

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI FLUORESAN PROBLARIN FİBROBLAST
HÜCRELERDE OLUŞTURULAN OH[•]
RADİKALLERİNİN ÖLÇÜMÜNDE
KULLANILMASI VE DEĞERLENDİRİLMESİ**

REZA SALIMI

MOLEKÜLER TIP
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2013

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2009970216

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI FLUORESAN PROBLARIN FİBROBLAST
HÜCRELERDE OLUŞTURULAN OH⁻
RADİKALLERİNİN ÖLÇÜMÜNDE
KULLANILMASI VE DEĞERLENDİRİLMESİ**

MOLEKÜLER TIP

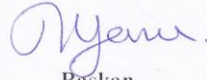
YÜKSEK LİSANS TEZİ

REZA SALIMI

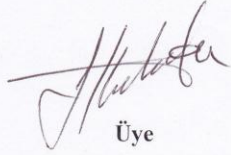
Danışman Öğretim Üyesi: Yard. Doç. Dr. Nilgün Yener

Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
DEU 2011-KB-SAG-065 proje numarasıyla desteklenmiştir.

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Yüksek Lisans programı öğrencisi Reza Salimi tarafından gerçekleştirilen “Yeni Sentezlenen Fluoresans Problemlerin Fibroblast Hücrelerde Oluşturulan OH⁻ Radikallerinin Belirtiminde Kullanılması ve Değerlendirilmesi” konulu Yüksek Lisans tezini 05.11.2013 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.


Başkan

Yard. Doç. Dr. Nilgün YENER


Üye

Prof. Dr. Semra KOÇTÜRK


Üye

Prof. Dr. Gül GÜNER AKDOĞAN

Yedek Üye

Yard. Doç. Dr. Zahide ÇAVDAR

Yedek Üye

Doç. Dr. Ali Rıza ŞİŞMAN

İÇİNDEKİLER	Sayfa No
TABLO DİZİNİ.....	III
ŞEKİLLER DİZİNİ	IV
KISALTMALAR.....	V,VI
TEŞEKKÜR	VII
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1.GİRİŞ VE AMAÇ	5
2.GENEL BİLGİLER	8
2.1. Reaktif Oksijen Türleri ve Oluşumu	8
2.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynağı	9
2.3. Anti Oksidan Sistem.....	11
2.4. ROT ların Hastalıklarla İlişkisi.....	12
2.5. OH [•] Radikali.....	13
2.6. Spektroskopik Yöntemler.....	14
2.7. Floresans Ölçümlerde Temel İlke.....	15
2.8. Spektroskopik Yöntemlerde Kullanılan Problar.....	16
2.9. OH [•] Radikallerinin Saptanmasında Kullanılan Floresan Problar.....	18
2.10. Spektroskopik Yöntemlerde Analitik Performansın Değerlendirilmesi.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Araştırmanın Tipi	21
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	21
3.3. Araştırma Evreni ve Örneklemi/ Çalışma Grupları.....	21
3.4. Çalışma Materyali	21
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	21
3.6. Veri Toplama Araçları.....	22
3.6.1. Hücre Çözülmesi	22
3.6.2. Hücre Kültürü	22
3.6.3. Hücre Sayımı ve Canlılık Testi	23

3.6.4. Radikal Oluşturma ve Floresans Ölçümler.....	24
3.6.5. Optimize Koşullarda Radikal Oluşturma ve Floresans Ölçümler.....	25
3.6.6. Deneylerin Akış şeması.....	27
3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi.....	29
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	29
3.8.1. Analitik Performansın Değerlendirilmesi.....	30
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	30
3.10. Etik Kurul Onayı	30
4.BULGULAR.....	31
4.1. Hücre Sayısının Optimizasyonu.....	31
4.2. H ₂ O ₂ Optimizasyonu	32
4.3. DMSO Optimizasyonu	33
4.4. Fe-EDTA Optimizasyonu.....	34
4.5. Askorbik Asit Optimizasyonu	35
4.6. HPF Probu İçin İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu.....	36
4.7. Kumarin İçin İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu.....	37
4.8. HPF Probusunun Optimizasyonu.....	38
4.8.1. HPF Probusunun Işıma şiddetini Etkileyen Parametreler.....	39
4.9. Kumarin Optimizasyonu.....	40
4.9.1. Kumarin Eksitasyon Dalga Boyu Optimizasyonu.....	40
4.9.2. Kumarin Konsantrasyonunun Optimizasyonu.....	41
4.9.3. Kumarin Probusunun Işıma şiddetini Etkileyen Parametreler.....	42
4.10. HPF ve Kumarin Problearı için Standart Grafikleri.....	43
4.11. Deney içi Tekrarlanabilirlik (Kesinlik)	44
4.12. HPF ve Kumarin Problearının Optimize Koşullardaki Ölçüm Değerlerinin karşılaştırılması	46
5. TARTIşIMA	47
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	52
7. KAYNAKLAR	53
8. EKLER	58

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Fluoresan problar	26
Tablo 2. Araştırma planı	29
Tablo 3. HPF ve Kumarin probları için hesaplanan SD, RE, %CV ve tekrarlanabilirlik.....	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Mitokondriyal ROT Üretiminin Şematik Gösterimi	9
Şekil 2. ROT ve RNT kaynakları.....	10
Şekil 3. Serbest radikallerin ve oksidanların fizyolojik etkileri	12
Şekil 4. Organik substratların varlığında Fenton Sistemindeki olası reaksiyon yolları.....	14
Şekil 5. Jablonski Diyagramı.....	16
Şekil 6. Hücre kültürü deneyleri.....	23
Şekil 7. Hemositometrik olarak hücre sayımında kullanılan Neubauer Lamı görüntüsü	23
Şekil 8. Hücrenin farklı konsantrasyonlarında fluoresans ışıma şiddetindeki değişim.....	31
Şekil 9. H ₂ O ₂ nin farklı konsantrasyonlarında ışıma şiddetinin değişimi.....	32
Şekil 10. DMSO nın farklı konsantrasyonlarında ışıma şiddetinin değişimi.....	33
Şekil 11. Fe-EDTA'nın farklı konsantrasyonlarında ışıma şiddetinin değişimi.....	34
Şekil 12. Askorbik asitin farklı konsantrasyonlarında ışıma şiddetinin değişimi.....	35
Şekil 13. HPF'nin farklı zaman dilimlerindeki ışıma şiddetleri	36
Şekil 14. Kumarinin farklı zaman dilimlerindeki ışıma şiddetleri	37
Şekil 15. HPF'nin farklı konsantrasyonlarındaki ışıma şiddetleri	38
Şekil 16. HPF, karışım, hücre ve ortamının ışıma şiddetleri.....	39
Şekil 17. Kumarinin farklı dalga boylarındaki ışıma şiddetlerinin değişimi	40
Şekil 18. Kumarinin farklı konsantrasyonlarındaki ışıma şiddetleri	41
Şekil 19. Kumarin, karışım, hücre ve ortamının ışıma şiddetleri.....	42
Şekil 20. HPF Probu İçin Standart Eğrisi.....	43
Şekil 21. Kumarin Probu İçin Standart Eğrisi.....	44
Şekil 22. Kumarin ve HPF problemlerinin ve yalnızca hücrelerin yapmış oldukları ışıma şiddetleri.....	46

KISALTMALAR

ROT: Reaktif Oksijen Türleri

ROS: Reactive Oxygen Species

OH•: Hidroksil radikali

O₂^{•-}: Super oksit radikali

Kumarin: Kumarin-3-karboksilik Asid

HPF: 2-[6-(4V-Hidroksi)fenoksi-3H-ksanten-3-on-9-yl]benzoik asid

APF: 6-(4-amino)Fenoksi-3H-ksanten-3-on-9-yl]benzoik asid

FBS: (*Fetal Bovin Serum*) Fötal Sığır Serumu

DMEM: Dulbecco's Modifiye Eagle Ortamı (Medium)

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

RNT: Reaktif Azot Türleri

ESR: Elektron Spin Rezonans

EPR: Electron Paramanyetik Rezonans

DCFH: 2',7'- diklorodihidrofluoresein

NO•: Nitrik Oksit radikali

NO₂•: Nitruz oksit radikali

HNO₂: Nitrit (Nitröz) Asidi

UV: Ultra viyole

SOD: Süperoksit dismutaz

GSH-Px: Glutasyon peroksidaz

GST: Glutasyon S-Transferazlar

CAT: Katalaz

BHT: Bütillenmiş hidroksitoluen

BHA: Bütillenmiş hidroksianizol

DCF: 2',7'-diklorofluoresein -diklorofluoresein

DCFH-DA: 2',7'-d diklorodihidrofluoresein diasetat

DHR 123: Dihidrorodamin 123

PF-H2TMRos: 2,3,4,5,6-pentafluorodihidrotetrametilhidrozamin

HLE: Hepatoselüler karsinom hücresi
ARPE-19: Retinal pigment epitelyal hücresi
RGC-5: Retinal gangliyon hücresi
MSC: Thermo Scientific Cabinet
EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit
PBS: Fosfat Tamponlu Tuz (*Phosphate Buffered Saline*)
DMSO: Dimetil sulfoksid
KH₂PO₄: Monopotasyum fosfat (*potassium dihydrogen phosphate*)
HPPA: 3-(4-hidroksifenil)propiyonik asit
MNP: 2-metil-2-nitrosopropanE
CP-H: 1-hidroksi-3-karboksi-pirolidin
NBT: Nitro Blue Tetrazolium
CLA: 2-Metil-6-fenil-3,7-dihidroimidazo (1,2-a)-pirazin-3-on
CHD: 1,3-Siklohegzanedion
FL: Fluoresein

Teşekkür

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca yaptığı her türlü katkıdan dolayı başta danışmanım Yard. Doç. Dr. Nilgün Yener'e ve bilimsel desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Semra Koçtürk'e çok teşekkür ediyorum. Ayrıca her türlü destekleri için Prof. Dr. Gül Güner hocama sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Doç Dr. Ali Rıza Şişman hocama değerli katkı ve yardımları için çok teşekkür ediyorum. Gerek laboratuvar çalışmalarım sırasında gerekse tez yazım sırasında bana yardımcı olan bütün arkadaşlarıma teşekkür ediyorum. Benim bu günlere gelmemde çok yoğun emekleri olan, maddi ve manevi desteklerini benden sakınmayan değerli aileme şükran ve minnet duygularıyla sonsuz teşekkürler ediyorum.

BAZI FLUORESAN PROBLARIN FİBROBLAST HÜCRELERDE OLUŞTURULAN OH• RADİKALLERİNİN ÖLÇÜMÜNDE KULLANILMASI VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Reza Salimi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İnciraltı-İzmir, Türkiye, rezasalimitr@yahoo.com

ÖZET

Vücutta sentezlenen ve pro-oksidan olan reaktif oksijen türleri (ROT, *ROS Reactive Oxygen Species*) yaşam için son derece gereklidirler ve birçok işlevleri vardır. Vücutta fazla miktarda üretildiklerinde ya da antioksidan seviyesi düştüğünde bu reaktif türler çok zararlı olabilirler ve oksidatif stresi artırırılar. ROT 'ların saptanması için en çok 'Elektron Spin Rezonans', 'Fluoresans', ve 'Lüminesans' Spektroskopileri kullanılır. Floresans problar mükemmel sensörler olarak ROT 'ları daha spesifik ve duyarlı olarak saptarlar ve her reaktif tür için farklı problar dizayn edilmiştir.

OH• radikali, reaktif oksijen türlerinden bir serbest radikal olup hücrede yağlara, proteinlere ve DNA'lara bağlanarak dönüşümsüz hasarlar oluşturabilir. Patolojik etkilerinden en önemlisi, doğrudan nükleik asit ve proteinlere bağlanmasıdır. Serbest radikaller hem çok reaktif hem de yarılanma ömürleri çok kısa olan ürünlerdir. Bu nedenle hücre içinde saptanmaları oldukça güçtür. Bu çalışmanın amacı; OH• radikalının saptanmasında kullanılan floresans problardan kumarin-3-karboksilik asit (3-CCA, *coumarin-3-carboxylic acid*) ve 2-[6-(4V-Hidroksi)fenoksi-3H-ksanten-3-on-9-yl] benzoik asit (HPF, *2-[6-(4V-Hydroxy)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl] benzoic acid*)'in karşılaştırılmaları ve OH• radikali için en uygun olan probun fibroblast hücrelerinde belirlenmesidir.

Bu amaçla çalışmamızda insan dermal fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler, normal koşullarda %10 FBS (fetal bovin serum) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ortamında kültüre edilmiş ve hücre ortamında OH• radikallerinin oluşturulması Fenton reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. H₂O₂ (hidrojen peroksit), DMSO (dimethyl sulfoxide), askorbik asit ve demir varlığında OH• radikali oluşturulan bu ortama yeni sentezlenen Kumarin ve HPF probları eklendikten sonra seçilen floresan problara özgü dalga boylarında spektrofotometrik olarak ölçümler yapılmıştır. HPF için 32.72 ± 7.22 F.I (n=40) şiddetinde bir

ışma, Kumarin için ise 52.1 ± 4.22 F.I (n=40) ışma şiddeti değerleri elde edilmiştir. t testi uygulanarak yapılan istatistiksel analizde Kumarin için elde edilen sonuçların, HPF probuna kıyasla anlamlı olarak ($p < 0.05$) daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Araştırma deneysel niteliktedir ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında, 2012-2013 yılında yapılmıştır.

Anahtar Sözcükler: 2-[6-(4V-Hydroxy)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl] benzoic acid (HPF), kumarin-3-karboksilik asit (kumarin, 3-CCA), fibroblast, fluoresan prob.

USE AND EVALUATION OF OH[•] RADICALS GENERATED WITH THE NEW SYNTHESIZED FLUORESCENT PROBES IN FIBROBLAST CELLS

Reza Salimi, University of Dokuz Eylül, Enstitü of Health Sciences, Department of Molecular Medicine, 35340, Inciraltı-Izmir, Türkiye rezasalimitr@yahoo.com

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS), being pro-oxidant molecules synthesized in the body are essential for life owing to their various functions. Nevertheless, these reactive species can be very harmful increasing the oxidative stress whether produced too much or the levels of counterbalancing antioxidants decrease in the body. In order to determine the levels of ROS, Electron Spin Resonance, Fluorescence, and Luminescence Spectroscopy are often used in practice. Among these methods, Fluorescence Probes are the ones with higher specificity and sensitivity with their excellent sensors to detect ROS's. They also offer different probes specifically designed for each radical.

OH[•] radical is a free radical among ROS's, with a tendency to bind to lipids, DNA and proteins causing irreversible damage in cells. The most devastating consequences related to excess OH[•] radicals occur via direct binding to nucleic acids and proteins. This radical being very reactive and short lived, is very difficult to determine. The aim of this study was to identify the most suitable probe for detection of OH[•] radical levels. The fluorescence probes commonly used in detection of OH[•] radical levels 2-[6-(4V-Hydroxy) phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid (HPF) and coumarin-3-carboxylic acid (3-CCA) are compared.

Human dermal fibroblast cell line was used in this study. The cells were cultured under normal conditions in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) including 10% fetal bovine serum (FBS). Following the formation of OH[•] Radicals with Fenton reaction in the presence of H₂O₂ (Hydrogen peroxide), DMSO (Dimethyl sulfoxide), ascorbic acid and iron, the newly synthesized HPF and coumarin probes were added and spectrofluorometric measurements were performed in their respective wavelengths. The mean amplitude of fluorescence obtained for HPF was 32.72±7.22 F.I (n=40) and for coumarin was 52.1±4.22 F.I (n=40). As a result, the

coumarin probe was found to be significantly more diligent than the HPF in statistical sense ($p < 0.05$).

This experimental study was carried out through 2012-2013 in Dokuz Eylul University School of Medicine Department of Medical Biochemistry.

Key Words: 2-[6-(4V-Hydroxy)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid (HPF), coumarin-3-carboxylic acid (3-CCA), fibroblast, fluoresan prob.

1. GİRİŞ VE AMAC

Endojen olarak üretilen reaktif oksijen (ROT) ve azot (RNT) türleri yaşam için çok gereklidirler. Reaktif türlerin hücre içinde sinyal iletimi, nörotransmisyon, düz kas relaksasyonu, platelet agregasyonu, kan basıncının düzenlenmesi, immün sistemin kontrolü, bellek ve öğrenme yeteneği, enerji üretimi, biyomolekülerin sentezi, hücre büyümesinin düzenlenmesi, ksenobiyotiklerin metabolizması ve fagositoz gibi birçok farklı ve çeşitli işlevleri vardır. Ancak, antioksidan seviyesinin düşmesi ya da fazla miktarda ROT ve/veya RNT üretilmesi durumlarında bu bileşikler hücrenin normal işlevini bozarak çok zararlı olmaktadır (1,2). Bu nedenle reaktif türlerin saptanabilir olmaları ve miktar belirtilmelerinin yapılabilmesi son derece önemlidir. Ayrıca, fizyolojik ve patolojik etkiler arasında ayırım yapabilmek için reaktif türlerin tanımlanmaları ve kantite edilebilmeleri çok gereklidir. Reaktif türlerin direkt olarak ölçülmeleri zordur. Serbest radikallerin eşleşmemiş spinlerini spesifik olarak ve doğrudan belirleyebilen tek analitik teknik spin rezonans veya paramagnetik rezonans spektrometrisidir (ESR/EPR). Ancak, ESR cihazı pahalıdır ve yöntem ileri bir teknik donanım gerektirmektedir. Daha kararlı ve yüksek konsantrasyonlarda serbest radikaller gerektirmesi, yöntemin duyarlılığını azaltmaktadır. Bu yüzden kullanımı çok yaygın değildir (3,4,5). Reaktif türlerin belirtimi ile ilgili araştırmaların büyük çoğunluğu, hassas ve spesifik cihazların ve alternatif yöntemlerin geliştirilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu alternatif yöntemler, prob olma özelliği taşıyan moleküllerle, reaktif türlerin oluşturduğu ürünlerin saptanmalarını temel almaktadır. Spektrofotometrik problemler basit ve duyarlıdır. Fluoresan problemler ise diğer spektrofotometrik problemlerden çok daha duyarlıdır. Eğer yöntem, uygun bir ölçüm probuyla birlikte kullanılırsa hatasız bir ROT/RNT ölçüm sonucu elde edilebilir (1). Ancak hali hazırda kullanılan problemlerin bazı sınırlılıkları vardır. Örneğin 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH), daha önceki araştırmalarda ROT ölçümlerinde çok fazla kullanılmıştır. Fakat bu probun, başka radikallerle de reaksiyona girebilme gibi bir özelliği vardır ve fotostabilitesinin de zayıf olduğu bilinmektedir. Son yıllarda sentezlenmiş olan birçok probun daha duyarlı oldukları, radikale daha spesifik olarak saptama yaptıkları ve fotostabil oldukları ileri sürülmektedir (6).

Sonuç olarak, günümüzde ROT'lar ile ilgili araştırmalar büyük önem taşımaktadır. Çünkü ROT'lar vücut homeostazının kurulmasında büyük role sahiptir ve ROT miktarındaki artış birçok hastalığın oluşmasında tetikleyici rol oynamaktadır.

Reaktif türlerin en önemlilerinden biri de OH• radikali. OH• radikali, hücrede bir çok değişikliğin nedeni olabilecek bir çok süreçte örneğin amino asitlerin serbest kalması ve amino asit zincirlerinin kırılması, DNA-protein çapraz bağlarının oluşması, DNA tek ve çift ipliklerinde zincir kırılmaları ve DNA mutasyonlarında etkili olabilmektedir. Bütün bunlara ek olarak OH• radikali, hücre düzeyinde lezyon oluşmasına ve en sonunda hücre inaktivasyonuna sebep olarak hücrede dönüşümsüz hasarlar oluşmasına yol açabilir. Çok daha önemlisi, onarılamaz hasarlara yol açabilecek ikincil radikal oluşumlarını da başlatabilmektedir. Bütün bunlara ek olarak, diğer radikallerden daha reaktif olması nedeniyle hücre membran proteinlerine, yağlara ve DNA'ya doğrudan atak yaparak hücre hasarına neden olmaktadır (7,8,9,10,11). Hücre içinde OH• radikallerinin sebep olduğu bütün fizyolojik ve patolojik olayların daha iyi anlaşılabilmesi için, OH• radikallerine daha spesifik ve duyarlı belirtim yöntemlerine ihtiyaç vardır.

Bu çalışmanın amacı, yeni sentezlenmiş ve kullanıma sunulmuş olan floresan problardan 2-[6-(4V-Hydroxy)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl] benzoic acid (HPF) ve kumarin-3-karboksilik asit (Kumarin, *coumarin-3-carboxylic acid*) problemlerini birbirleriyle karşılaştırmak ve OH• radikalinin saptanmasında hangi probun daha uygun olduğunu araştırmaktır. Bu amaç doğrultusunda, araştırmamız, aşağıdaki hedeflerden oluşmuştur:

- İnsan dermal hücre kültürü ortamında, OH• radikallerini oluşturmak;
- OH• radikallerini ile etkileştirilecek olan reaksiyon karışımını oluşturan bütün parametrelerin ve hücre sayısının optimizasyonunu yaparak en uygun tepkime koşullarını saptamak;
- Problemleri, optimize edilmiş hücre sayısı içinde yine optimize edilmiş reaksiyon karışımı ortamında oluşturulan OH• radikalleri ile etkileştirmek;
- Belirlenen en uygun tepkime koşullarında her iki probun da ölçümlemlerini etkileyecek bu yöntemin analitik performansını (kesinlik, doğruluk) değerlendirmek için rastgele (**RE**) hata değerlendirmesi yapmak;
- Elde edilen sonuçları istatistiksel olarak **SD** (standart sapma) ve **% CV** (varyasyon katsayısı) olarak ifade etmek;

- Araştırmamızda seçmiş olduğumuz bu fluoressan probları, bu amaç doğrultusunda daha önce hiç çalışılmamış olan insan dermal fibroblast hücre kültürü ortamında gerçekleştirerek OH• radikallerini ölçmektir.

Eğer HPF ve/veya Kumarin fluoressan probları, insan dermal fibroblast hücrelerinde oluşan OH• radikallerini belirlemede başarılı bir şekilde kullanılabilirse, bu hücre tipinin yer aldığı dokularda OH• radikallerinden kaynaklanan fizyolojik ve patolojik süreçleri aydınlatma çalışmalarında araştırmacılara ışık tutabilecek bir katkı yapılmış olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

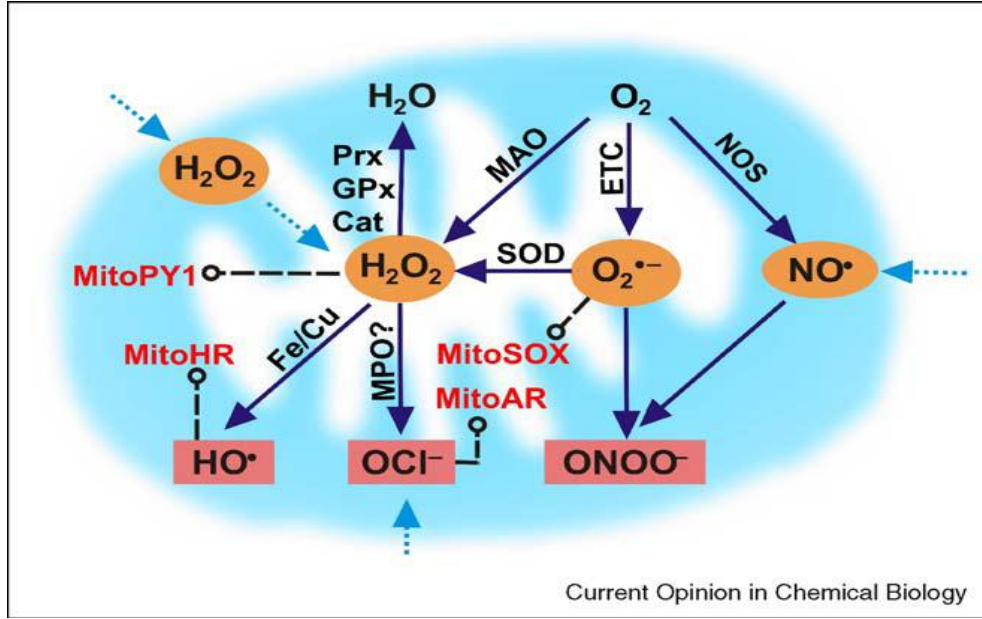
2.1. Reaktif Oksijen Türleri ve Oluşumu

Serbest radikal sinyali, ilk kez 1954 yılında Commoner ve arkadaşları tarafından iskelet kası örneklerinde, elektron spin rezonans tekniği kullanılarak saptanmıştı. Bu araştırmanın sonucunda, radikal oluşumunun sadece patolojik koşullar altında gerçekleşmeyeceği, o güne kadar düşünülenin aksine serbest radikallerin metabolik bir ara ürün olabilecekleri ileri sürüldü. İstenmeyen moleküller olarak tanımlanan reaktif türlerin, sadece hücre hasarına sebep olmadıkları, örneğin NO• (nitrik oksit radikali) ve diğer RNT türlerinin vasküler tonus için önemli bir regülatör olduğu son yıllarda açıklandı ve bu da RNT ve ROT'ların biyolojik süreçte önemli bir role sahip olduklarını göstermiş oldu. ROT terimi, oksijen kaynaklı, hem radikal ($O_2^{\bullet -}$, $HO_2^{\bullet}$, $OH^{\bullet}$ vb) hem de radikal olmayan (H_2O_2 ve singlet oksijen) türleri kapsamaktadır. NO•, $NO_2^{\bullet}$, HNO_2 gibi türler ise azot kaynaklı reaktif türler (RNT) kapsamında yer almaktadırlar (3,12,13).

Reaktif türler, normal fizyolojik süreç içinde, geniş bir spektrumda kritik rol oynarlar. Aşırı miktarda ROT üretimi, hücre içinde oksidatif stresi artırarak biyomoleküllerin oksidasyonuna neden olur ve en sonunda da hücre hasarı yaratarak hücre ölümüne yol açabilir. ROT'lar, canlı organizmaların hem fizyolojik hem de patolojik yönden önemli bileşenleri olarak görülmektedirler. 'Yaşlanmanın serbest radikal teorisi' ilk kez Harman tarafından 1956 yılında ileri sürülmüştür. Serbest bir molekül eğer üzerinde bir ya da birden fazla eşleşmemiş elektron taşıyorsa, serbest radikal olarak tanımlanır. Bazı zehir etken maddeleri, ksenobiyotikler, enfeksiyon ajanları, kirli hava, UV (UltraViolet) ışını, sigara içimi ve radyasyon gibi etkenler radikal oluşumuna neden olan başlıca kaynaklardır (1,14,15,16).

2.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynağı

Reaktif oksijen türleri, moleküler oksijenden daha etkindirler ve yüksek bir redox aktiviteye sahiptirler (14). Karbon merkezli radikaller, mitokondri elektron transport zincirinde ara ürün olarak görev alırlar. Mitokondriyal oksijen tüketiminin yaklaşık %2-5 kadarının ROT'lara dönüştüğü tahmin edilmektedir.

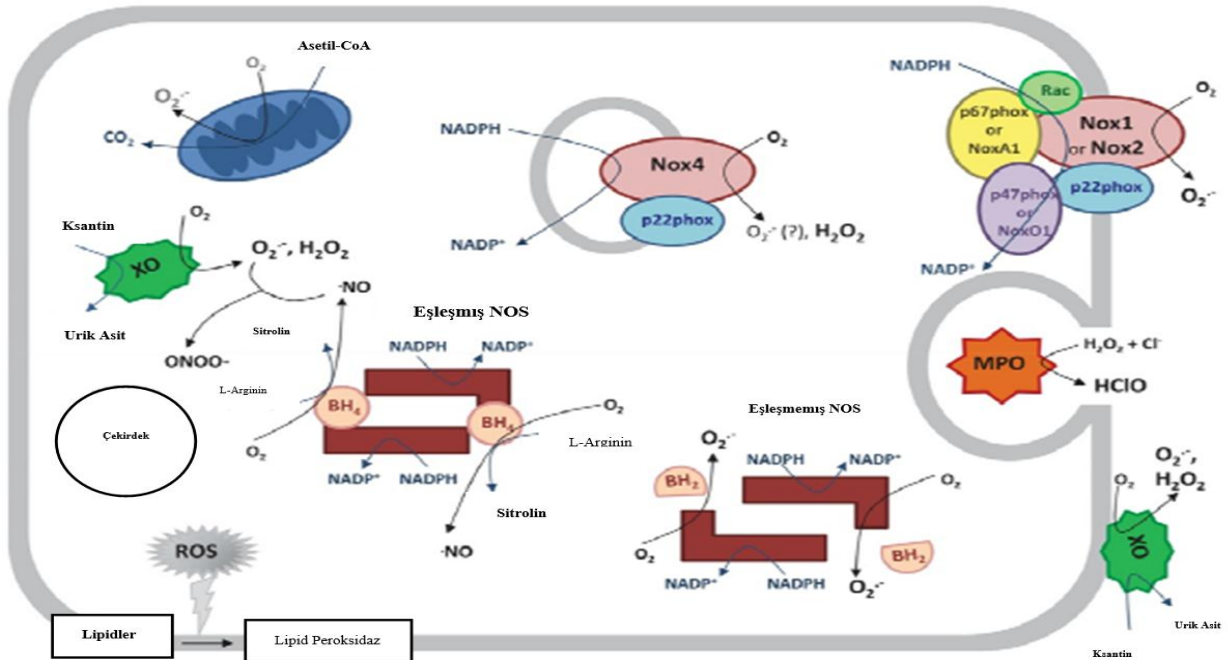


Şekil 1. Mitokondriyal ROT Üretiminin Şematik Gösterimi (17).

Hücre içinde en büyük serbest oksijen radikali kaynağı, mitokondriyal elektron transport zincirinden olan sızıntıdır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondriyal süperoksit radikal üretimi artar. Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda serbest radikal üretimi, membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır. Birçok enzimin katalitik döngüsü sırasında da serbest radikaller ortaya çıkar. Bu enzimlerden biri de ksantin oksidazdır (18,19). Aldehit oksidaz enzimi yapı itibarıyla ksantin oksidaza benzer, substratlarının çoğu aynıdır ve süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) üretirler. Dihidroorotat dehidrojenaz, flavoprotein dehidrojenaz, amino asit oksidaz ve triptofan dioksijenaz gibi enzimler de serbest radikal oluşmasına neden olurlar. Hayvan hücrelerinde askorbik asit, tiyoller, adrenalin ve flavin koenzimleri gibi bazı bileşiklerin

otooksidasyonu da süperoksit radikalının ($O_2^{\cdot-}$) bir başka kaynağıdır. Araşidonik asit metabolizması da reaktif oksijen metabolitlerinin önemli bir kaynağıdır. Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna ve plazma membranından araşidonik asidin serbestleşmesine yol açar. Araşidonik asidin enzimatik oksidasyonu da çeşitli serbest radikal ara ürünleri meydana gelir. Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerde, fagositik solunumsal patlama sırasında çeşitli serbest radikaller oluşur (19,20,21,22). Bazı yabancı toksik maddeler hücrede serbest radikal üretimini artırır. Bu maddeler ya doğrudan serbest radikal üretirler ya da serbest radikallerin ortadan kaldırılmasını sağlayan antioksidan aktiviteyi düşürürler. Bu tip maddeler işlevleri açısından dört grupta toplanabilirler:

- 1) Toksinin kendisi bir serbest radikaldir ve doğrudan radikal olarak etki eder.
- 2) Toksin bir serbest radikale metabolize olur.
- 3) Toksinin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelir.
- 4) Toksin antioksidan aktiviteyi düşürerek etki eder (21,22).



Şelil 2: ROT ve RNT kaynakları (23).

2.3. Anti Oksidan Sistem

Antioksidan sistem reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve hücrede meydana gelen hasarı önler. Antioksidanlar, dört ayrı şekilde etki ederler:

- 1) Antioksidan madde, serbest radikaller ile etkileşerek onları yeni bir moleküle dönüştürebilirler. Bu ‘toplayıcı etki’dir. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler.
- 2) Serbest radikallerle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme ‘bastırıcı etki’dir. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.
- 3) Serbest radikalleri bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki ‘zincir kırıcı etki’dir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.
- 4) Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın giderilmesi ise ‘onarıcı etki’dir.

Antioksidanlar, endojen veya ekzojen kaynaklı olabilirler.

Endojen antioksidanlar; Enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

Enzim olarak etki eden endojen antioksidanlar; Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), Glutasyon S-Transferazlar (GST), Katalaz (CAT), Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi ve Hidroperoksidaz.

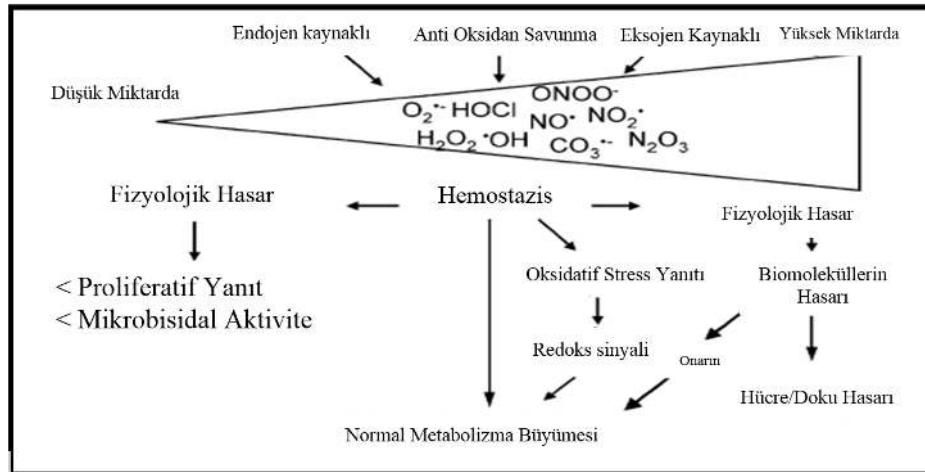
Enzim olmayan endojen antioksidanlar; Melatonin, Seruloplazmin, Transferrin, Miyoglobin, Hemoglobin, Ferritin, Bilirubin, Glutasyon, Sistein, Metiyonin, Ürat, Laktoferrin ve Albümin molekülleri de enzim olmayan endojen antioksidanlardır (15,25,26,27).

Ekzojen antioksidanlar; Vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanlarıdır. α - tokoferol (vitamin E), β -karoten (vitamin A), Askorbik asit (vitamin C), Folik asit (folat) vitamin antioksidanlarıdır. Ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri, rekombinant süperoksit dismutaz, Trolox-C (vitamin E analogu) gibi maddelerdir.

Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar, Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin), Demir redoks döngüsü inhibitörleri, Nötrofil adezyon inhibitörleri, Sitokinler (TNF ve IL-1), Barbitüratlar ve Demir şelatörleri İlaç olarak kullanılan ekzojen antioksidanlar. Butylated hydroxytoluene (BHT), Butylated hydroxyanisole (BHA), Sodium benzoate, Ethoxyquin, Propylgalate ve Fe-superoxyde dismutase Gıdalardaki ekzojen antioksidanlar (25,27,28,29,30).

2.4. Reaktif Oksijen Türlerinin Hastalıklarla İlişkisi

İster endojen ister ekzojen olarak üretilsinler, ROT ve RNTler yaşam için gerekliler. Hücre içi sinyal yolları, platelet agregasyonu, kan basıncının regülasyonu, immün sistemin kontrolü, bellek, enerji üretimi, biyomolekülerin sentezi, nörotransmitter, düz kas relaksasyonu, hücre büyümesinin regülasyonu, fagositoz gibi bir çok işlevleri vardır. Antioksidan seviyesinin düşmesi ya da fazla miktarda ROT ve RNT üretilmesi durumlarında bu bileşikler çok zararlı olmaktadır (1,31,32). Aşırı üretilen reaktif türler, reperfüzyon hasarı, inflamasyon, sepsis ve musküler distrofi gibi patolojik süreçlerde hücre incinmesine aracılık ederler (1,23,33). Çünkü reaktif oksijen türleri, hücre içinde oksidatif stresi artırır. Bu durum hücre içinde biyomoleküllerin aşırı bir şekilde oksidasyonuna neden olur ve en sonunda da hücre hasarı yaratarak hücre ölümüne kadar gidebilir. Bu nedenle hem anti oksidanlar ve hem de serbest radikaller hücre homeostazisinde önemli role sahiptirler (1,17).



Şekil 3. Serbest radikallerin ve oksidanların fizyolojik etkileri (28).

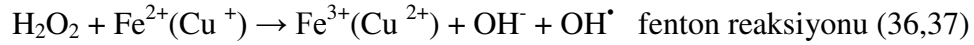
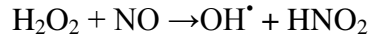
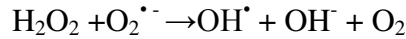
Oksidatif stres, kanser gibi hastalıkların yanı sıra yaşlanmanın da önemli bir risk faktörü olduğu Alzheimer, Parkinson ve Huntington gibi nörodejeneratif hastalıklarla da doğrudan ilişkilidir. Reaktif türlerin hastalık yapıcı etkilerinin aksine, eğer hücre içinde kontrollü bir şekilde salınırlarsa normal fizyolojik süreçlerde çok önemli işlevlerin sürdürülmesinde büyük yarar sağladıkları bilinmektedir (17,31,34,35). Moleküler oksijenin oksidatif mekanizmaları 18.

yy'ın sonlarında keşfedilmiş ve hem faydalı hem de toksik etkileri daha o yıllarda rapor edilmişti. 20. yy dan günümüze kadar yapılan çalışmalarda da biyolojik oksidasyonun gerçekleşmesinde, aerobik organizmalar için besinlerden enerji elde edilmesinde, çeşitli patojenlerle mücadelede, ksenobiyotiklerin eliminasyonunda ve ayrıca moleküler oksijenden ROT'ların üretilmesinde, reaktif türlerin önemi bilinmektedir. Sonuç olarak hem oksidan maddeler hem de serbest radikaller hücre homeostazisinde çok önemli rol oynamaktadırlar (32).

2.5. OH• Radikali

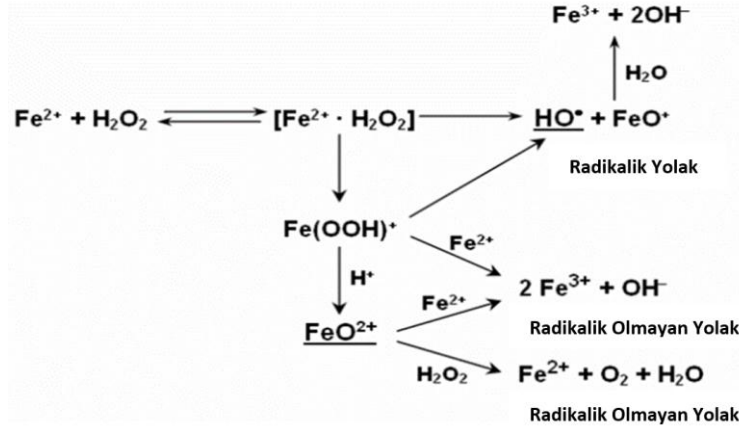
Oksijen kaynaklı reaktif türler, radikal ve radikal olmayan olarak iki başlık altında toplanabilirler. Radikal türlerin içinde en toksik ve en aktiflerinden biri olan OH• radikali, bir dizi zincirleme reaksiyonu başlatabilme yeteneğine sahiptir.

OH• radikali, H₂O₂ 'den bir metal iyonu(Fe²⁺ veya Cu⁺) varlığında *fenton* reaksiyonu ile oluşur. Redoks aktif bu metallerin varlığında H₂O₂, süperoksit anyonu (O₂•⁻) veya NO türleri ile reaksiyona girerek hidroksil iyon ve radikallerini oluşturur.



Fenton reaksiyonları, kimyasal ve biyolojik sistemlerin yanı sıra doğal çevremizde de oluşan önemli bir çevrim sistemini oluşturmaktadır.

Biyolojik sistemlerdeki Fenton reaksiyonlarından biri de, H₂O₂ nin bir geçiş metali katalizörlüğünde indirgenerek çok reaktif yükseltgen maddeler oluşturmalarıdır. Geçiş metalleri çeşitli oksidasyon basamaklarına ve yükseltgenme/indirgenme reaksiyonlarını katalizleyebilme özelliğine sahiptirler. Fenton sisteminde H₂O₂, bir metal iyonu-Fe(II) ile aktive olup OH radikallerini üretirken, Fe (II) iyonları da Fe(III) iyonlarına yükseltgenir. Bu sırada da kuvvetli bir antioksidan madde olan askorbik asit devreye girerek demirin tekrar indirgenmesini sağlar. Bu şekilde Fenton çevrimi tamamlanmış olur (38).



Şekil 4. Organik substratların varlığında Fenton Sistemindeki olası reaksiyon yolları (39).

Bütün reaktif oksijen türlerinin en agresifi olan $\text{OH}^\bullet$ radikalinin yaşam süresi çok kısa (sulu ortamda 2 ns) olduğu için saptanabilmesi de oldukça zordur. Kompleks biyolojik sistemlerde $\text{OH}^\bullet$ radikalinin in vivo çalışmalarında kullanılan yöntemlerde, duyarlılık ve kantitasyon açısından yetersizlikler vardır. Bu nedenle $\text{OH}^\bullet$ radikalinin hücre hasarını nasıl bir mekanizma ile başlattığı hala ayrıntılı olarak anlaşılamamıştır (26,40,41,42).

2.6. Spektroskopik Yöntemler

Reaktif türlerin ölçülmesinde en çok spektroskopik yöntemler kullanılır. Reaktif türlerin belirtimi, genellikle dolaylı yoldan reaktif türlerinin problemlerle verdiği reaksiyon sonucu oluşan ürünlerin ölçülmesiyle yapılır. Spektroskopik prob (genellikle dışarıdan) reaktif tür ile reaksiyona girdiğinde maddenin spektroskopik özelliklerinde (ışık absorpsiyonunda veya emisyonunda ya da magnetik özelliklerinde) değişiklik olur (5,12,32). Reaktif türlerin (ROT/RNT) saptanmasında ve miktar belirtimlerinde en çok kullanılan spektroskopik yöntemler; elektron spin rezonans (ESR/EPR), spektrofotometri, floresans, ve lüminesans spektroskopileri'dir. Bu cihazlar, saptanacak olan reaktif türün özelliklerine uygun olarak geliştirilmiş olan problemlerle birlikte kullanılırlar (5,12,17). Floresans özellik gösteren problemler, gerek hücre kültürü ve gerekse doku çalışmalarında biyomoleküllerin tanımlanmasında en çok kullanılan mükemmel saptayıcılardır. Floresan problemler ile biyomoleküllerin hücredeki normal yapıları ve üçboyutlu yapıları tanımlanabilir ve bu problemlerin eş zamanlı kullanılmasıyla biyomoleküllerin hücre içindeki

davranışları da izlenebilir. İlk kez Tsien's grubu tarafından Ca^{+2} için floresan prob kullanılmış ve daha sonra da diğer biyomoleküllerin belirlenmesi çalışmaları yapılmıştır. Bu öncül çalışmaların ardından, biyomoleküllerin hücre içindeki fizyolojik etkilerinin açıklanmasında büyük gelişmeler sağlanmıştır (6).

2.7. Floresans Ölçümlerde Temel İlke

Elektromanyetik ışın, uzayda çok büyük hızla hareket eden bir enerji türüdür. Elektromagnetik ışın hem dalga hem de tanecik (foton) özelliğine sahiptir. Bazı maddelerin çözeltileri UV veya GB ışınlarıyla uyarılınca bunları absorbe ederek uyarılmış hale geçerler. Işınlama kesilince uyarılmış halden temel hale dönerken ışın yayımlarlar (emisyon). Işıma yapan madde tarafından yayımlanan ışın, absorblanan ışıdan daha düşük enerjili olduğundan daha uzun dalga boyuna sahiptir. Işınlama kesildikten sonra maddenin yayımladığı ışın kısa ömürlü ise (10^{-9} - 10^{-8} sn) buna floresans, daha uzun ömürlü ise (10^{-4} sn >) fosforesans olarak adlandırılır. Bu uyarılmalar aşağıdaki gibi özetlenebilir;

Temel Singlet Hal → Uyarılmış Singlet Hal → Floresans

Temel Singlet Hal → Uyarılmış Singlet Hal → Uyarılmış Triplet Hal → Fosforesans.

Bir molekülün bir çift elektronundan biri daha yüksek bir enerji seviyesine uyarılırsa ya bir singlet ya da bir triplet hal meydana gelir. Singlet halde, uyarılmış elektronun spini hala temel haldeki elektron ile eşleşmiş yani zıt spinli durumdadır. Triplet halde ise, uyarılmış elektronun spini, temel haldeki elektronun spini ile paralel durumdadırlar. Floresans ışımının, fosforesans ışımaya göre daha kısa ömürlü olma sebebi de budur.

sentezlenen problemlerin eski problemlere oranla daha spesifik ve duyarlı oldukları belirlenmiştir. Ancak henüz yeterince kullanıma girmedikleri için, araştırmalarda hala eski problemlerin kullanımına devam edilmektedir. Reaktif türlerin belirlenmesinde son derece önemli olan bu problemler kimyasal yapıları itibarıyla 6 başlık altında toplanmaktadır:

- **Spin tuzaklama:** Organik nitrozo bileşikleridir. Görece kararlıdır ve nitroksit radikallerini saptayabilirler. Örneğin: 2-metil-2-nitrozopropan (MNP).

Hidrosilaminler: Nitroksitlerin indirgenmesi sonucu elde edilirler. Superoksit ve peroksinitritlerin saptanmasında kullanılırlar. Örneğin: *1-hydroxy-3-carboxy-pyrrolidine (CP-H)*.

- **Stabil serbest radikaller:** Triarilmetil serbest radikali ve süperoksit anyon radikali için önerilmişlerdir ve biyoredüksiyona karşı stabildirler. Örneğin: *Triarylmethyl stable free radical TAM OX063*.
- **Spektrofotometrik problemler:** Reaktif türlerin belirlenmesinde en basit ve en kolay kullanılan problemlerdir. Optik özellikleri, reaktif türler ile verdikleri reaksiyonlar sonucunda değişir. En önemli dezavantajları, diğer problemlere göre düşük sensivite göstermeleridir. Örneğin: *Nitro Blue Tetrazolium (NBT)*.
- **Luminesan problemler:** Bir peroksidazın varlığında luminol türevli kemilüminesans prob, hücredeki hidrojen peroksidin saptanmasında kullanılmaktadır. Örneğin: *2-Methyl-6-phenyl-3,7-dihydroimidazo (1,2-a)-pyrazin-3-one (CLA)*.
- **Fluoresan problemler:** Bunlar içinde özellikle pozitif fluorojenik özellikteki problemler, spektrofotometrik problemlerden çok daha yüksek sensitivite gösterirler. Bu bileşikler aslında fluoresan olmayıp reaktif türlerle birleştikleri zaman fluoresan ürün oluşturmaktadırlar. Yüksek duyarlılık, geniş bir konsantrasyon aralığında doğrusal değişim ve düşük fluoresan background göstermektedir. Örneğin: *Resorufin (5)*.

2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCFH) ilk kullanılan fluoresan problemlerden biridir ve ROT üretiminin miktarını belirlemek için kullanılmaktadır. DCFH, ROT ile oksitlenerek *2',7'-dichlorofluorescein (DCF)*'e dönüşür ve ayrıca güçlü bir emisyonu da sahiptir. Diasetat türevi *2',7'-dichlorodihydrofluorescein diasetat (DCFH-DA)* hücre zarından geçebilme özelliğine sahiptir ve böylece canlı hücrelerde oksidatif stresi araştırmak için kullanılabilir. Benzer şekilde dihidro bileşikler; *dihydrorhodamine 123 (DHR123)*, *dihydrorhodamine 6G*, *dihydrocalcein*, *dihydroethidium (hydroethidine)*, *10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (AmplexRed)* ve

2,3,4,5,6-pentafluorodihydrotetramethylrosamine (PF-H2TMRos)'de DCFH gibi floresan probalar olarak ROT tayini için kullanılabilirler (6). Fakat bu bileşiklerin iki dezavantajı vardır. Bunlardan birincisi ışığa karşı hassas olmalarıdır. Çok az bir ışık veya güçlü bir ışık, bu problemlerin okside olmalarına ve ortamda reaktif türlerin olmaması durumunda bile floresan yayılım yapmalarına yol açabilir. İkincisi ise bu bileşiklerin ROT'lar için seçiciliklerinin yetersiz olmasıdır. Yukarıda belirtilen bu floresan problemlerin sadece tek bir radikali tanımlamak için kullanılmaları doğru olmaz ancak, hücre veya dokudaki oksidatif stresin tümünü tanımlamak için kullanılmaları uygun olabilir. Son yıllarda belirlenmiş olan problemler ROT'ları daha seçici olarak saptayabilirler. Çünkü her ROT'un kendine özgü bir biyolojik etkisi vardır ve bu yeni problemler ROT'ların kendine özgü ve eşsiz biyolojik etkilerini tanıyarak seçici olarak saptamalarını sağlarlar (32). Bu şekilde reaktif türe özgü en uygun prob kullanılarak hatasız bir ROT ölçümü elde edilebilir. Ayrıca duyarlı ve spesifik olmaları nedeniyle bu problemler, çok küçük konsantrasyonlarda kullanılabilirler. Bu da reaksiyon ortamında bir karışıklığın olmasını engeller.

2.9. OH[•] Radikallerinin Saptanmasında Kullanılan Floresan Problemler

Reaktif türler içinde en agresif olan OH[•] radikali için sentezlenen yeni problemler, eski problemler ile karşılaştırılmadığı için araştırmalarda yeterince kullanılmamakta ve hala eski problemler tercih edilmektedir (6). OH[•] radikali için kullanılmakta olan bazı floresan problemler özetlenmiştir.

1. 4-(9-Antiroyloksi)-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil (4-(9-Anthroyloxy)-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl)
2. 1,3-siklohegzanedion (CHD, 1,3-Cyclohexanedione)
3. Sodium tereftalat
4. Kumarin ve kumarin-3-karboksilik asit (Coumarin and coumarin-3-carboxylic acid)
5. Kumarin-3-karboksilik asitin N-suksinimidilesteri (SECCA, N-succinimidylester of coumarin-3-carboxylic acid)
6. 2-[6-(4V-Hidroksi) fenoksi-3H-ksanten-3-on-9-yl]benzoik asit (HPF, 2-[6-(4V-Hydroxy)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid)
7. 2-[6-(4V-amino) fenoksi-3H-ksanten-3-on-9-yl] benzoik asit (APF, 2-[6-(4V-amino)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl] benzoic acid)

8. Fluoresein (FL, *Fluorescein*)

2.10. Spektroskopik Yöntemlerde Analitik Performansın Değerlendirilmesi

Doğrusallık (*linearite*), tekrarlanabilirlik (*kesinlik*, *precision*), girişim (*interferans*) etkileri, geri kazanım (*recovery*), reaktif stabilitesi, minimum ölçüm sınırı ve doğruluk (*accuracy*) bir yöntemin analitik performansını belirleyen temel ölçütlerdir. Bir yöntemin kesinlik ve doğruluğunu etkileyen hatalar ise rasgele hatalar (*random error*, RE) veya sistematik hatalar (*systematic error*, SE) olabilir. Rasgele hatayı oluşturan; deney-içi (*within-run*) ve deneyler-arası (*between-run*) değişkenliklerdir. Rasgele hata ile ilişkili bu faktörler, ölçümün tekrarlanabilirliğini ve kesinliğini etkilemektedir. Rasgele hata, ölçüm sonuçlarının ortalama değer etrafındaki dağılımını yansıtır ve istatistiksel olarak veri ortalamasının standart sapması (SD) veya değişkenlik katsayısı (CV) ile ifade edilir.

Doğrusallık (Linearite) : Her hangi bir seyreltme işlemi yapılmadan, örneğin içindeki analit miktarını belirleyebilme sınırı olarak tanımlanır. Bu amaçla öncelikle standart çözeltilerin dilüsyonları ile elde edilen ölçüm sonuçları saptanır (beklenen değer). Daha sonra ölçülecek olan analiti içeren biyolojik örneklerdeki konsantrasyon değerleri (ölçülen değer) belirlenir. Beklenen değerlerin x eksenine, ölçülen değerlerin y eksenine yerleştirilerek elde edilen doğrunun 45° açı göstermesi ile linearite doğrulanır. Uygunluk yüzdesi % 95 – 100 aralığında ise doğrusallık kabul edilebilir sınırlardadır.

Analitik Duyarlılık (Analytical Sensitivity) : IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) tarafından analizi yapılan maddenin konsantrasyon değişimine karşı ölçüm sinyalinde meydana gelen değişiktir. Kalibrasyon eğrisinin eğimi analitik duyarlılığı ifade eder.

Kesinlik – Tekrarlanabilirlik (Precision) : Yöntemin öncelikle **deney-içi** (*within-run*) tekrarlanabilirliğini ifade eder. Eğer deney- içi tekrarlanabilirlik kabul edilebilir sınırlarda değilse, yöntemin doğruluğundan da şüphe etmek gerekir. Bu durumda deneyler-arası (*between-run*) tekrarlanabilirlik analizine gerek yoktur. Bir yöntemin analitik performansını (*kesinlik*, *doğruluk*) etkileyen hataların rastgele (**RE**) veya sistematik (**SE**) hatalar olabileceği belirtilmişti. Gerçekte rastgele hata, yöntemin tekrarlanabilirliğini etkiler ve istatistiksel olarak **SD** (standart

sapma) ve % CV (varyasyon katsayısı) ile ifade edilir. % CV nin %5 ten küçük olması gerekir. Örnekler 20 kez ard arda çalışıldıktan sonra elde edilen değerlerin ortalaması alınır.

% CV = (Standart Sapma / Ortalama Değer) x 100 formülüne göre hesaplanır.

Rastgele hata; RE = 4 x SD formülüne göre hesaplanarak elde edilen değer kabul edilebilir hata sınırını aşıp aşmadığı değerlendirilir.

Doğruluk (Accuracy) : Gerçek değer ile ölçülen değer arasındaki yakınlığı ifade eder. Aradaki fark, hatanın göstergesidir. Gerçek değer belirlenebilmesi için bir referans materyalinin olması gerekir. Eğer bir referans maddesi yoksa performansı belirli olan bir yöntemle karşılaştırma çalışması yapılabilir.

Geri Kazanım (Recovery) : Örnek havuzunda analizi yapılacak olan maddenin konsantrasyonu ölçülür. Bilinen miktarda analit örneğe eklenerek ölçüm tekrarlanır. Elde edilen sonuç, eklenen miktar kadarsa geri kazanım amacına ulaşmış demektir. % Geri kazanım olarak ifade edilir. % Geri kazanım = (Geri kazanım kons. / Eklenen kons.) x 100 formülünden hesaplanır (24).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

Deneysel nitelikte bir araştırmadır. Yöntem geliştirme amacıyla gerçekleştirilmiştir.

3.2 Araştırmanın yeri ve zamanı

Araştırma, 2011 Aralık ayında başlamış - 2012 Aralık ayına kadar sürmüştür. Araştırmanın deneysel bölümü Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında ve DEÜ İleri Biyomedikal AR-GE Uygulama ve Araştırma Merkezi Uydu Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.3 Araştırma Evreni ve Örneklemi/ Çalışma Grupları

Araştırmada İnsan Dermal fibroblast ticari hücre hatları kullanılmıştır.

Çalışma gurupları:

1. Kumarin eklenmiş hücreler
2. HPF eklenmiş hücreler
3. Hiçbir probun eklenmediği hücreler olmak üzere 3 grupta gerçekleştirildi.

3.4 Çalışma Materyali

Araştırmada dondurulmuş ‘insan dermal fibroblast hücre hattı’ (ATCC katalog No. CRL-2522) kullanıldı Bu hücre hattı için *ATCC-formulated Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (Catalog No. 30-2002) ortamı kullanıldı.

3.5 Araştırmanın Değişkenleri

Fluoresan probalar araştırmanın bağımsız, $\text{OH}^\bullet$ radikalleri ise bağımlı değişkenleridir.

3.6. Veri Toplama Araçları

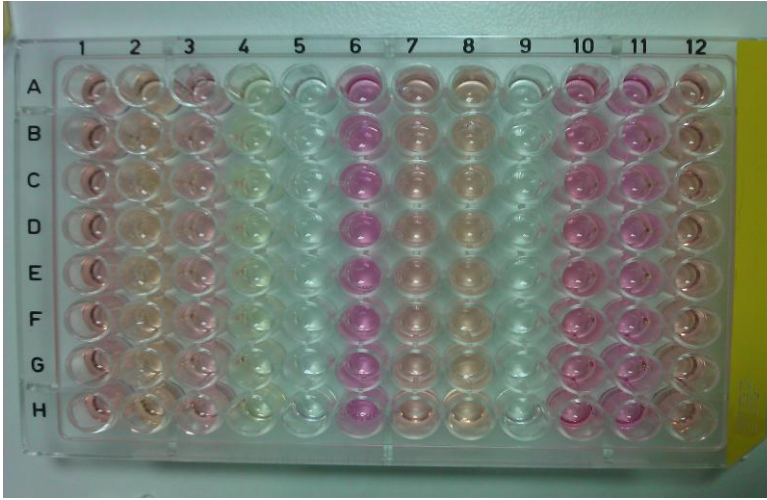
3.6.1. Hücre Çözülmesi

-18°C de tutulan hücreleri çözmek için aşağıdaki işlemler yapıldı;

1. Ekimden önce 1 ml/5 cm² hacimdeki kültür ortamı 37° C' de, %5 CO₂ içeren inkübatörde (*Thermo Scientific Incubator / Forma Stericycle CO₂*) en az 30 dakika süreyle bekletildi,
2. Fibroblast hücreleri 37° C sıcaklıktaki su banyosunda hızlıca çözöldü,
3. Hücre süspansiyonu üzerine serumlu ortam eklenip pipetleme yapıldı,
4. Hücre sayımı yapıldı,
5. Önceden kültür kaplarında (25 lik flask) inkübatörde bekletilen ortamlar üzerine 5000/cm² yoğunlukta ekim yapıldı.
6. Faz kontrast mikroskopunda (*Olympus, CK40*) incelendikten sonra inkübatöre konuldu.
7. Kültür ortamı ekimin ertesi günü ve ardından gelen iki günde bir taze kültür ortamıyla değiştirildi.

3.6.2. Hücre Kültürü

Çalışmada İnsan Dermal Fibroblast hücre hattı (ATCC katalog No. CRL-2522) kullanıldı. Hücreler %10 FBS (*Fetal Bovine Serum*), %1 L-glutamin (*Biological Industries*, 03-020-1C), %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Biological Industries, 01-050-1A*) içerisinde kültüre edildi. Hücre kültürü işlemleri biyogüvenlik 2 düzeyinde laminar kabinet (*Thermo Scientific Cabinet / MSC1.2*) içerisinde yapılırken, hücreler 37 °C'de, %5 CO₂'li inkübatörde (*Thermo Scientific Incubator / Forma Stericycle CO₂*) uygun zaman aralıklarında (2 günde bir) çoğaltıldı. Hücreler %70 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlama işlemi yapıldı ve hücreleri kaldırmak için % 0.05 / % 0.02 oranında Trypsin/EDTA (*Etilendiamin tetraasetik asit, Biological industries, 03-051-5B*) solüsyonu kullanıldı.

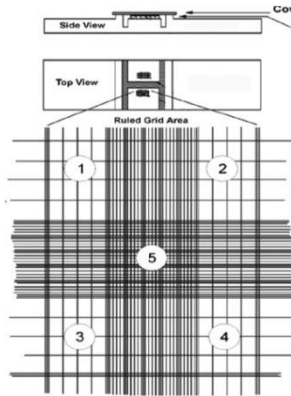


Şekil 6. Hücre kültürü deneyleri

3.6.3. Hücre Sayımı ve Canlılık Testi

Kültürde üretilen hücrelerin ortamları uzaklaştırılıp ve 1X PBS (*Phosphate Buffered Saline*) ile iki kere yıkama yapıldı. 1X Tripsin-EDTA solüsyonu ile hücreler kaldırılıp, elde edilen hücre süspansiyonundan 50 µl alınarak tripan mavisini (*Biological industries*, 03-102-1B) ile karıştırıldıktan sonra hücreler Neubauer lamında 10 farklı alanda hemositometrik olarak sayılarak yaklaşık hücre sayısı bulundu (Şekil 7). 50 µl hücre süspansiyonu için, 100 µl 1X PBS ve 100 µl tripan mavisini kullanıldı.

$$\text{Hücre Sayımı} = \frac{\text{Toplam Hücre}}{10} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 10^4 = \text{Hücre / mL}$$

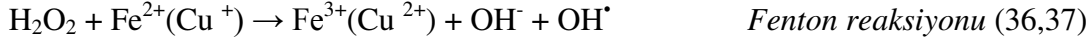


Şekil 7. Hemositometrik olarak hücre sayımında kullanılan Neubauer lamı görüntüsü

3.6.4. Radikal oluşturma ve Floresans Ölçümler

Kültüre edilen hücrelerin ortamında, OH[•] radikalleri Fenton reaksiyonu ile oluşturuldu. Aşağıda, bu radikallerin oluşumu ile ilgili deney düzeneğı ve prensibi açıklanmıştır:

Biyolojik sistemlerde radikalik ve radikalik olmayan çeşitli yolları kapsayan Fenton reaksiyonlarının radikal oluşturan basamağı;



Tepkimesi ile özetlenebilir. Deney kugumuza göre OH[•] radikallerini oluşturmak amacıyla, insan dermal fibroblast hücreleri ve kültür ortamı, Fenton reaksiyonunu oluşturacak olan reaksiyon karışımı ile etkileştirildi.

Reaksiyon karışımı: Son hacim 1 ml olacak şekilde, 50 mmol/L (mM) KH₂PO₄ (*potasyum dihidrojen fosfat*, pH 7.4 *Fisher scientific*), prob (farklı konsantrasyonlarda), 200 µmol/L DMSO (*dimetil sülfoksit*, *Fisher scientific*), 80 µmol/L Fe-EDTA (Sigma E6760) ve 120 µmol/L H₂O₂, (SIGMA, H1009), 240 µmol/L askorbik asit (Aplchem, A1052,0100) içermektedir (4). Daha sonraki optimizasyon çalışmalarında bu karışım kullanılmış ancak optimize edilen parametrenin konsantrasyonları değıştirilmiştir. Optimum konsantrasyonları saptamak amacıyla her bir konsantrasyon değeri için dokuz kez ölçüm yapılmıştır. Örneğin problemlerin optimizasyonu işlemi için izlenen süreç aşağıdaki gibidir:

Kültüre edilmiş olan hücreler 96 kuyucuklu plağın her bir kuyucuğuna 20000 hücre olacak şekilde yerleştirildikten sonra 37°C de 15 dk. inkübe edildi. HPF probu ile yapılacak ölçümler için yukarıda içeriği verilmiş olan 1 mL hacmindeki reaksiyon karışımına 1.5µL HPF probu eklendi. Inkübasyon işlemi tamamlanmış hücreler üzerine HPF probunu da içeren reaksiyon karışımından her bir kuyucuğa 50 µL eklendi ve 45 dk. inkübe edildi. Inkübasyondan sonra HPF probuna özğü eksitasyon/emisyon dalga boylarında (490/515 nm) spektrofotometrik ölçümler yapıldı. Kumarinle yapılacak olan ölçümler için ise yine aynı koşullarda hazırlanan yani her bir kuyucuğu 20000 hücre içeren 96 kuyucuklu plak 37°C de 15 dk. inkübe edildi. 1 mL toplam hacim içinde içeriği yukarıda verilmiş olan reaksiyon karışımına bu kez 4 µL kumarin probu eklendi. Kumarin için saptanmış olan 90 dk. ılık inkübasyon süresinden sonra kumarine özğü eksitasyon/emisyon dalga boylarında (385/450 nm) spektrofotometrik olarak ölçümler

yapıldı. Spektrofluorometrik ölçümlerde *Varioskan* marka spektrofluorometre (*Flash Thermo Electron Corporation, seri No:3001-1132, cat No:5250040*) kullanıldı.

3.6.5. Optimize Koşullarda Radikal Oluşturma ve Floresans Ölçümler

Çalışmamızda insan dermal fibroblast hücreli ortamlar kullanılarak, başta hücre sayısı olmak üzere, OH[•] radikallerinin oluşturacak olan reaksiyon karışımını oluşturan bütün bileşenlerin optimizasyon deneyleri yapıldı.

Hücre ortamı içeriği: %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM.

Optimize edilmiş reaksiyon karışımı içeriği: 0.062 µM H₂O₂, 0.038 (Kumarin) ve 0.38 (HPF) µM DMSO, 1.3 (Kumarin) ve 0.13 (HPF) µM Fe-EDTA, 48 mM Askorbik asit.

Bu deneylerde, genel olarak uygulanan protokol, örnek olarak aşağıda verilmektedir.

Önce 96 kuyucuklu plağa (*well-plate*) 100 mikro litre optimum sayıda (20000) hücre içeren süspansiyon yerleştirildikten sonra 15 dk. inkübe edildi. Optimize edilen reaksiyon karışımı toplam hacim 1 mL olacak şekilde hazırlandı.

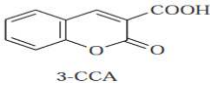
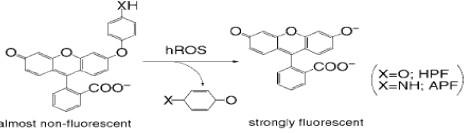
Kumarin ile yapılacak olan denemelerde, her 100 µl reaksiyon karışımı için 1 mL DMSO içinde 0.3 g kumarin içeren reaktiften 4 µl eklendi. HPF ile denenen gruplara ise DMF içinde çözülmüş 5 mM HPF'den 1.5 µl eklendi. Kumarin için 90 dk. HPF için 45 dk. ılık inkübasyon sürecinden sonra her bir kuyuya 50 µl reaksiyon karışımından eklendi. Tekrar 30 dakika inkübe edildikten sonra sırasıyla 385/450 nm (kumarin için) ve 490/515 nm (HPF için) eksitasyon/emisyon dalga boylarında ölçümler gerçekleştirildi. Bu ölçümler sekiz ya da dokuz kez tekrarlandı.

Optimizasyon deneylerinde optimize edilen parametrebnin farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. Ayrıntılar bulgular bölümünde her bir çalışma için açıklanmıştır.

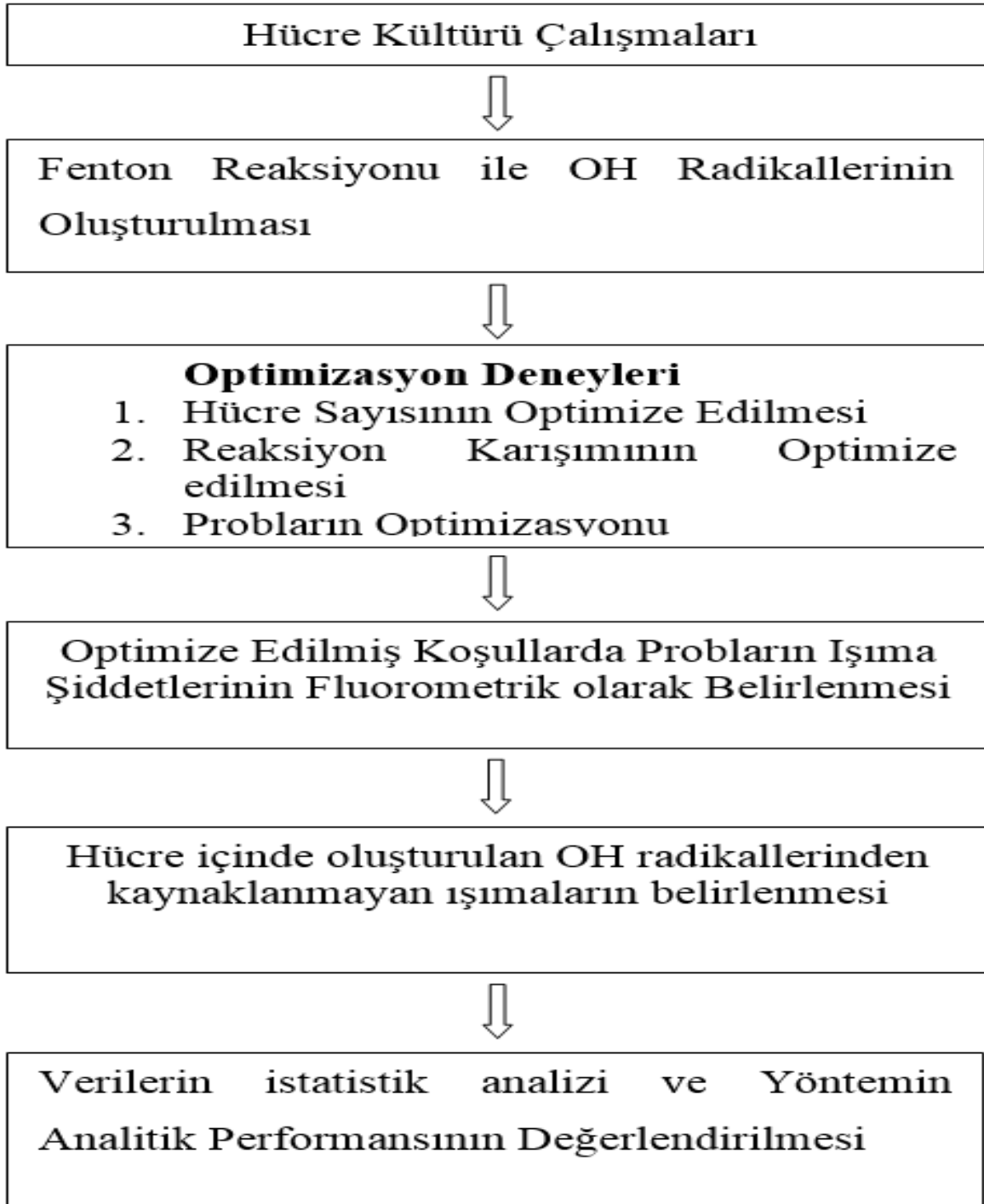
Kullanılan fluoresan problemlerin özellikleri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir. Optimize edilen bütün koşullardaki en uygun prob konsantrasyon değerleri:

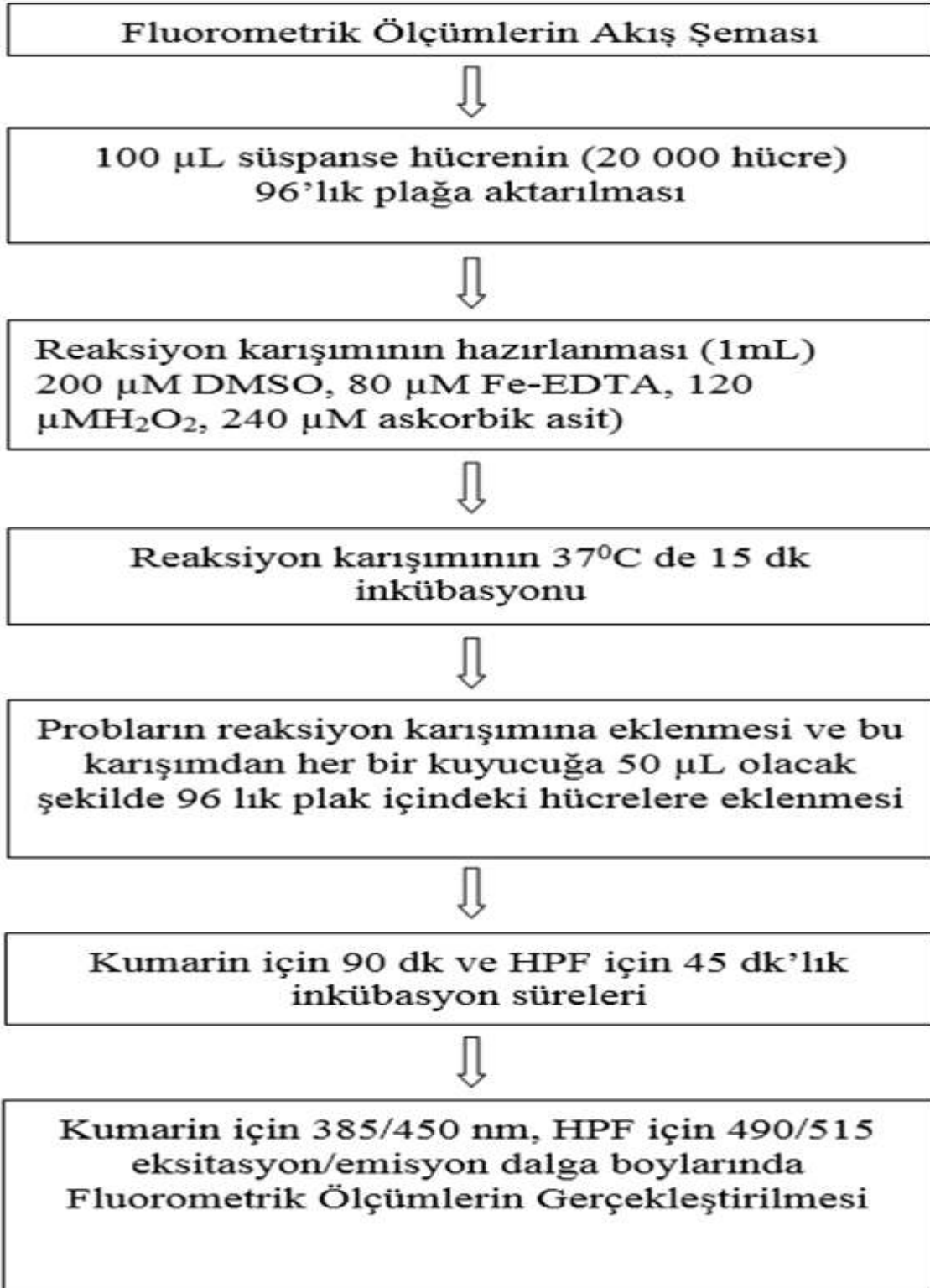
HPF için 0.015 µmol/L, Kumarin için 4.0 µmol/L olarak saptanmıştır.

Tablo 1. Floresan problar (1,5,11,45,46,47).

Prob	Eksitasyon/ Emisyon(nm)	Marka/özellik	Miktar	PH
<i>coumarin-3-carboxylic acid</i> (Kumarin)  3-CCA	385/450	Sigma, C85603, 25g MW: 190.15 g/mol Bir deneme için birm fiyat: 0.018 TL	0.3 g kumarin/1ml DMSO	7.4
<i>2-[6-(4V-Hydroxy)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid</i> (HPF)  almost non-fluorescent strongly fluorescent (X=O; HPF) (X=NH; APF)	490/515	Sigma, H4290, 1mg MW: 424.40 Bir deneme için birm fiyat: 2.8 TL	DMF içinde 5 mM	7.3

3.6.6. Deneylerin Akış Şeması





3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi

Tez çalışması için yapılan araştırma planı aşağıdaki şekilde tablolastırılmıştır.

Tablo 2. Araştırma planı

İş Paketi Ad/Tanım	Aylar											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Hücre Hatlarının Temini, malzeme alınımı												
Hücre Kültürü												
Radikal oluşturma ve spektrofotometrik ölçümler												
İstatistiksel analizler												
Veri toplama ve değerlendirme												
Tez yazımı												

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi:

Araştırma sonuçlarının istatistik analizi SPSS için Windows istatistik programının 15.0 versiyonu kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma biçiminde gösterildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda ‘t testi’ kullanıldı.

3.8.1. Analitik Performansın Değerlendirilmesi

Yöntemin analitik performansını (kesinlik, doğruluk) etkileyen rastgele (**RE**) hata değerlendirildi. Rastgele hata değerlendirmesi için yöntemin deney-içi tekrarlanabilirliği analizi yapıldı. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak **SD** (standart sapma) ve **% CV** (varyasyon katsayısı) olarak ifade edildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmamızda bütçe ve zaman sınırlaması söz konusu olmuştur. Bu kısıtlamalar olmasaydı, deneyler en az iki çeşit hücre hattında, deney hayvanlarında veya hasta örnekleri üzerinde yapılabilirdi. Böylece farklı hücre hatları ile karşılaştırma olanağı elde edilebilirdi. Eğer bir canlıdan alınan hücreler kullanılsaydı, sonuçları etkileyecek başka parametreler ve bunların varlığında ortaya çıkan interferanslar için farklı değerlendirmeler yapılabilirdi. Daha fazla sayıda floresan prob kullanılarak bu problemlerin karşılaştırmaları yapılarak OH radikalleri için en uygun olan problemler arasında bir derecelendirme yapılabilirdi.

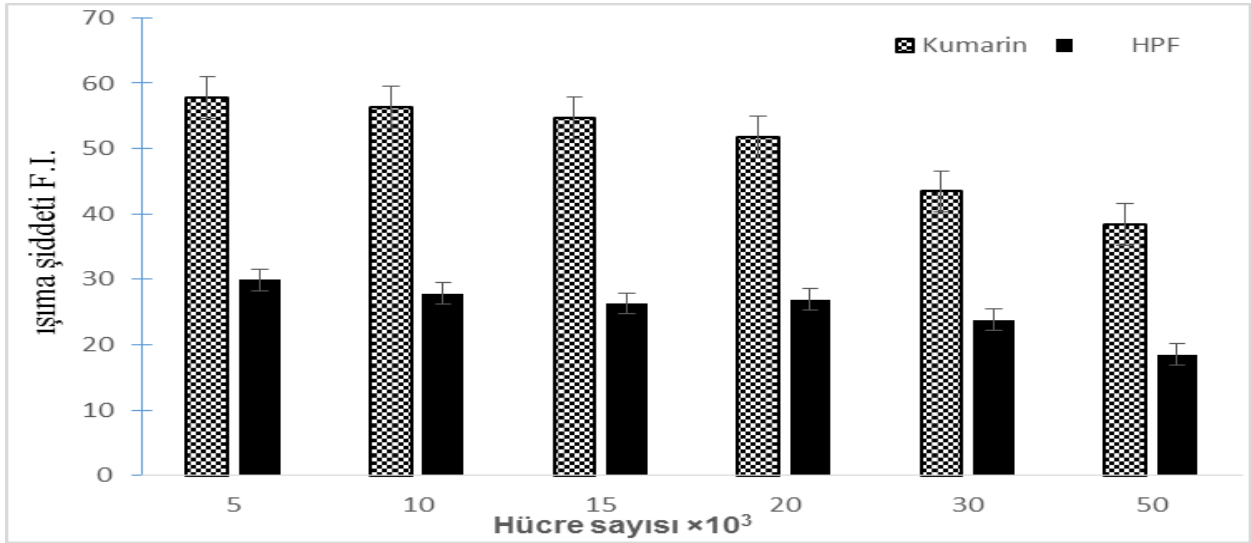
3.10. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel (*invaziv*) olmayan Klinik Araştırmalar değerlendirme komisyonu tarafından 03.03.2011 tarih ve 113-GOA Protokol numaralı 2011/06-15 numarası ile onaylanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Sayısının Optimizasyonu

Hücre sayısının optimizasyonu için, altı farklı hücre konsantrasyonu (5, 10, 15, 20, 30, 50 bin hücre) denendi. Önce konfluent hale gelmiş hücreler toplandı ve hücre sayımı yapıldıktan sonra, altı farklı konsantrasyonda hücre hazırlandı. İşlem sonunda, hücreler 96 kuyucuklu plağa (plate), her kuyucuğa sırasıyla 5, 10, 15, 20, 30, 50 bin hücre gelecek şekilde 100 µl olarak kondu. Kumarin ile yapılacak olan denemelerde, her 100 µl karışım için 1 µl kumarin kullanıldı. HPF ile denenen guruplara ise 1.5 µl HPF eklendi. 15 dakika inkübasyon işleminden sonra her bir kuyuya 50 µl reaksiyon karışımından ($H_2O_2 = 0.062 \mu M$, $DMSO = 0.038 \mu M$ (Kumarin için) ve $0.38 \mu M$ (HPF için), $Fe-EDTA = 1.3 mM$ (Kumarin için) ve $0.13 mM$ (HPF için), Askorbik Asit = $48 mM$ ve zaman 30 dakika) eklendi. Tekrar 30 dakika inkübe edildikten sonra sırasıyla 385/450 nm (kumarin için) ve 490/515 nm (HPF için) eksitasyon/emisyon dalga boylarında ölçümler gerçekleştirildi. Bu ölçümler sekiz kez tekrarlandı.



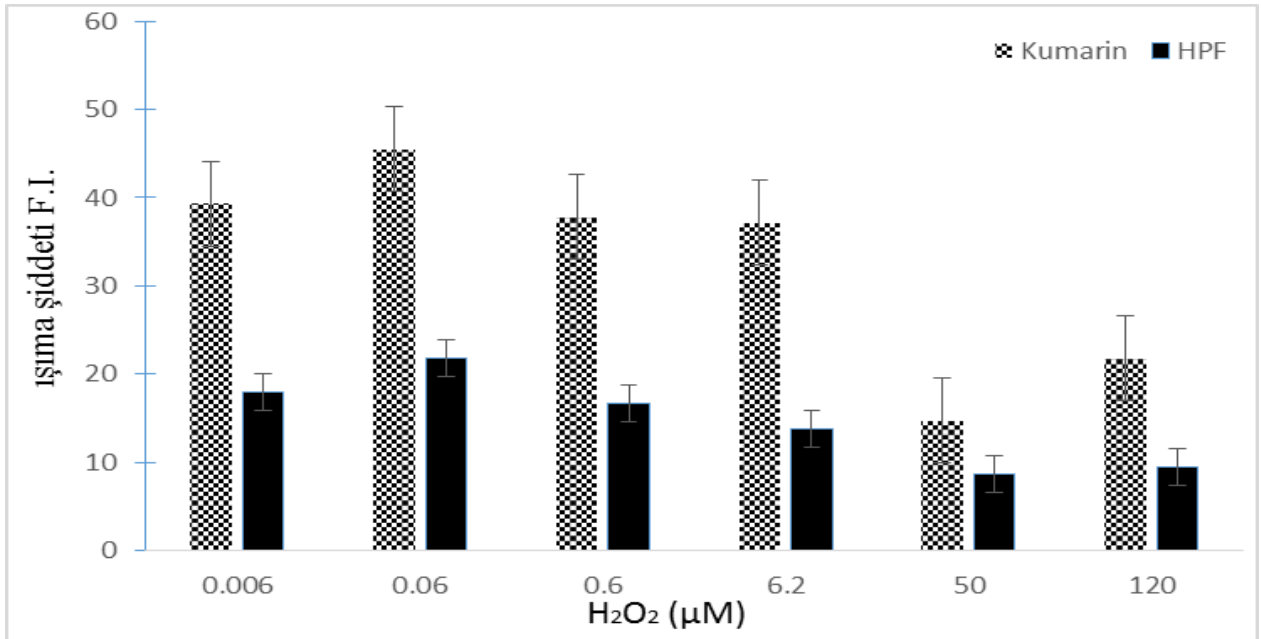
Şekil 8. Hücrenin farklı konsantrasyonlarında fluoresans ışıma şiddetindeki değişim.

Sonuç: Bu deneyin sonucunda, ışıma şiddetinin en yüksek olduğu hücre sayısı 5 000 olarak saptandı. Ancak 5 000 hücre sayısı ile 20 000 hücre sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı için 20 000 hücre sayısı en uygun hücre sayısı olarak kabul edildi.

4.2. H₂O₂ Optimizasyonu

H₂O₂ için altı farklı konsantrasyon (120, 50, 6.2, 0.62, 0.062, 0.0062 μ M) denendi ve tüm denemelerde diğer değişkenler literatürde yer alan değerlerde (DMSO = 200 μ M, Fe-EDTA = 80 mM, Askorbik Asit = 240 mM ve zaman 30 dakika) sabit tutuldu (4).

Önce konfluent hale gelmiş hücreler toplandı ve hücre sayımı yapıldı ve işlem sonu hücreler 96 lık plakada her kuyuya 20000 hücre gelecek şekilde 100 μ l hücre konuldu ve ardından altı farklı tüpte karışımlar hazırlandı. Kumarin ile yapılacak olan denemelerde, her 100 μ l karışım için 1 μ l kumarin kullanıldı. HPF ile denenen guruplara ise 1.5 μ l HPF eklendi. 15 dakika inkübasyon işleminden sonra her bir kuyuya 50 μ l reaksiyon karışımından (değişik konsantrasyonlarda) eklendi. Tekrar 30 dakika inkübe edildikten sonra sırasıyla 385/450 nm (Kumarin için) ve 490/515 nm (HPF için) eksitasyon/emisyon dalga boylarında ölçümler gerçekleştirildi. Bu ölçümler dokuz kez tekrarlandı.



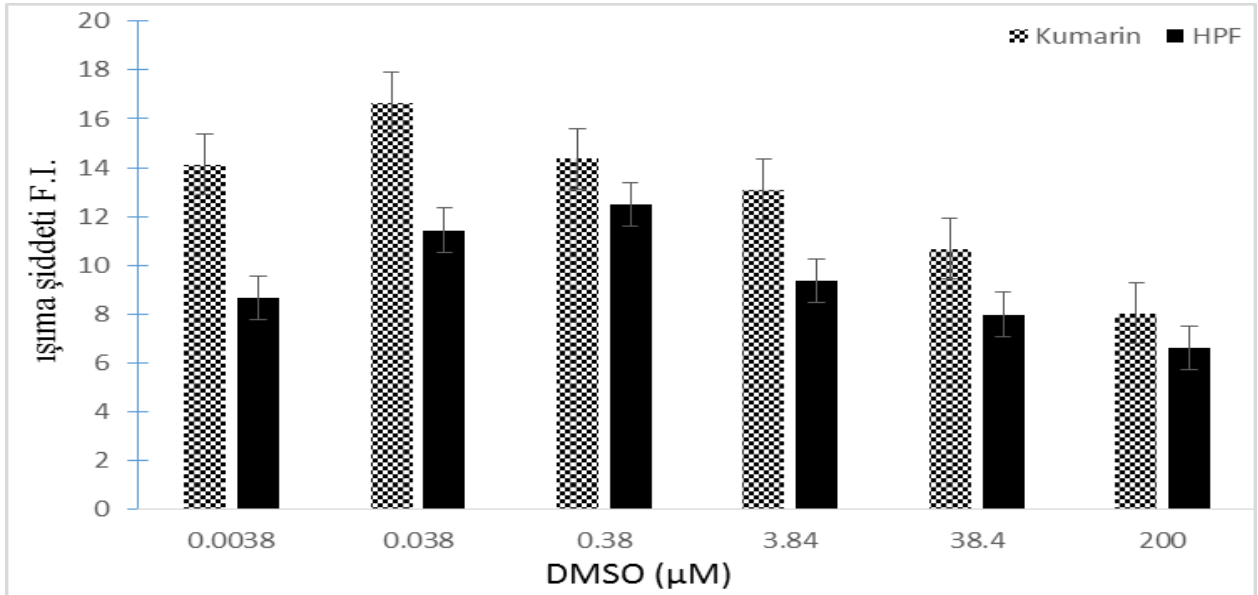
Şekil 9. H₂O₂'nin farklı konsantrasyonlarında fluoresans ışıma şiddetindeki değişim.

Sonuç: Hem HPF hem de kumarin için en yüksek ışıma şiddetinin gözlemlendiği 0.062 μ M hidrojen peroksit konsantrasyonu optimum konsantrasyon olarak belirlendi.

4.3. DMSO Optimizasyonu

DMSO için altı farklı konsantrasyon (200, 38.4, 3.84, 0.384, 0.0384, 0.00384 μM) denendi ve tüm denemelerde diğer değişkenler (Fe-EDTA = 80 mM, Askorbik Asit = 240 mM ve H_2O_2 = 120 μM ve zaman 30 dakika) sabit tutuldu (4).

Önce konfluent hale gelmiş hücreler toplandı ve hücre sayımı yapıldı ve işlem sonu hücreler 96 kuyucuklu plaka da, her kuyuya 20 000 hücre gelecek şekilde 100 μl hücre konuldu ve ardından altı farklı tüpte karışımlar hazırlandı. Kumarinle yapılacak olan denemelerde, her 100 μl karışım için 1 μl kumarin kullanıldı. HPF ile denenen guruplara ise 1.5 μl HPF eklendi. 15 dakika inkübasyon işleminden sonra her bir kuyuya 50 μl bu reaksiyon karışımından (değişik konsantrasyonlarda) eklendi. Tekrar 30 dakika inkübe edildikten sonra sırasıyla 385/450 ve 490/515 nm eksitasyon/emisyon dalga boylarında ölçümler gerçekleştirildi. Bu ölçümler dokuz kez tekrarlandı.



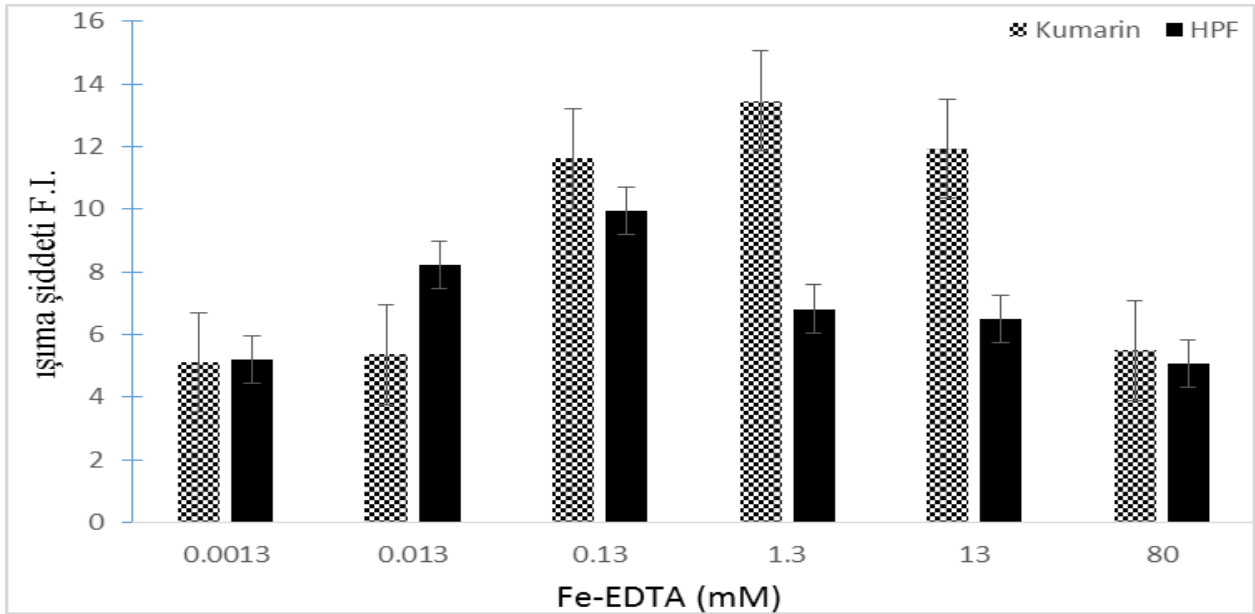
Şekil 10. DMSO'nun farklı konsantrasyonlarında fluoresans ışıma şiddetindeki değişim

Sonuç: Prob olarak HPF nin kullanıldığı ölçümlerde, en yüksek ışıma şiddetinin gözlemlendiği 0.38 μM DMSO konsantrasyonu, kumarin kullanıldığında gözlenen en yüksek ışıma şiddetinin olduğu 0.038 μM DMSO konsantrasyonu optimum konsantrasyonlar olarak belirlendi.

4.4. Fe-EDTA Optimizasyonu

Fe-EDTA için altı farklı konsantrasyon (80, 13, 1.3, 0.13, 0.013, 0.0013 mM) denendi. Tüm denemelerde diğer değişkenler (DMSO = 200 μ M, Askorbik Asit = 240 mM ve H₂O₂ = 120 μ M ve zaman 30 dakika) sabit tutuldu (4).

Önce konfluent hale gelmiş hücreler toplandı ve hücre sayımı yapıldı ve işlem sonu hücreler 96 kuyucuklu plaka da, her kuyuya 20000 hücre gelecek şekilde 100 μ l hücre konuldu ve ardından altı farklı tüpte reaksiyon karışımlar hazırlandı. Kumarin ile yapılacak olan denemelerde, her 100 μ l karışım için 1 μ l Kumarin kullanıldı. HPF ile denenen gruplara ise 1.5 μ l HPF eklendi. 15 dakika inkübasyon işleminden sonra her bir kuyuya 50 μ l bu reaksiyon karışımından (değişik konsantrasyonlarda) eklendi. Tekrar 30 dakika inkübe edildikten sonra sırasıyla 385/450 ve 490/515 nm eksitasyon/emisyon dalga boylarında ölçümler gerçekleştirildi. Bu ölçümler dokuz kez tekrarlandı.



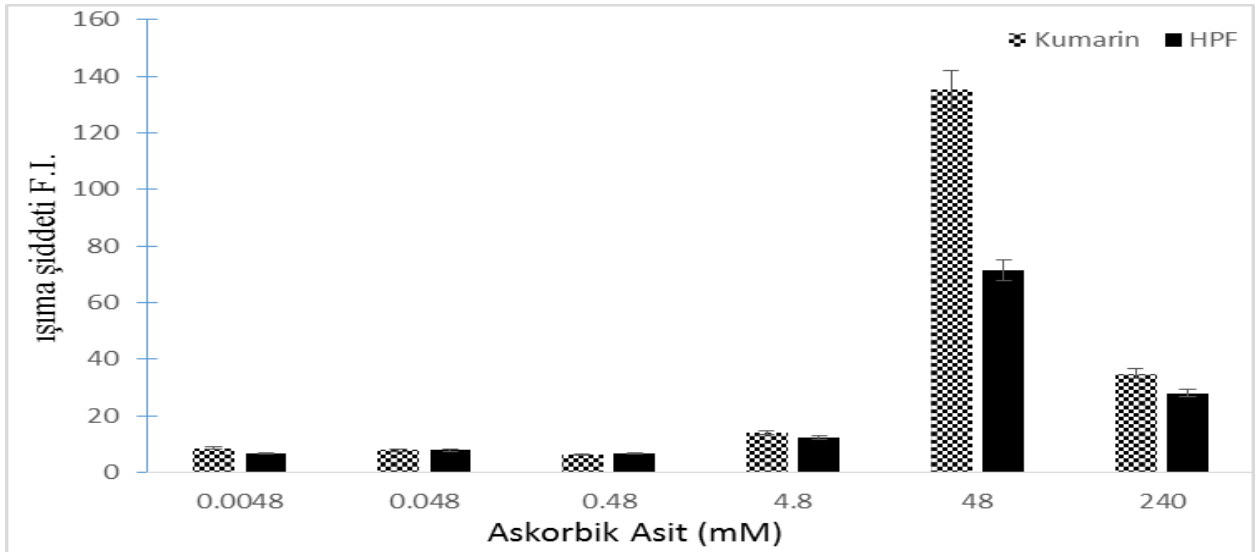
Şekil 11. Fe-EDTA'nın farklı konsantrasyonlarında fluoresans ışıma şiddetindeki değişim.

Sonuç: HPF probu ile yapılan ölçümlerde en yüksek ışıma şiddetinin gözlemlendiği 0.13 mM ve kumarinle yapılan ölçümlerde 1.3 mM Fe-EDTA konsantrasyonları optimum konsantrasyon olarak belirlendi.

4.5. Askorbik Asit Optimizasyonu

Askorbik asitin optimizasyonu için altı farklı konsantrasyon (240, 48, 4.8, 0.48, 0.048, 0.0048 mM) denendi. Tüm denemelerde diğer değişkenler (DMSO = 200 μ M, Fe-EDTA = 80 mM ve H_2O_2 = 120 μ M ve zaman 30 dakika) sabit tutuldu (4).

Önce konfluent hale gelmiş hücreler toplandı ve hücre sayımı yapıldı ve işlem sonu hücreler 96 kuyucuklu plaka da, her kuyuya 20000 hücre gelecek şekilde 100 μ l hücre konuldu ve ardından altı farklı tüpte karışımlar hazırlandı. Kumarin ile yapılacak olan denemelerde, her 100 μ l karışım için 1 μ l Kumarin kullanıldı. HPF ile denenen gruplara ise 1.5 μ l HPF eklendi. 15 dakika inkübasyon işleminden sonra her bir kuyuya 50 μ l bu reaksiyon karışımından (değişik konsantrasyonlarda) eklendi. Tekrar 30 dakika inkübe edildikten sonra sırasıyla 385/450 ve 490/515 nm eksitasyon/emisyon dalga boylarında ölçümler gerçekleştirildi. Bu ölçümler dokuz kez tekrarlandı.



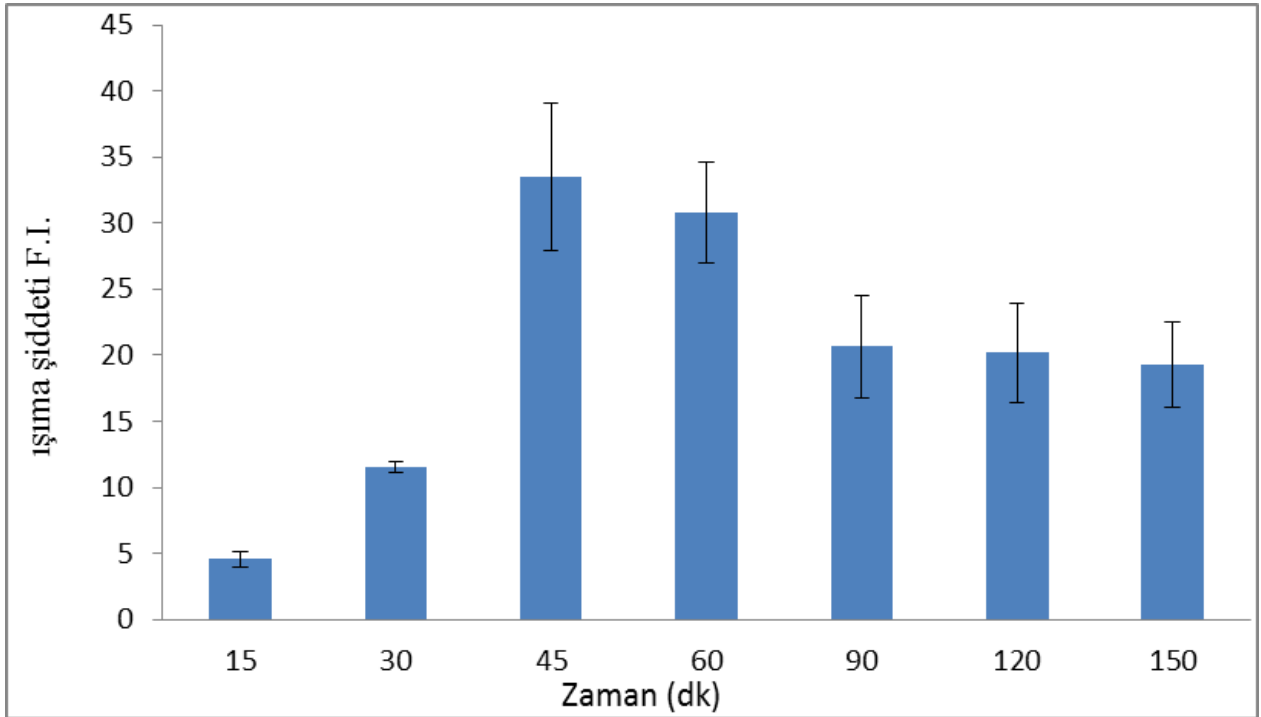
Şekil 12. Askorbik asitin farklı konsantrasyonlarında fluoresans ışıma şiddetindeki değişim.

Sonuç: Hem HPF, hem de kumarin probu ile yapılan ölçümlerde en yüksek ışıma şiddetinin gözlemlendiği 48 mM Askorbik Asiti konsantrasyonu optimum konsantrasyon olarak belirlendi.

4.6. HPF Probu İçin İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu

İnkübasyon için yedi farklı süre seçildi (15, 30, 45, 60, 90, 120,150 dakika). Tüm denemelerde diğerk değişkenler (DMSO = 0.38 µM, Fe-EDTA = 0.13 mM, Askorbik Asit = 48 mM ve H₂O₂ = 0.062 µM) sabit tutuldu (4).

Önce konfluent hale gelmiş hücreler toplandı ve hücre sayımı yapıldı. Sayım işleminin sonunda 96 kuyucuklu plaka da, her kuyuya 20,000 hücre gelecek şekilde 100 µl hücre konuldu ve ardından yedi farklı tüpte karışımlar hazırlandı. HPF deneneni hücre grubuna 1.5 µl HPF eklendi ve 15 dakika inkübe edildi. İşlem bitikten sonra 50 µl karışımdan her kuyuya eklendi ve inkübe edildi. İnkübasyon sırasında belirli aralıklarda (15, 30, 45, 90, 120, 150. dakikalarda) 490/515nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirildi. Bu ölçümler dokuz kez tekrarlandı.



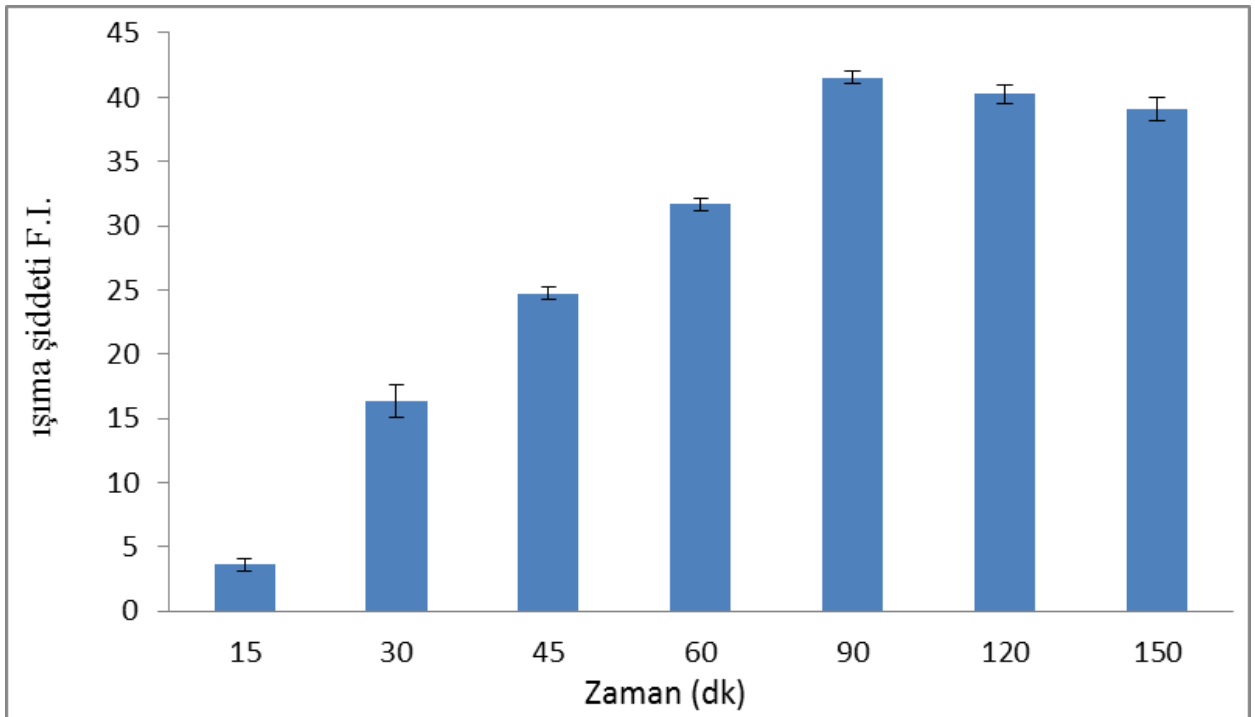
Şekil 13. HPF'nin farklı zaman dilimlerindeki ışıma şiddetleri

Sonuç: HPF probu için en yüksek ışıma şiddetinin gözlemlendiği 45 dakikalık süre, HPF'nin optimum inkübasyon süresi olarak belirlendi.

4.7. Kumarin İçin İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu

İnkübasyon için yedi farklı süre seçildi (15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 dk.). Tüm denemelerde diğerk değişkenler (DMSO = 0.038 µM, Fe-EDTA = 1.3 mM, Askorbik Asit = 48 mM ve H₂O₂ = 0.062 µM) sabit tutuldu (4).

Önce konfluent hale gelmiş hücreler toplandı ve hücre sayımı yapıldı ve işlemin sonu hücreler 96 kuyucuklu plaka da, her kuyuya 20000 hücre gelecek şekilde 100 µl hücre konuldu ve ardından yedi farklı tüpte karışımlar hazırlandı. Her 100 µl reaksiyon karışımı için 1µl Kumarin eklendi ve inkübe edildi. İnkübasyon sırasında belirli aralıklarda (15, 30, 45, 90, 120 ve 150. dakikalarda) 385/450nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirildi. Bu ölçümler dokuz kez tekrarlandı.



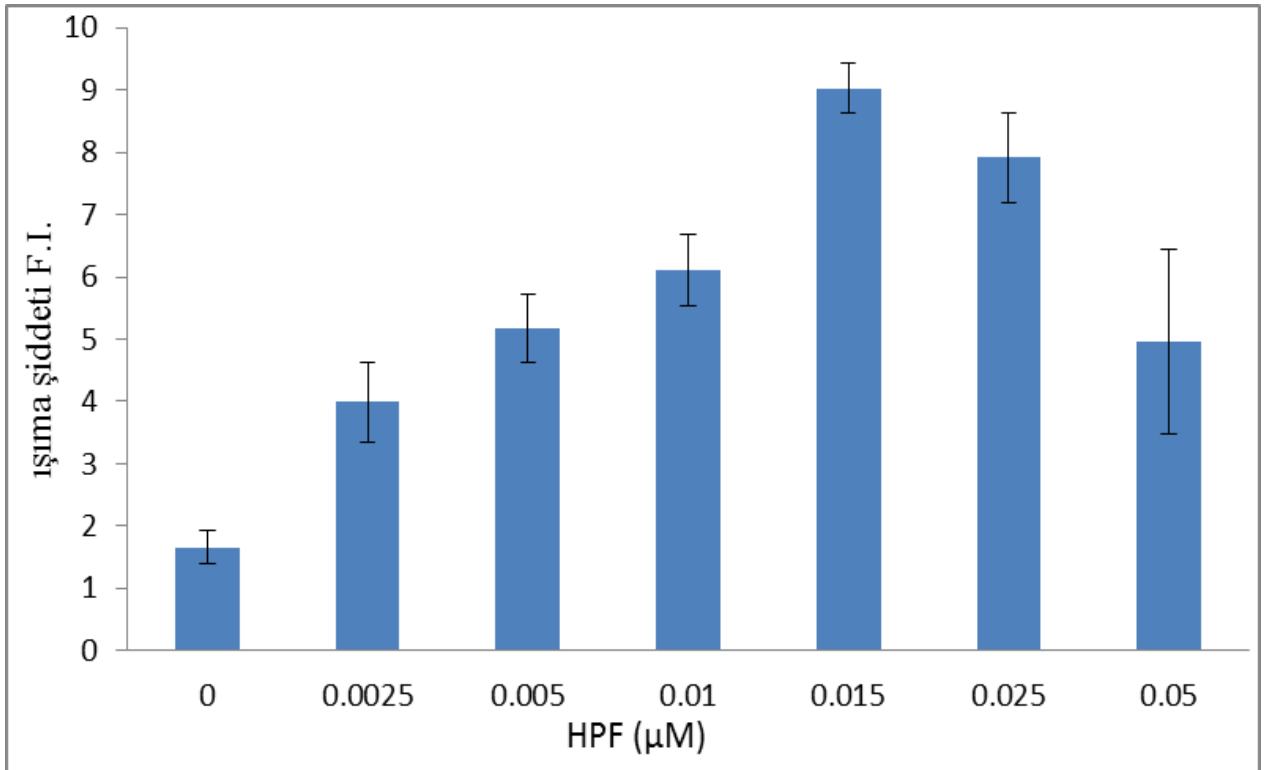
Şekil 14. Kumarin’in farklı zaman dilimlerindeki ışma şiddetleri

Sonuç: Kumarin probu için en yüksek ışma şiddetinin gözleendiği 90 dakikalık süre, kumarinin optimum inkübasyon süresi olarak belirlendi.

4.8. HPF Prob Konsantrasyonunun Optimizasyonu

HPF için sekiz farklı konsantrasyon (0.0025, 0.005, 0.01, 0.015, 0.025, 0.05, 0.075, 0.0 μ M) denendi. Tüm denemelerde diğer değişkenler (DMSO = 200 μ M, Fe-EDTA = 80 mM, Askorbik Asit = 240 mM ve H₂O₂ = 120 μ M ve zaman 30 dakika) sabit tutuldu (4).

Önce konfluent hale gelmiş hücreler toplandı ve hücre sayımı yapıldı. Sayım işleminden sonra 96 kuyucuklu plaka da, kullanılarak her kuyuya 20000 hücre gelecek şekilde 100 μ l hücre konuldu. Daha sonra sekiz farklı tüpe karışımlar konularak üzerlerine 0.0025, 0.005, 0.01, 0.015, 0.025, 0.05, 0.075, 0 μ M (1 ml) HPF eklendi ve 15 dakika inkübe edildi işlem bitikten sonra 50 μ l karışımdan her kuyuya eklendi ve tekrar 30 dakika inkübe edildi 30 dakikanın sonunda 490/515 nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirildi. Bu ölçümler dokuz kez tekrarlandı.



Şekil 15. HPF'nin farklı konsantrasyonlarındaki ışıma şiddetleri

Sonuç: HPF nin en yüksek ışıma şiddetinin gözlemlendiği 0.015 μ M HPF konsantrasyonu optimum değer olarak belirlendi.

4.8.1. HPF Probenun Işıma Şiddetini Etkileyen Parametreler

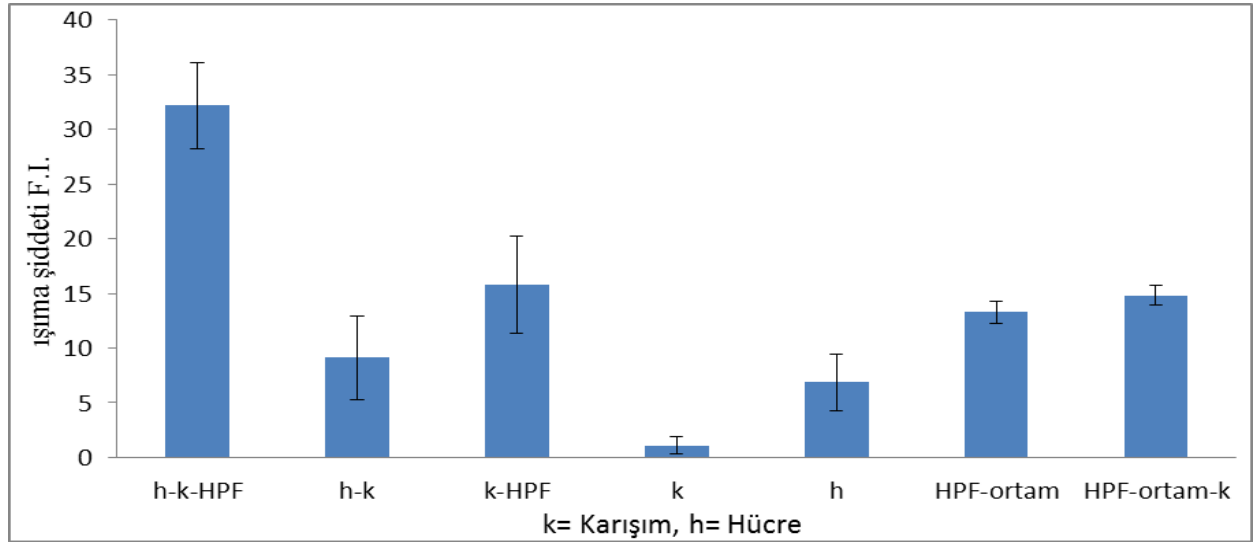
HPF probunun yayımladığı ışıma şiddetinin diğer parametreler (Hücre, hücre ortamı ve reaksiyon karışımı ayrı ayrı ve birlikte değişik kombinasyonlarda) tarafından ne kadar etkilendiğini saptamak için yedi ayrı düzenek halinde tepkime ortamı oluşturuldu. Kurgulanan deney ortamlarının içerikleri;

1. Hücre (h) +reaksiyon karışımı (k)+ HPF
2. Hücre (h) + reaksiyon karışımı (k)
3. Reaksiyon karışımı (k)+ HPF
4. Reaksiyon karışımı (k)
5. Hücre (h)
6. Hücre ortamı+ HPF
7. Reaksiyon karışımı(k)+hücre ortamı+ HPF

Şeklinde düzenlendi ve her biri için dokuz kez tekrarlanan ölçüm değerleri ile verdikleri ışıma şiddetleri saptandı.

Reaksiyon karışımı içeriği: 0.062 μM H_2O_2 , 0.38 μM DMSO, 0.13 mM Fe-EDTA, 48 mM Askorbik asit (Bu değerler, yukarıdaki çalışmalardan elde edilen optimum değerlerdir).

Hücre ortamı içeriği: %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM.



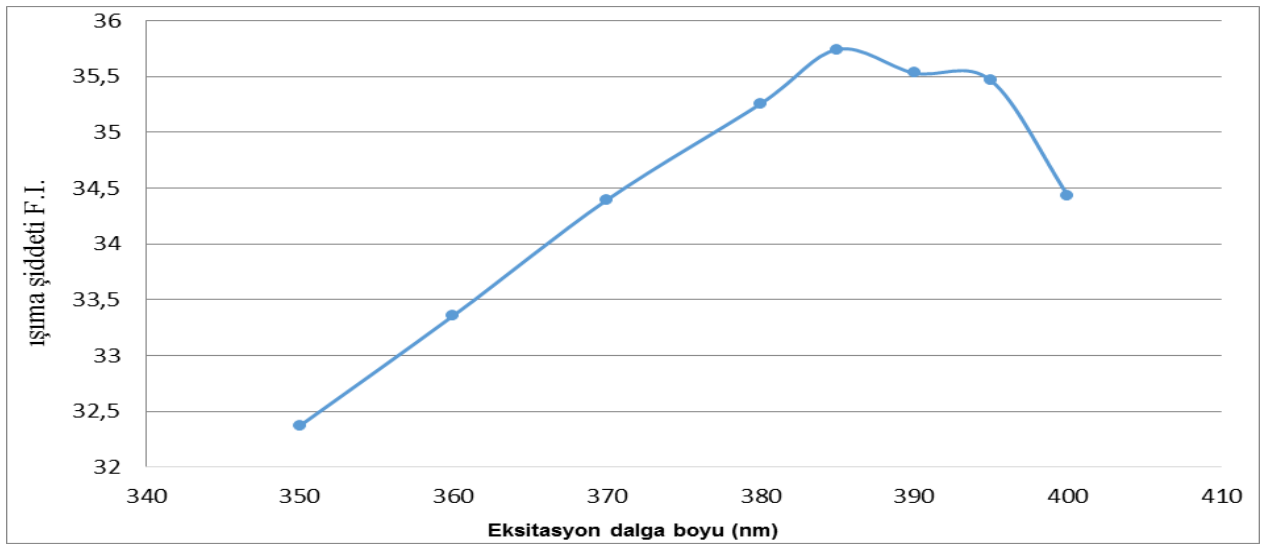
Şekil 16. HPF, karışım, hücre ve ortamının ışıma şiddetleri.

Sonuç: HPF ile elde edilen ışıma şiddetinin ne kadarının hücre içinde oluşan OH radikallerinden kaynaklandığını belirlemek için yapılan bu denemelerde, hücre olmayan ortamda HPF+hücre ortamı+reaksiyon karışımı kombinasyonunun yapmış olduğu ışıma şiddeti 13.18 ± 1.99 F.I (n=40) olarak ölçüldü. Bu ölçüm hücreli ortamda gerçekleştirildiğinde 32.72 ± 7.22 F.I (n=40) olarak saptandı. Sonuç olarak; hücre içeren deney grubundan elde edilen ışıma şiddetinin 13.18 FI kadarı hücre haricindeki parametrelerden kaynaklanmaktadır.

4.9. Kumarin-3- Karboksilik Asidin (Kumarin) Optimizasyonu

4.9.1. Eksitasyon Dalga Boyu Optimizasyonu

Literatürde Kumarin için en yüksek eksitasyon ışıma şiddetinin 350-400 nm dalga boyları arasında olduğu belirtilmektedir. Kumarin'in bu aralıktaki en yüksek ışıma şiddetini gösterdiği eksitasyon dalga boyunu belirlemek amacıyla farklı dalga boylarında (350, 360, 370, 380, 385, 390, 395, 400 nm) ölçümler gerçekleştirildi. Yapılan dalga boyu taramasında her bir dalga boyu için ölçümler dokuz kez tekrarlandı.



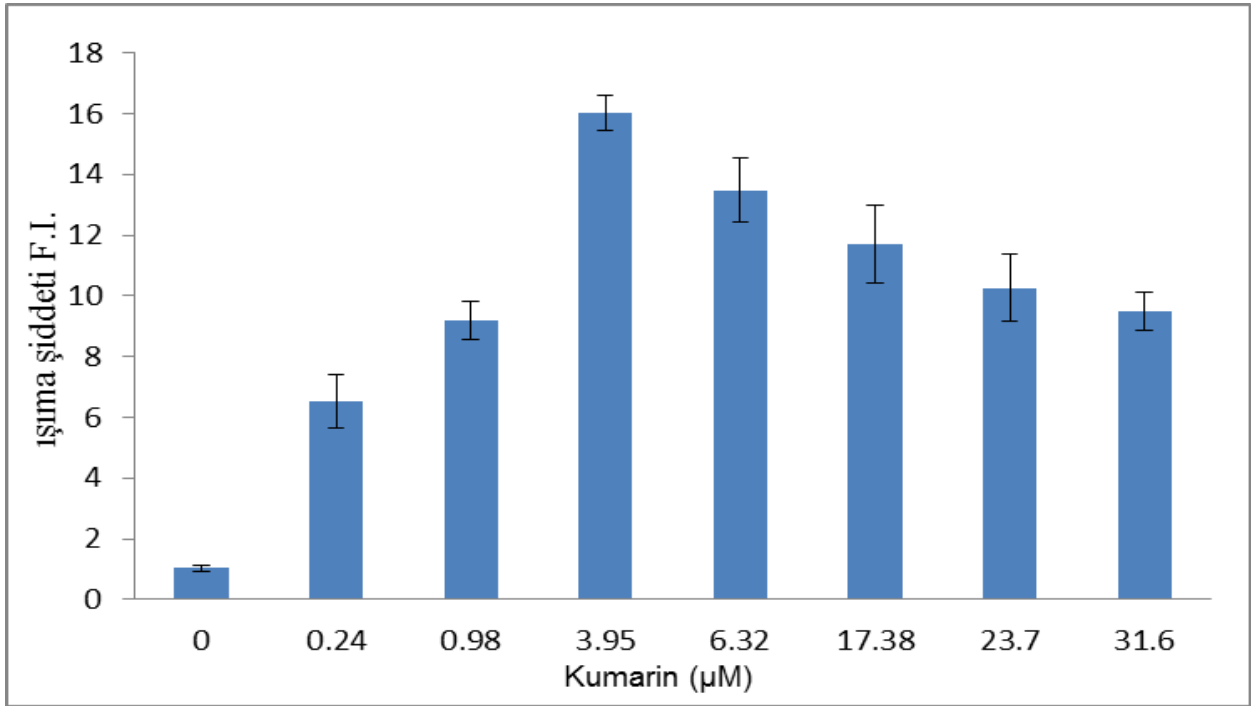
Şekil 17. Kumarinin farklı dalga boylarındaki ışıma şiddetlerinin değişimi

Sonuç: Kumarinin eksitasyon dalga boyu taramasında, en yüksek ışıma şiddetinin gözlemlendiği 385 nm, optimum eksitasyon dalga boyu olarak belirlendi.

4.9.2. Kumarin Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Tüm denemelerde diğer değişkenler (DMSO = 200 μ M, Fe-EDTA = 80 mM, Askorbik Asit = 240 mM ve H₂O₂ = 120 μ M ve zaman 30 dakika) sabit tutulurken (4), Kumarin için 8 farklı konsantrasyon değeri (0, 0.24, 0.98, 3.95, 6.32, 17.38, 23.7, 31.6 μ M) uygulandı.

Önce konfluent hale gelmiş hücreler toplandı ve hücre sayımı yapıldı. Sayım işlemi sonunda 96 kuyucuklu plağa, her kuyuya 20000 hücre gelecek şekilde 100 μ l hücre konuldu ve ardından 8 farklı tüpte karışımlar hazırlandı. Her 100 μ l reaksiyon karışımı için yukarıda belirtilen farklı konsantrasyonlarda Kumarin probundan eklendi. 15 dakikalık inkübasyon işleminden sonra, farklı prob konsantrasyonlu karışımlardan 50'şer μ l alınarak kuyucuklara eklendi ve tekrar 30 dakika inkübe edildi. 30 dakikanın sonunda 385/450 nm eksitasyon/emisyon dalga boyunda ölçümler gerçekleştirildi. Bu ölçümler dokuz kez tekrarlandı.



Şekil 18. Kumarinin farklı konsantrasyonlarındaki ışıma şiddetleri

Sonuç: Kumarinin en yüksek ışıma şiddetinin gözlemlendiği 3.95 μ M, optimum konsantrasyon değeri olarak belirlendi.

4.9.3. Kumarin Probenun Işıma Şiddetini Etkileyen Parametreler

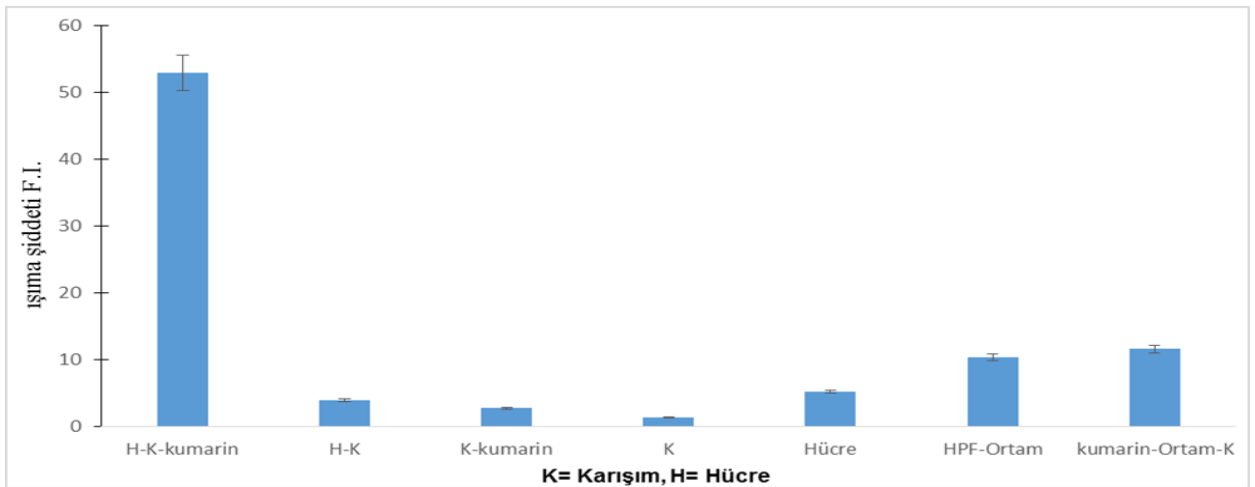
Kumarin probunun yayımladığı ışıma şiddetinin diğer parametreler (Hücre, hücre ortamı ve reaksiyon karışımı ayrı ayrı ve birlikte değişik kombinasyonlarda) tarafından ne kadar etkilendiğini saptamak için yedi ayrı düzenek halinde (ayrı ayrı ve değişik kombinasyonlarda) tepkime ortamı oluşturuldu. Kurgulanan deney ortamlarının içerikleri;

1. Hücre (h) + reaksiyon karışımı (k) + Kumarin
2. Hücre (h) + reaksiyon karışımı (k)
3. Reaksiyon karışımı (k) + Kumarin
4. Reaksiyon karışımı (k)
5. Hücre (h)
6. Hücre ortamı + Kumarin
7. Reaksiyon karışımı (k) + hücre ortamı + Kumarin

Şeklinde düzenlendi ve her biri için dokuz kez tekrarlanan ölçüm değerleri ile verdikleri ışıma şiddetleri saptandı.

Reaksiyon karışımı içeriği: 0.062 μM H_2O_2 , 0.038 μM DMSO, 1.3 mM Fe-EDTA, 48 mM Askorbik asit (Optimizasyon deneyleri sonucunda elde edilen optimum konsantrasyonlar kullanılmıştır).

Hücre ortamı içeriği: %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM.

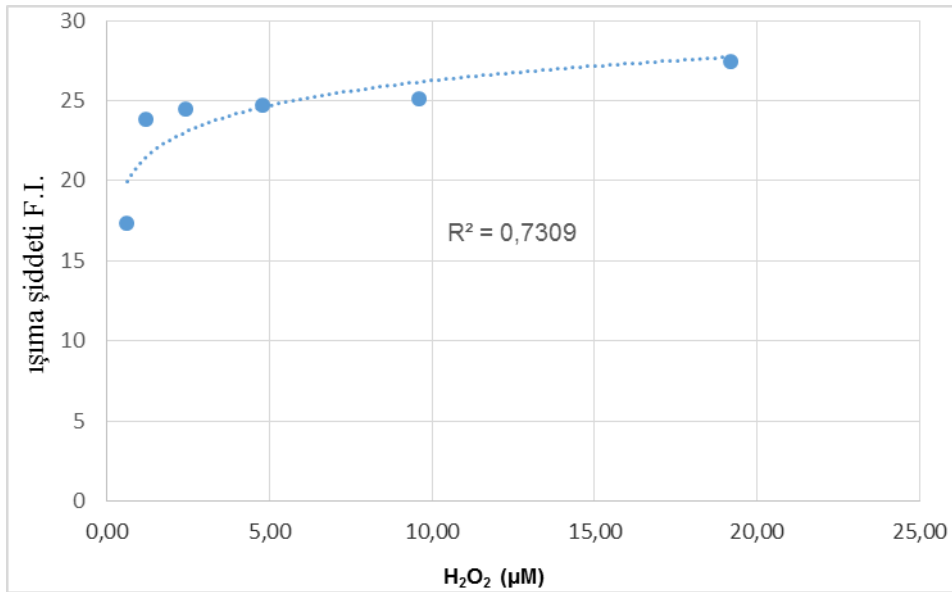


Şekil 19. Kumarin, karışım, hücre ve ortamının ışıma şiddetleri.

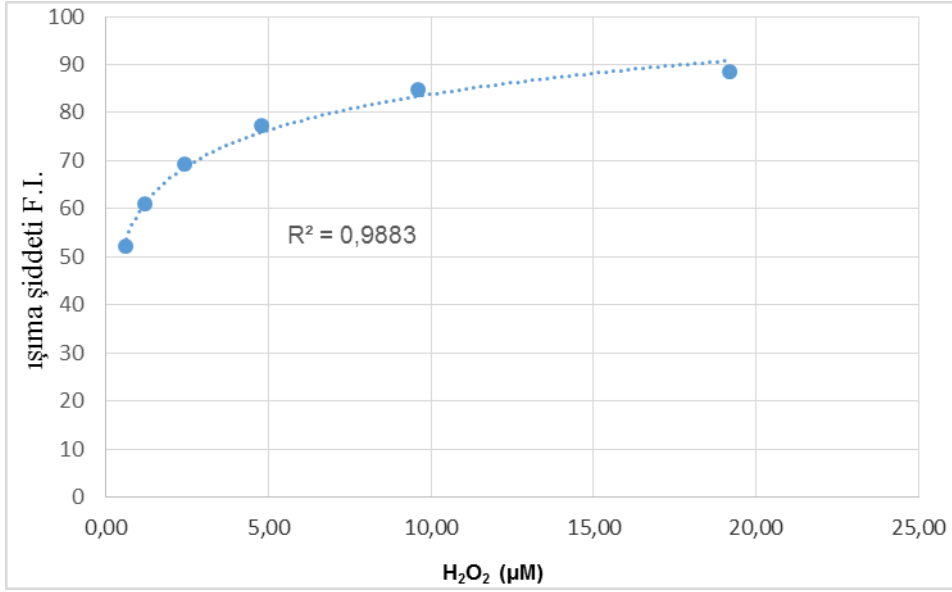
Sonuç: Kumarin'den edilen ışıma şiddetinin ne kadarının hücre içinde oluşan OH radikallerinden kaynaklandığını belirlemek için yapılan bu denemelerde, hücre olmayan ortamda Kumarin+hücre ortamı+reaksiyon karışımı kombinasyonunun yapmış olduğu ışıma şiddeti 11.34 ± 1.19 F.I (n=40) olarak ölçüldü. Bu ölçüm hücreli ortamda gerçekleştirildiğinde 52.1 ± 4.1 F.I (n=40) olarak saptandı. Sonuç olarak; hücre içeren deney grubundan elde edilen ışıma şiddetinin 11.34 FI kadarı hücre haricindeki parametrelerden kaynaklanmaktadır.

4.10. HPF ve Kumarin Problemleri için Standart Grafikleri

İnsan dermal hücreleri ortamında oluşan OH radikallerini ölçebilmek amacıyla standart grafikleri oluşturuldu. Her iki prob için de standart grafikleri optimal koşullarda ($0.038 \mu\text{M}$ (kumarin için) ve $0.38 \mu\text{M}$ (HPF için) DMSO, 1.3 mM (Kumarin için) ve 0.13 mM (HPF için) Fe-EDTA, 48 mM Askorbik asit), altı farklı H_2O_2 konsantrasyon değeri kullanılarak ($0.6, 1.2, 2.4, 4.8, 9.6, 19.2 \mu\text{M}$) 20000 hücre ortamında yapılan ölçümler sonucunda belirlendi.



Şekil 20. HPF Probu İçin Standart Eğrisi.



Şekil 21. Kumarin Probu İçin Standart Eğrisi.

Sonuç: probalara hazırlanan standart grafiklerinin R^2 değerlerine göre kumarin'in ($R^2=0.9883$) performansının HPF ($R^2=0.7309$) probundan daha iyi olduğu belirlenmiştir.

4.11. Deney içi Tekrarlanabilirlik (Kesinlik)

Elde edilen standart grafiklerinden yola çıkarak, bu probalarla yapılan ölçüm deneylerinde ortaya çıkan deney-içi tekrarlanabilirlik bulguları değerlendirildi.

HPF ve Kumarin probarı için optimal koşullarda elde edilen sonuçlar aşağıdaki tabloda gösterilmiştir. Tekrarlama sayısı $N=20$ olup, %CV

$$\text{Varyasyon Katsayısı \% (CV)} = \left(\frac{\text{Standart sapma (SD)}}{\text{Ortalama değer (X)}} \right) \times 100$$

$$\text{RE} = \text{SD} \times 4$$

Formüllerine göre hesaplanmıştır.

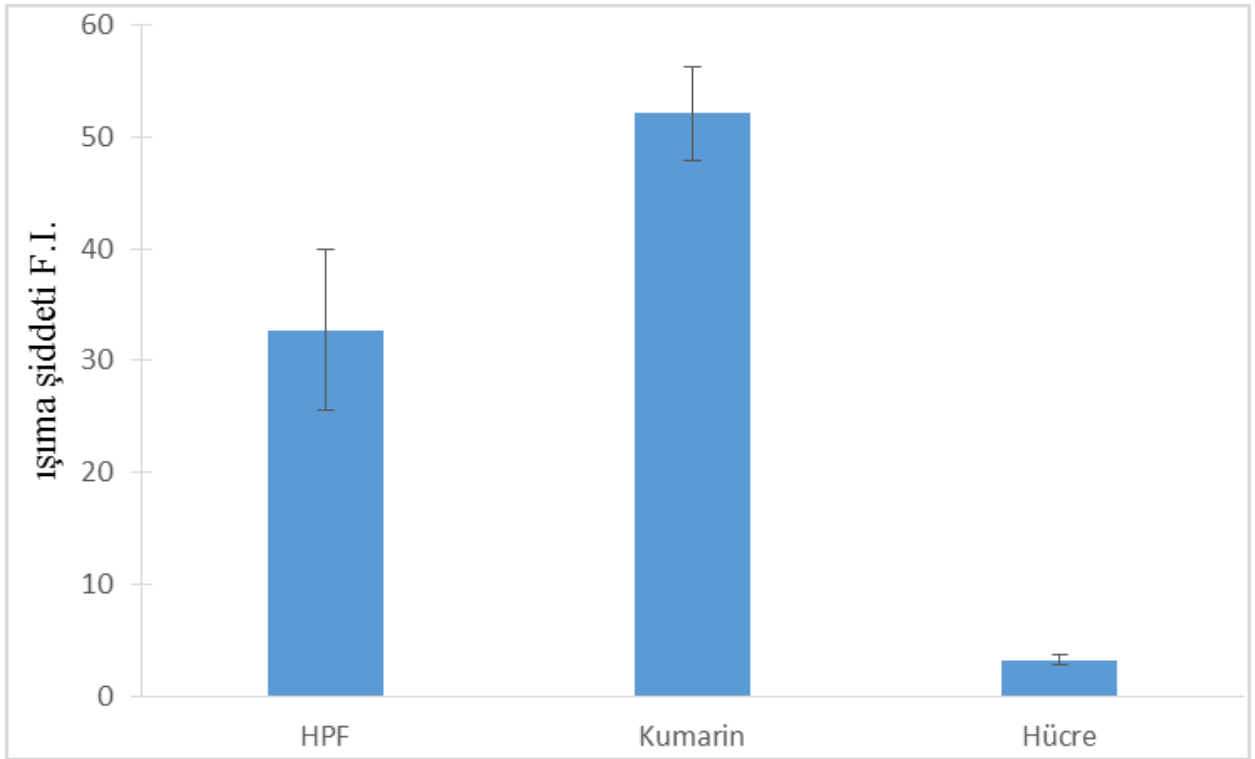
Tablo 3. HPF ve Kumarin problemleri için hesaplanan SD, Rasgele hatalar (random error, RE), %CV ve deney-içi tekrarlanabilirlik

Örnek N	HPF	Kumarin			HPF	Kumarin
1	27,91	52,02		Ortalama	34,49	52,93
2	29,51	52,08		SD	2,379	0,503
3	31,07	52,19		% CV	6,898	0,95
4	33,35	52,69		RE	9,515	2,012
5	34,24	52,71				
6	34,39	52,74				
7	34,45	52,74				
8	34,48	52,76				
9	35,19	52,82				
10	35,22	52,83				
11	35,43	52,9				
12	35,47	52,93				
13	35,59	52,93				
14	35,64	52,99				
15	35,72	53,35				
16	35,74	53,46				
17	35,98	53,46				
18	36,61	53,52				
19	36,75	53,55				
20	36,96	53,93				

Sonuç: Kumarin için %CV değeri 0,95 ve HPF için 6.898 olarak belirlendi. %CV< 5 ise yöntemin performansı kabul edilebilir sınırdadır. Buna göre kumarin probu ile yapılan ölçümlerin tekrarlanabilirliğinin çok iyi olduğu saptanmıştır.

4.12. HPF ve Kumarin Problarının Optimize Koşullardaki Ölçüm Değerlerinin karşılaştırılması

HPF ve Kumarin problemleri ile yalnızca hücrelerden elde edilen floresans ışımaya şiddeti değerleri Şekil 17 de gösterilmiştir. Her iki prob için 40 kez tekrarlanan bu deneyler aynı koşullar altında gerçekleştirildi. Hem aynı gün içinde yapılan ölçümlerde hem de farklı günlerde yapılan ölçümlerde her iki prob da paralel çalışıldı ve reaksiyon karışımında optimize edilmiş değerler ($0.062 \mu\text{M}$ H_2O_2 , $0.038 \mu\text{M}$ (Kumarin için) ve $0.38 \mu\text{M}$ (HPF için) DMSO, 1.3 mM (Kumarin için) ve 0.13 mM (HPF için) Fe-EDTA, 48 mM Askorbik asit) kullanıldı.



Şekil 22. Kumarin ve HPF problemlerinin ve yalnızca hücrelerin yapmış oldukları ışımaya şiddetleri. ($p < 0.05$).

Sonuç: Hücreli ortamda belirlediğimiz optimum koşullarda yapılan ölçüm sonuçlarına göre, kumarin probunun ışımaya şiddetinin HPF probuna göre ($p < 0.05$) daha yüksek olduğu saptanmıştır.

5. TARTIŞMA

Biyolojik süreçlerin gerçekleşmesinde serbest radikaller çok önemli rol oynamaktadırlar. Ancak aşırı serbest radikal üretimi ve oksidatif stres bir çok dejeneratif hastalığın oluşumunda çok önemli bir role sahiptir. Harman, bundan 55 yıl önce, hücrelerin normal metabolik süreç içinde endojen olarak ürettikleri serbest radikallerden kaynaklanan oksidatif hasarın birikimi sonucunda hücre yaşlanmasına ilişkin bir kuram önermişti (14). Stadtman ve arkadaşları (1992), yaşlanmayla birlikte oluşan okside enzim birikimiyle fizyolojik fonksiyon kaybı arasında bir bağlantı olduğunu ileri sürdüler. Simm ve Brömme 2005 yılında serbest radikal yakalayıcı moleküller üzerinde çalışarak, serbest radikalleri daha kararlı moleküller haline dönüştürmeye çabaladılar. Çünkü bu kararsız, yüksek enerjili ve çok reaktif olan bu moleküller, protein yapısında, hücre membranında, nükleik asitlerde özellikle de DNA da hasara neden olmaktadır. Bütün bu çalışmalar çok zararlı etkileri olan serbest radikallerin saptanmalarının ve miktar belirtilmelerinin ne kadar önemli olduğunu göstermiş oldu. Çok sayıda laboratuvar ve araştırmacı da bu yönde çalışmalarını sürdürmektedirler. Giriş bölümünde de belirtmiş olduğumuz gibi serbest radikaller oksijen ve azot türleri olarak sınıflandırılmakta ve her guruba ve hatta her radikale göre spesifik ve duyarlı yöntem çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmalar daha çok spektroskopik yöntemler üzerinde yoğunlaşmıştır. Reaktif türün saptanması, hücre içinde reaktif türe bağlanarak daha kararlı duruma getirecek başka kimyasal moleküller (problar) kullanılarak dolaylı yoldan yapılır. Spektroskopik prob (genellikle dışarıdan) reaktif bir tür ile reaksiyona girdiğinde bileşiğin spektroskopik özelliklerinde (ışık absorpsiyonunda veya emisyonunda ya da magnetik özelliklerinde) değişiklik olur (5,12,32). Bu problar içinde floresans özellik gösterenler, gerek hücre kültürü ve gerekse doku çalışmalarında biyomoleküllerin tanımlanmasında en çok kullanılan en mükemmel saptayıcılardır. Floresan problar, canlı hücre içindeki hedef moleküle bağlanarak o molekülü görülebilir hale getirebilir. Tsien'in grubu 1980'li yıllarda çeşitli biyomoleküller için farklı floresans problar kullanak bu konuda öncü çalışmalar yapmışlar ve hücre fizyolojisi ile ilgili yeni bilgiler elde edilmesinde büyük katkılar sağlamışlardır (6).

Biz de çalışmamızda, OH• radikallerini saptamada son yıllarda kullanıma sunulmuş olan iki floresans prob belirledik. Reaktif oksijen türlerinden OH• radikallerinin seçilme sebebi,

DNA gibi çok önemli bazı biyomoleküllere çok yüksek bir reaktivite göstererek atak yapması ve bu moleküllerde dönüşümsüz olarak oksidatif hasar yaratmasıdır. Bu alandaki çalışmaların çoğu radyobiyolojide de kullanılmak üzere ve özellikle de DNA ya bağlanarak radikal hasarına sebep olan ya da spesifik bir bölegesine *Fenton-katalitik* metalleri aracılığı ile bağlanarak radikal hasarı oluşturan OH• radikallerinin saptanmasında kullanılmayı amaçlayan araştırmalardır (37). Hidroksil radikalleri aromatik halkaya katılmaktan ziyade elektron transferi ile yükseltgenerek fluoresan özellik gösteren hidroksi-aromatik bileşenlere dönüşür. Bu tür çalışmalardaki temel yaklaşım da budur. Yüksek reaktivite gösteren OH• radikallerinin yaşam sürelerinin kısa olmaları nedeniyle selektif bir şekilde saptanmaları zordur. Ancak son yıllarda geliştirilen birçok fluoresan prob, OH• radikallerini seçici olarak saptayabilme özelliğindedir ve bu konuda mükemmel yöntemler geliştirildiği araştırmacılar tarafından rapor edilmektedir (6).

OH• radikalleri için sentezlenmiş olan fluoresan problemlerin çoğu kumarinlerin hidroksilasyonunu ya da salisilat veya terafitalat türünden benzenoid moleküllerinin hidroksilasyonunu temel almaktadır (37). Bu şekilde kumarin-3-karboksilik asidin süksinimidil esteri, hücredeki makromoleküller üzerindeki belirli bir bölgeye yönlendirilmiş olarak bağlanabilir. Makrigiorgos ve arkadaşları kumarin-3- karboksilik asitin (Kumarin) ya da süksinimidil esterinin (SECCA), oluşturulan OH• radikallerini saptamak üzere kullanılabileceğini çalışmalarında belirtmişlerdir. Amino grupları ile reaksiyon verebilen kumarin, albumin, avidin, histon, polilizin ve oligonükleotid gibi biyomoleküller ile konjugatlar oluşturur ve aynı zamanda da OH• radikalleri ile 7-hidroksi kumarin olarak fluoresan ünlü bir reaksiyon verir. Ne yazık ki bu problemlerin eksitasyon dalda boyları kısa ($\lambda < 400 \text{ nm}$) olduğu için in vivo çalışmalarda fluoresan görüntülemeye başarılı bir sonuç rapor edilmemiştir (6).

Deprotection (korumanın bozulması) mekanizmasını temel alan ve son yıllarda kullanıma sunulmuş olan fluoresan problemler içinde APF ve HPF'nin, yüksek reaktivite gösteren OH• radikalleri ve peroksidazların reaktif ara ürünleri türünden ROT'ların selektif olarak saptanmasında çok başarılı sonuçlar elde edildiği Nagano ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir. Bu problemlerin daha önceden kullanıma sunulmuş olan DCFH probunun aksine otooksidasyona karşı yüksek direnç gösterdikleri ve pek çok kimyasal ve biyolojik sistemde verimli bir şekilde kullanılabileceklerini belirtmişlerdir (6). Biz de çalışmamızda yapı ve etki bakımından birbirine çok benzer özellikteki bu iki probdan HPF'yi ve ayrıca farklı bir etki

mekanizmasını (hidroksilasyon) temel alan Kumarin probunu seçtik. Bu iki probdan hangisinin insan dermal fibroblast hücrelerinde oluşturulan OH• radikallerini seçici olarak saptamada ve doğru bir şekilde miktar belirtimlerini yapmada en uygun olabileceğini araştırmak ve optimal koşulları belirlemek istedik. Çünkü son yıllarda sentezlenmiş olan bu floresan proplar, daha önce kullanıma sunulmuş olan proplarla yeterince karşılaştırılmadıkları için yaygın olarak kullanılmamaktadırlar. Örneğin DCFH probu, insan hepatosellüler karsinoma hücresi (HLE) (44), insan Jurkat T hücresi (48), insan retinal pigment epithelial hücresi (ARPE-19 cells) (49), RGC-5 hücresi (50) gibi hücrelerde çalışılmıştır. Bizim çalışmamızda kullandığımız yeni sentezlenen proplardan Kumarin ise yalnızca RAW 264 hücrelerinde (45) ve murine hepatoma hücrelerinde (42) çalışılmıştır. Yine çalışmamızda kullandığımız yeni sentezlenen proplardan HPF ise insan hepatosellüler karsinoma (HLE) (47) ve 143B insan osteosarkoma hücreleri (46) olmak üzere yine sadece iki hücre hattında çalışılmıştır. Bu proplar için yeterince çalışmanın olmaması bizi bu araştırmaya yönlendiren en önemli sebepler arasındadır. Literatürde; HPF, DCFH ve APF (6-(4-amino)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid) proplarının karşılaştırıldığı ve ayrıca HPF, APF, HPPA (3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid), Amplex Red propları arasında da karşılaştırmaların yapıldığı çalışmalar bulunmaktadır (47). Ancak, bu çalışmalarda fibroblast hücreleri yer almamaktadır.

Çalışmamızda öncelikle kültüre edilen insan dermal hücreleri optimize edilmiş ve 5000 ile 20000 hücre arasında anlamlı bir fark olmadığı t testi ile belirlenmiş ($p=0.962$) ve 20000 hücre sayısı ile deneyler oluşturulmuştur. Daha sonra reaksiyon ortamında kullanılan bütün reaktiflerin optimizasyon çalışmaları yapılmış, sonuçları bulgular bölümünde sunulmuştur. Elde edilen sonuçlarda, bütün reaktifler için floresans ışımının en yüksek olduğu konsantrasyon değerleri seçilmiştir. Optimize koşullardaki konsantrasyon değerleri kullanılarak hem HPF hem de Kumarin için H_2O_2 standart grafikleri hazırlanmıştır. HPF için ışım şiddetindeki doğrusallık 8 tekrar yapılarak elde edilen sonuçların ortalaması alınarak; $0.00 \mu M - 0.24 \mu M$ (0.7309r değeri) aralığı olarak saptanmıştır. Kumarin için de 8 kez yapılan tekrar ölçümlerinin ortalaması alınmış ve $0.00 \mu M$ ile $0.48 \mu M$ (0.9883) konsantrasyon aralığı ölçüm aralığı olarak belirlenmiştir.

Analitik performans kriterlerinden biri olan *tekrarlanabilirlik* çalışması yalnızca *deney içi tekrarlanabilirlik* çalışması olarak gerçekleştirilmiştir. Her bir prob için 20'şer kez tekrarlanan ve elde edilen sonuçlar; HPF için %CV 6.898 ve kumarin için %CV 0.95 olarak bulunmuştur. Buna

göre HPF probu için elde sonuçlar anlamlı olarak bir fark gösterirken, Kumarin probu için deney içi yapılan tekrarlar ölçümlerinde anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır. Çalışmamızda kullandığımız hücrelerin ve reaksiyon karışımında kullandığımız reaktiflerin, her gün yeniden hazırlanmalarının gerekliliği nedeniyle deneyler arası tekrarlanabilirlik çalışması yapılamamıştır.

Bizim elde ettiğimiz optimize koşullarda yaptığımız ölçümlere ek olarak, Setsukinai ve arkadaşlarının (47) beyaz kan hücrelerinde HPF ve APF problemleri ile yapmış oldukları çalışmadaki optimize koşullar kullanılarak da HPF ve Kumarin problemleri için ölçümler yapılmıştır (kumarin 23.77 ± 1.37 F.I (n=40) ve HPF için 14.51 ± 2.07 F.I (n=40)). Bizim optimize ettiğimiz koşullar altında elde ettiğimiz ölçümlerin ortalama değerlerinin istatistiksel analizine ($p < 0.05$) göre Kumarin probunun anlamlı olarak HPF probundan daha yüksek bir floresans ışıma şiddeti gösterdiğini saptadık (kumarin için 52.1 ± 4.1 F.I (n=40) ve HPF için 32 ± 7.22 F.I (n=40)). Elde ettiğimiz bu ölçüm değerlerinin ne kadarının hücre ortamı ve ne kadarının reaksiyon karışımından etkilendiğini belirleyebilmek için sadece reaksiyon karışımı, sadece hücre ortamı ve sadece hücrelerin olduğu guruplara ayrı ayrı Kumarin ve HPF problemleri ekleyerek yapılan ölçümler ve elde edilen ışıma şiddetleri karşılaştırılmıştır. Reaksiyon karışımına hücreleri de içeren hücre ortamı ve HPF probu eklendiğinde elde edilen ışıma şiddeti 32.72 ± 7.22 F.I (n=40) iken, aynı karışıma bu kez hücre eklenmeden ölçüm yapılmış ve elde edilen ölçüm değeri 13.18 ± 1.99 F.I (n=40) olarak saptanmıştır. Aynı işlem Kumarin için uygulandığında, yani reaksiyon karışımına hücreleri de içeren hücre ortamı ve Kumarin eklendiğinde elde edilen ölçüm değeri 52.1 ± 4.1 F.I (n=40) iken hücre ortamı, Kumarin ve reaksiyon karışımından elde edilen değer 11.34 ± 1.19 F.I (n=40) olarak bulunmuştur. Bu karşılaştırma göstermektedir ki; HPF probu, Kumarin probuna kıyasla reaksiyon karışımı ve hücre ortamından daha fazla etkilenmektedir. Her iki prob için de hücre ortamı ve karışımdan etkilenen ışıma şiddeti değerleri normal hücre, karışım ve prob dan elde edilen ölçüm değerinden çıkarılırsa hücre, HPF ve reaksiyon karışımı için son değer 19.54 ± 7.22 F.I (n=40) ve hücre, Kumarin ve reaksiyon karışımı için elde edilen değer 40.76 ± 4.1 F.I (n=40) olarak bulunur. Sonuç olarak Kumarin probu, HPF probuna kıyasla, hücre ortamı ve reaksiyon karışımından daha az etkilenmektedir.

Literatürde, insan dermal fibroblast hücre hattı kullanılarak kültüre edilen hücre ortamında oluşturulan $OH\cdot$ radikallerinin saptanmasına yönelik olan bu çalışmaya benzer bir çalışma olmadığı için bu araştırmayı literatür bilgileri ile karşılaştırma olanağımız olmamıştır. Ayrıca bir

standardımız olmadığı için doğruluk ve geri kazanım gibi analitik performans ölçütleri değerlendirilememiştir. Ancak HPF ve Kumarin problemlerinin karşılaştırılmaları da ilk kez bu çalışmada yapılmıştır. Bu bağlamda literatüre yeni bilgiler kazandırmış olduğumuz inancındayız.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Elde ettiğimiz verilere dayanarak insan dermal fibroblast hücrelerinde OH• radikallerinin belirlenmesinde kumarin'in HPF probundan daha uygun olduğunu saptadık. Ayrıca, heriki prob için, insan deri fibroblastları çalışmalarında optimum çalışma parametrelerini saptadık. Kumarin için elde edilen ölçüm sonuçları ile HPF için elde edilen ölçüm sonuçları arasında tartışmada belirttiğimiz kriterlere göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu belirledik. Ayrıca kumarin probunun bir avantajı da, HPF probundan çok daha ucuza temin edilebilmesidir. Bu da oluşturulacak projelere maliyet açısından büyük katkılarda bulunacaktır. Buna ek olarak bu probun taşınım ve saklama kolaylığı, uzun saklanabilme süresi ve küçük moleküler yapıya sahip olması gibi özellikleri araştırmalar ve araştırmacılar için kumarin probunu kuşkusuz daha uygun ve çok daha avantajlı kılmaktadır.

İnsan dermal fibroblast hücrelerinde yapmış olduğumuz bu çalışmanın, son yıllarda artış gösteren yaşlanma ve kanser çalışmalarına oksidatif stres perspektifinden bir yöntem çalışması bulguları ile küçük de olsa bir katkı sağlayacağı inancındayız.

7.KAYNAKLAR

1. Gomes A, Fernandes E, Lima J. Fluorescence probes used for detection, of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods* 2005;65: 45–80.
2. Zhang DX, Gutterman DD. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H2023–H2031.
3. Murrant CL, Reid BM. Detection of Reactive Oxygen and Reactive Nitrogen Species in Skeletal Muscle. *Microscopy Research And Technique* 2001; 55: 236–248.
4. Tai C, Gu X, Zou H, Guo Q. A new simple and sensitive fluorometric method for the determination of hydroxyl radical and its application. *Talanta* 2002;58: 661-667.
5. Bartosz G. Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species. *Clinica Chimica Acta* 2006; 368: 53–76.
6. Soh N. Recent advances in fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species. *Anal Bioanal Chem* 2006; 386: 532–543.
7. Moore J, Yin J, Yu L. Novel Fluorometric Assay for Hydroxyl Radical Scavenging Capacity (HOSC) Estimation. *J. Agric. Food Chem* 2006; 54: 617-626.
8. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.
9. Sarma A.D, Mallick A.R, Ghosh A.K. Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions: An Overview. *Physiol Rev* 2010; 3: 185-192.
10. Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin M. T. D, Mazura M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007; 39: 44–84.
11. Makrigiorgos GM, Baranowska KJ, Bump E ve ark. A method for detection of hydroxyl radicals in the vicinity of biomolecules using radiation-induced fluorescence of coumarin. *Int. J. Radiat. Biol* 1993; 63, No: 4, 445-458.
12. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology* 2004; 142: 231–255.

13. Fang Y.Z, Yang S, Wu G. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition* 2002;18: 872– 879.
14. Brömme H-J, Zühlke L, Silber R-E, Simm A. DCFH2 interactions with hydroxyl radicals and other oxidants – Influence of organic solvents. *Experimental Gerontology* 2008; 43: 638–644.
15. Ziecha D, Francob R, Georgakilasc A.G, Georgakilac S, Malamou-Mitsid V, Schonevelde O, Pappaf A, Panayiotidisg M.I. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. *Chemico-Biological Interactions* 2010; 188: 334–339.
16. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.
17. Dickinson CB, Srikun D, Chang JC. Mitochondrial-targeted fluorescent probes for reactive oxygen Species. *Current Opinion in Chemical Biology* 2010; 14: 50–56.
18. Weseler A.R, Bast A. Oxidative Stress and Vascular Function: Implications for Pharmacologic Treatments. *Curr Hypertens Rep* 2010; 12: 154–161.
19. Tkaczyk J, Vizek M. Oxidative Stress in the Lung Tissue– Sources of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defence. *Prague Medical Report* 2007; 108: No.2. 105–114.
20. Sawyer D.B, Liang C.S, Colucci W.S. Oxidative and Nitrosative Stress in Heart Failure
C H A P T E R 12: 185-197.
21. Merzenicha G.U, Zeitlera H, Vettera H, Kraft K. Synergy research: Vitamins and secondary plant components in the maintenance of the redox-homeostasis and in cell signaling. *Phytomedicine* 2009; 16: 2–16.
22. Valko M, Rhodes C.J, Moncola J, Izakovic M, Mazura M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 2006; 160: 1–40.
23. Sousa T, Afonso J, Felix Carvalho F, Teixeira A.A. Lipid Peroxidation and Antioxidants in Arterial Hypertension. *Lipid Peroxidation* 2012; 345-392.
24. Semra Gezer, Klinik laboratuvarlarda yöntem seçimi ve analitik performansın değerlendirilmesi, In: Gezer S, Güner G, Tuncel P. Klinik laboratuvarlarda yöntem

- seçimi değerlendirilmesi ve laboratuvara uygulanması kurs kitabı, birinci baskı. Türk biyokimya derneği, 2000; 1-36.
25. Abadie N. A, Gouaze V, Salvayre R, Levade T. Ceramide in Apoptosis Signaling: Relationship With Oxidative Stress. *Free Radical Biology & Medicine* 2001; 31. 6: 717-728.
 26. Mythili Y, Sudharsan P.T, Selvakumar E, Varalakshmi P. Protective effect of dl- α -lipoic acid on cyclophosphamide induced oxidative cardiac injury. *Chemico-Biological Interactions* 2004; 151: 13–19.
 27. Perrone G.G, Tan S.X, Dawes I.W. Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 2008; 1783 1354–1368.
 28. Stehbens W.E. Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc. *Experimental and Molecular Pathology*. 2003; 75: 265–276.
 29. Sacheck J.M, Blumberg J.B. Role of Vitamin E and Oxidative Stress in Exercise. *Nutrition* 2001;17: 809–814.
 30. Valko M, Rhodes C.J, Moncola J, Izakovic M, Mazura M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 2006; 160: 1–40.
 31. Filair E, Toumib H. Reactive oxygen species and exercise on bone metabolism: Friend or enemy? *Joint Bone Spine* 2012; 79: 341–346.
 32. Augusto O, Muntz VS. EPR spin-trapping of protein radicals to investigate biological oxidative mechanisms. *Amino Acids* 2007; 32: 535–542.
 33. Thannickal V.J, Fanburg B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: 1005-1028.
 34. Brandes P.R, Janiszewski M. Direct detection of reactive oxygen species ex vivo, *Kidney International* 2005;67: 1662-1664.
 35. Ou B, Hampsch WM, Flanagan JK, Deemer EL. Prior R, Huang D. Novel Fluorometric Assay for Hydroxyl Radical Prevention Capacity Using Fluorescein as the Probe. *J. Agric. Food Chem* 2002; 50: 2772-2777.
 36. Nappi JA, Vass E. Hydroxyl Radical Production by Ascorbate and Hydrogen Peroxide. *Neurotoxicity Research*.2000; 2: 343-355.

37. Wardman P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls, and prospects. *Free Radical Biology & Medicine* 2007; 43: 995–1022.
38. Fisher AE, Naughton DP. Vitamin C contributes to inflammation via radical generating mechanisms: a cautionary note. *Medical Hypotheses* 2003; 61: 657–660.
39. Barbusinski K. Fenton reaction – controversy concerning the chemistry. *Ecological Chemistry and Engineering* 2009;16: 347-358.
40. Yang X, Guo X. Investigation of the anthracene–nitroxide hybrid molecule as a probe for hydroxyl radicals. *Analyst* 2001; 126: 1800–1804.
41. Li P, Xie T, Duan X, Yu F, Wang X, Tang B. A New Highly Selective and Sensitive Assay for Fluorescence Imaging of COH in Living Cells: Effectively Avoiding the Interference of Peroxynitrite. *Chem. Eur. J.* 2010; 16: 1834 – 1840.
42. Xiao H, Parkin K. Antioxidant functions of selected Allium Thiosulfinates and S-Alk(en)yl-L-Cysteine sulfoxides. *J. Agric. Food Chem* 2002; 50: 2488-2493.
43. Lakowicz, Joseph R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third edition. Kluwer Academic: Printed in Springer, 2006: 1-5.
44. Lakowicz, Joseph R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, second edition. Kluwer Academic: Plenum Publishers, 1999: 10.
45. Soh N, Makihara K, Ariyoshi T, Seto D, Maki T, Nakajima H, Nakano H, Imato T. Phospholipid-linked Coumarin: A Fluorescent Probe for Sensing Hydroxyl Radicals in Lipid Membranes. *Analytical sciences* february 2008; 24: 293-296.
46. Indo H.P, Davidson M, Yen H.C, Suenaga S, Tomita K, Nishii T, Higuchi M, Koga Y, Ozawa T, Majima H. J. Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. *Mitochondrion* 2007; 7: 106–118.
47. Setsukinai KI, Urano Y, Kakinuma KJ, Majima H, Naganov T. Development of Novel Fluorescence Probes That Can Reliably Detect Reactive Oxygen Species and Distinguish Specific Species. *The Journal Of Biological Chemistry* 2003;Vol. 278, No. 5: 3170–3175.

48. Maeda H. Which Are You Watching, an Individual Reactive Oxygen Species or Total Oxidative Stress? New York Academy of Sciences 2008;1130: 149–156.
49. Kinga R.E, Kent D.K, Bomser J.A. Resveratrol reduces oxidation and proliferation of human retinal pigment epithelial cells via extracellular signal-regulated kinase inhibition. Chemico-Biological Interactions 2005;151: 143–149.
50. Shimazawa M, Nakajima Y, Mashima Y, Hara H. Docosahexaenoic acid (DHA) has neuroprotective effects against oxidative stress in retinal ganglion cells. Brain Research 2009;1251, 269–275.

8.EKLER

Ek-1. Etik Kurul Raporu

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Konu: Karar hk. */159* *1703.204*

Yrd.Doç.Dr.Nilgün YENER
Dr.Reza Salimi

Kurulumuz tarafından 03.03.2011 tarih ve 113-GOA protokol numaralı 2011/06-15 karar numarası ile görüşülen “Yeni Sentezlenen Fluoresan Probların Fibroblast Hücrelerde Oluşturulan OH Radikallerinin Belirtiminde Kullanılması ve Değerlendirilmesi” konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Banur
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL
Başkan

Ek: Etik Kurul Kararı

Dokuz Eylöl Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2011/06-15	Tarih:03.03.2011				
	Yrd.Doç.Dr.Nilgün YENER'in sorumlusu Dr.Reza Salimi'nin yürütücüsü olduğu "Yeni Sentezlenen Fluoresan Probların Fibroblast Hücrelerde Oluşturulan OH Radikallerinin Belirtiminde Kullanılması ve Değerlendirilmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.					
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Etik Kurullar Yönetmeliği , İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Ph.D.Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Ph.D.Z.Candan ALGUN	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Ph.D.Zuhal BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire, Halk Sağlığında doktora	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ömer Selahattin TOPALAK	İç Hastalıkları (Gastroenteroloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Işıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Ph.D.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
AÇIK ADRES	GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
TELEFON	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
FAKS	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	113-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Yeni Sentezlenen Fluoresan Probların Fibroblast Hücrelerde Oluşturulan OH Radikallerinin Belirtiminde Kullanılması ve Değerlendirilmesi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Yrd.Doç.Dr.Nilgün YENER Dr.Reza Salimi Tıbbi Biyokimya A.D.
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

Ek-2. ÖZGEÇMİŞ

REZA SALİMİ

TC Kimlik No/ Pasaport No:	U14618388
Doğum Yılı:	19/04/1983
Yazışma Adresi:	Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Sağlık Bilimler Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Balçova, İzmir, Türkiye
Telefon:	00905549459403
Faks:	-
e-posta:	rezasalimitr@yahoo.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
İran	Shahriyar shahre gods Azad Üniversitesi	Fen Fakültesi	Moleküler Biyoloji	Lisans	2005
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Moleküler Tıp	Yüksek Lisans	-