD1: A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 274, No. 52, p. 36952–36956.
67. Daum, G., Bohni,P.C., Schatzg, G., 1982. "Import of Proteins into Mitochondria: Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 257, No. 21, p. 13028-13033.
68. Pedrajas, R.J., Kosmidou, E., Vizuite, A.M., Gustafsson, J.A., Wright, A.P.H., Spyrou, G., 1999. "Identification and Functional Characterization of a Novel Mitochondrial Thioredoxin System in *Saccharomyces cerevisiae*", *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 274, No. 10, p. 6366–6373.
69. Collinson, E.J., Wheeler, G.L., Garrido, E.O., Avery, A.M., Avery S.V., Grant, C.M., 2002. "The Yeast Glutaredoxins Are Active as Glutathione Peroxidases", *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 277, No. 19, p. 16712–16717.
70. Manzanque, M.T.R., Tamarit, J., Belli, G., Ros, J., Herrero, E., 2002. "Grx5 Is a Mitochondrial Glutaredoxin Required for the Activity of Iron/Sulfur Enzymes", *Molecular Biology of the Cell*. Vol. 13, p. 1109–1121.
71. Martin M, Macias M, Leon J, Escames G, Khaldy H, Acuna- Castroviejo D. Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in the rat brain on liver mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34 (4) : 348-357
72. Simon N, Papo K, Vidal J, Boulamery A, Bluguerolle B Circadian Rhythms of oxidative Phosphorylation: Effects of rotenone and melatonin on isolated rat mitochondria. *Chronobiol Intern* 2003; 20 (3) : 451-461
73. Weinberg JM, Venkatachalam MA, Roeser NF, Nissim I. Mitochondrial dysfunction during hypoxia/reoxygenation and its correction by anaerobic metabolism of citric acid cycle intermediates. *Proc. Natl Acad Sci USA* 200 Mar 14 ; 97(6): 2826-31

74. Mosaghe H, Kok B. Nitrite and nitrate determinations in plasma. A critical evaluation. Clin Chem 1995; 41(6): 892-896.
75. I. S. Severina, O. G. Bussygina, and N. V. Pyatakova Carnosine as a Regulator of Soluble Guanylate Cyclase Biochemistry (Moscow), Vol. 65, No. 7, 2000, pp. 783- 788. Translated from Biokhimiya, Vol. 65, No. 7, 2000, pp. 921-927
76. Ignarro LJ, Physiology and Pathophysiology of NO, Kidney International , 1996, 49, Suppl 55, S2-S5
77. Baron AD, The Coupling of Glucose Metabolism and Perfusion in Human Skeletal Muscle. The Potential Role of Endothelium-Derived Nitric Oxide. Diabetes 1996, 45, Suppl 1, p S105-9
78. Hobbs, A. J. (1997) TIPS, 18, 484-491.

Projeden Üretilen Bildiri, Yayın ve Ödüller

Uluslar arası sözlü bildiri, en iyi genç araştırmacı ödülü almıştır:

- **Yerer M.B.,** B. Aydoğan, S. Aydoğan. Sodium nitroprusside-induced oxidative damage on erythrocytes: protective role of L-carnosine. 3rd Eurosummer School on Biorheology and Syposium on Micro and Nano Mechanics and Mechanobiology of Cells, Tissues and Systems, 29 Ağustos-2 Eylül 2009, Borovets, Bulgaristan (*Nitrik oksit donörünün elongasyon indeksi, MDA, SOD, GSH-Px üzerine in vivo etkisi, L Karnozinin rolü ve genel derleme*)

Uluslararası hakemli dergide şimdiye kadarki elde edilen veriler tam metin makale olarak yayınlanmıştır:

- **Yerer MB,** Aydoğan B, Aydoğan S. Sodiumnitroprusside induced oxidative damage on erythrocytes:protective role of L-Carnosine. Series on biomechanics 25(1-2); 194-198: 2010 (**tam metin**)

Ulusal Sinir Bilimleri kongresinde projeden üretilen poster bildirisi en iyi poster ikincilik ödülü almıştır:

Yerer MB, Odabaşı B, Aydoğan B, İnandır M, Aydoğan S. L-Karnozin ‘in Nitrosatif Streste Beyinde Mitokondrial Sitokrom C Oksidaz Aktivitesi Uzerine Etkisi, 9. Ulusal Sinir Bilimleri Kongresi 13-17 Nisan 2010, İstanbul, Türkiye. (*Nitrik oksit donörü uygulamasında L Karnozin’in NO, Sitokrom C oksidaz üzerine etkileri değerlendirilmiştir*)